

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 713**

51 Int. Cl.:

G01N 33/552 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

B01J 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2011 E 11164159 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2518503**

54 Título: **Estuche de sol-gel para preparar un biochip y método para preparar un biochip usando el mismo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.05.2016

73 Titular/es:

**PCL, INC. (100.0%)
Room 83421, Research Complex 2
Sungkyunkwan University Cheoncheon-dong,
Jangan-gu
Suwon-si, Gyeonggi-do 440-746, KR**

72 Inventor/es:

**JO, MINJOUNG y
LEE, SERAM**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 571 713 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

Estuche de sol-gel para preparar un biochip y método para preparar un biochip usando el mismo

La presente invención se refiere a un método para preparar un biochip de un modo simple bien al usar una composición de en estado de sol, preparada al mezclar soluciones específicas secuencialmente, o bien al distribuir tales soluciones secuencialmente directamente sobre un sustrato sin un procedimiento de pretratamiento.

Técnica anterior

La tecnología de los biochips es un ejemplo representativo de una nueva tecnología basada en una combinación de nanotecnología (NT), biotecnología (BT) y tecnología de la información (IT). Los biochips son micromatrices de alta densidad que comprenden una variedad de biomateriales sobre la superficie de un soporte sólido y se pueden dividir, según el tipo de biomaterial unido a la superficie del soporte sólido, en un chip de DNA, un chip proteínico, un chip celular, un chip de neuronas y similares. Además, una combinación de tecnología de biochips con tecnología microfluídica permite el desarrollo de la tecnología LOC (laboratorio en un chip). La tecnología de los biochips incluye una técnica para la inmovilización de un biomaterial, una técnica para la elaboración de un soporte sólido compatible con un biomaterial, una técnica para elaborar micromatrices de biomateriales, una técnica de ensayo para realizar diversas reacciones biológicas en un chip preparado, una técnica para detectar los resultados de una reacción, manipulación de proteínas para la elaboración de un biomaterial que va a ser inmovilizado, una técnica de recombinación génica y similares.

Un chip proteínico, un tipo de biochip, es una micromatriz de alta densidad que comprende una variedad de proteínas sobre una unidad de área de la superficie de un soporte sólido. En los últimos años, ha habido esfuerzos para fabricar chips proteínicos usando los principios y las técnicas para fabricar chips de DNA disponibles comercialmente. En general, los chips de DNA disponibles comercialmente se fabrican principalmente al inmovilizar DNA sobre un sustrato de vidrio, cuya superficie se ha pretratado con un material de revestimiento. Cuando se fabrica un chip proteínico usando un método similar a un método usado para fabricar un chip de DNA, esto es, cuando se fabrica un chip proteínico al inmovilizar proteínas sobre un sustrato de vidrio, cuya superficie se ha pretratado con un material de revestimiento, surgen diversos problemas debido a la diferencia en las propiedades físicas y químicas entre las proteínas elegidas que se van a inmovilizar.

Se produjeron chips proteínicos previos al inmovilizar proteínas sobre un sustrato de vidrio tratado superficialmente y se usaron para realizar un ensayo de unión simple. El comportamiento del chip proteínico estaba determinado por la actividad de la proteína inmovilizada y era difícil trabajar satisfactoriamente (MacBeath y Schreiber, *Science* 289:1760, 2000). Tales problemas están provocados por la desnaturalización, la inactivación y la degradación de proteínas resultantes de la diferencia en las propiedades físicas y químicas inherentes de las proteínas. A fin de vencer estos problemas, se han efectuado estudios sobre la tecnología del tratamiento de superficies para inmovilizar proteínas adecuados para las características de las proteínas que se distinguen de los de DNA y sobre materiales para inmovilizar una proteína. Tales estudios se dirigen a un método para realizar la inmovilización sobre la superficie de un chip proteínico mientras se mantiene la actividad de la proteína. Ejemplos de los mismos incluyen un portaobjetos revestido con Hydrogel™ (PerkinElmer), el chip Versalinx (Prolinx), el chip PDC que es un biochip disponible comercialmente de Zyomyx, etc.

Mientras tanto, un procedimiento de sol-gel es una tecnología que se ha usado para elaborar una microestructura mediante microprocesamiento. Particularmente, es una tecnología comprendida por la formación de una red de unión mediante un procedimiento suave y la inmovilización de biomoléculas dentro de la red de unión mediante métodos distintos a un método de unión covalente, en lugar de ligar químicamente las biomoléculas a un material inorgánico (Gill, I. y Ballesteros, A., *Trends Biotechnol.*, 18:282, 2000).

Por otra parte, muchas biomoléculas, incluyendo enzimas, se inmovilizan sobre una matriz de sol-gel en masa y se usan para fabricar biocatalizadores o biosensores (Reetz y cols., *Adv. Mater.*, 9:943, 1997). Particularmente, estas biomoléculas también se usan en la detección del desarrollo cromático óptico debido a sus propiedades ópticas transparentes (Edminston y cols., *J. Coll. Interf. Sci.*, 163:395, 1994). Además, se sabe que las biomoléculas no solo se estabilizan químicamente sino también térmicamente sobre una matriz de sol-gel (Dave y cols., *Anal. Chem.*, 66:1120, 1994).

En el caso de los biosensores, la reacción sol-gel se usa como un método para formar y diseñar una microestructura sobre un soporte sólido así como para una inmovilización simple. A este respecto, el método de diseño incluye conformar un sol en estado líquido usando un molde mediante dinámica de fluidos, gelificar el material conformado y retirar el molde, formando así un modelo. Por ejemplo, una tecnología denominada tecnología de micromodulación en capilares (MIMIC) es una técnica para modelar sílice mesoscópica (Marzolin y cols., *Adv. Maser.* 10:571, 1998; Schuller y cols., *Appl. Optics* 38:5799, 1999). Esta tecnología se puede usar en el modelado básico de la ingeniería de los microfluidos.

Sin embargo, puesto que la actividad de la proteína puede estar afectada por diversos factores tales como pH, es

importante fijar condiciones para el mantenimiento de la actividad al añadir proteína desde su estado de sol en el proceso de sol-gel. Con este propósito, se han propuesto tecnologías de diseño de una proteína al premezclar la proteína con un sol usando diversas condiciones suaves tales como pH neutro (Kim y cols., *Biotechnol. Bioeng.* 73:331 a 337, 2001), pero ha habido problemas ya que el proceso sol-gel avanza rápidamente a pH neutro de modo que se pueden producir grietas o el gel se vuelve opaco, según la elección de los aditivos. Además, ha habido un problema ya que, debido a que se debe llevar a cabo el procedimiento de pretratamiento de mezclado de la proteína con un sol, es probable que la concentración de puntos no sea uniforme.

En patentes anteriores relativas a procedimientos de sol-gel, hay una patente que se refiere a un biochip de sol-gel para mejorar la reactividad de un biomaterial, en el que el biochip de sol-gel se fabrica mediante una mezcla en estado de sol que contiene el biomaterial que se somete a una relación de gelificación sobre un sustrato de chip de modo que el biomaterial se atrape en los poros de la matriz de gel y sea encapsulado por los poros formados sobre la matriz de gel. Además, hay patentes que se refieren a un método para fabricar un biochip usando un proceso de sol-gel, comprendiendo el método cribar una composición en estado de sol con respecto a biochips de sol-gel, que evita la modificación de un biomaterial inmovilizado o incrementa la sensibilidad del biomaterial. Sin embargo, ha habido problemas debido a que el método de fabricación es complejo y debido a que, en el procedimiento para preparar la composición en estado de sol, la actividad del biomaterial se reduce o el biomaterial se descompone.

El documento WO 2007/086671 divulga un método para cribar una composición en estado de sol con respecto a biochips de sol-gel, que se usa para inmovilizar una sonda sobre un sustrato con superficie no tratada, y también se refiere a una composición en estado de sol cribada mediante dicho método y a un biochip de sol-gel que comprende dicha composición en estado de sol inmovilizada sobre el mismo.

Anal. Chem. 2006, 78, 7392-7396 divulga un biomaterial de sol-gel de bajo coste optimizado para el uso en chips proteínicos con una sensibilidad de un nivel de femtogramos.

Según esto, los presentes inventores han hecho muchos esfuerzos para prevenir la disminución en la actividad y la descomposición de un biomaterial durante la preparación de una composición en estado de sol y, como resultado, han encontrado que, cuando un monómero de silicato específico y aditivos se mezclan secuencialmente en un orden específico y se distribuyen sobre un sustrato o cuando estos componentes se distribuyen secuencialmente directamente sobre un sustrato y se gelifican, la velocidad de gelificación del mismo se puede retrasar en comparación con la de métodos de fabricación convencionales, haciendo así posible fabricar un biochip significativamente uniforme, y se puede evitar la disminución en la actividad y la descomposición de un biomaterial por los componentes anteriores, haciendo así posible fabricar un biochip que tiene una sensibilidad muy alta, completando de ese modo la presente invención.

Sumario de la invención

Un objetivo principal de la presente invención es proporcionar un material de sol-gel en una forma de estuche de modo que cualquier persona pueda elaborar y analizar fácilmente un biochip usando el estuche sin necesitar un equipo o una tecnología especiales.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para preparar un biochip uniforme sin ningún procedimiento de pretratamiento, al establecer un método de preparación en el que una composición en estado de sol específica obtenida al mezclar soluciones secuencialmente se distribuye sobre un sustrato o en el que las soluciones se distribuyen secuencialmente directamente sobre un sustrato.

Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar un método para analizar un material elegido usado dicho biochip.

Para alcanzar el objetivo anterior, según una realización de la presente invención, se proporciona un método para preparar un biochip, incluyendo el método las etapas de: mezclar líquidos incluyendo SolB1, SolB2, SolB3, SolBH y SolBS, secuencialmente, en un estuche de sol-gel (estuche SolB); mezclar el líquido mezclado con un material detector (p. ej., proteína); y distribuir la mezcla sobre un sustrato.

Según otra realización de la presente invención, se proporciona un método para preparar un biochip mediante la gelificación de una composición en estado de sol sin ningún procedimiento de pretratamiento, incluyendo el método las etapas de: distribuir una composición en estado de sol que consiste en SolB1, SolB2 y SolB3; distribuir SolBH sobre el sustrato; y distribuir sobre el sustrato una solución que contiene SolBS, una proteína detectora y agua destilada, y a continuación gelificar las soluciones distribuidas.

Con respecto a SolB1, SolB2 y SolB3 en el estuche SolB, que se puede usar en la preparación del biochip,

(i) dicho SolB 1 puede ser al menos un primer monómero de silicato seleccionado del grupo que consiste en metiltrietoxisilano (MTES), etiltrietoxisilano (ETrEOS), silicato sódico, ortosilicato de tetrametilo (TMOS), ortosilicato de tetraetilo (TEOS) y tetrametoxisilicato (TMS);

(ii) dicho SolB 2 puede ser al menos un segundo monómero de silicato seleccionado del grupo que consiste en 3-aminotrimetoxisilano (3-ATMS), diglicerilsilano (DGS), trimetoxisilicato de metilo (MTMS), poli(silicato de glicerilo) (PGS), poli(acetato de vinilo), polivinilpirrolidona, metacrilato de glicerilo, acrilato de hidroxietilo, carbonato de N,N-dicusinimidilo (DSC), 1,3,5-trimetilbenceno, cloruro de cetiltrimetilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio, anhídrido 3-(trietoxisilil)propilsuccínico, N-(3-trietoxisililpropil)-4-hidroxibutilamida (SIT8189.5), N-(trietoxisililpropil)gluconamida (SIT8189.0), pluronic L121 e hidróxido de tetrametilamonio; y

(iii) dicho SolB 3 puede ser al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en aminopropiltriethoxisilano (APTES), 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMOS), N-trietoxisililpropil-O-polietilenoxidouretano (PEOU), glicerol, PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 y PEG8000.

Con detalle, la presente invención también proporciona un método para preparar un biochip mediante la gelificación de una composición en estado de sol, comprendiendo el método las etapas de (a) y (b) en orden secuencial:

(a) distribuir sobre un sustrato una composición en estado de sol que consiste en SolB1, SolB2 y SolB3 en una forma puntual y distribuir SolBH (solución I) seleccionada del grupo que consiste en HCl, H₂SO₄, HNO₃ y CH₃COOH sobre el sustrato sobre el que se ha distribuido la composición en estado de sol; y

(b) distribuir la solución II, que comprende el tampón SolBS, un material biológico que interactúa con un material biológico buscado y agua destilada, sobre el sustrato sobre el que se ha distribuido la solución I, y a continuación gelificar las soluciones distribuidas,

en donde el método no tiene un procedimiento de pretratamiento, que es uno o más seleccionados del grupo que consiste en (i) un procedimiento de mezcla de SolB1, SolB2, SolB3, SolBH, SolBS o un material biológico que interactúa con un material biológico elegido; (ii) un procedimiento de turbulencia de la solución mezclada de (i); y (iii) un procedimiento de estabilización de la solución mezclada de (i) o (ii);

en donde (i) dicho SolB1 es al menos un primer monómero de silicato seleccionado del grupo que consiste en metiltriethoxisilano (MTES), etiltriethoxisilano (ETrEOS), silicato sódico, ortosilicato de tetrametilo (TMOS), ortosilicato de tetraetilo (TEOS) y tetrametoxisilicato (TMS);

en donde (ii) dicho SolB2 es al menos un segundo monómero de silicato seleccionado del grupo que consiste en 3-aminotrimetoxisilano (3-ATMS), diglicerilsilano (DGS), trimetoxisilicato de metilo (MTMS), poli(silicato de glicerilo) (PGS), poli(acetato de vinilo), polivinilpirrolidona, metacrilato de glicerilo, acrilato de hidroxietilo, carbonato de N,N-disuccinimidilo (DSC), 1,3,5-trimetilbenceno, cloruro de cetiltrimetilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio, anhídrido (trietoxisilil)propilsuccínico, N-(3-trietoxisililpropil)-4-hidroxibutilamida (SIT8189.5), N-(trietoxisililpropil)gluconamida (SIT8189.0), pluronic L121 e hidróxido de tetrametilamonio; y

en donde (iii) dicho SolB3 es al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en aminopropiltriethoxisilano (APTES), 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMOS), N-trietoxisililpropil-O-polietilenoxidouretano (PEOU), glicerol, PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 y PEG8000.

La presente invención también proporciona un método para preparar un biochip mediante la gelificación de una composición en estado de sol, comprendiendo el método las etapas de (a) y (b) en orden secuencial:

(a) añadir a una composición en estado de sol que comprende SolB1, SolB2 y SolB3 una solución de SolBH (solución I) seleccionada del grupo que consiste en HCl, H₂SO₄, HNO₃ y CH₃COOH;

(b) mezclar la solución de la etapa (a) con tampón SolBS y agua destilada, y a continuación estabilizar la solución mezclada a una temperatura que varía de -20°C a 4°C;

(c) mezclar la solución estabilizada de la etapa (b) con una solución que contiene un material biológico que interactúa con material biológico elegido, distribuir la solución mezclada sobre un sustrato y gelificar la solución distribuida;

en donde (i) dicho SolB1 es al menos un primer monómero de silicato seleccionado del grupo que consiste en metiltriethoxisilano (MTES), etiltriethoxisilano (ETrEOS), silicato sódico, ortosilicato de tetrametilo (TMOS), ortosilicato de tetraetilo (TEOS) y tetrametoxisilicato (TMS);

en donde (ii) dicho SolB2 es al menos un segundo monómero de silicato seleccionado del grupo que consiste en 3-aminotrimetoxisilano (3-ATMS), diglicerilsilano (DGS), trimetoxisilicato de metilo (MTMS), poli(silicato de glicerilo) (PGS), poli(acetato de vinilo), polivinilpirrolidona, metacrilato de glicerilo, acrilato de hidroxietilo, carbonato de N,N-disuccinimidilo (DSC), 1,3,5-trimetilbenceno, cloruro de cetiltrimetilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio, anhídrido (trietoxisilil)propilsuccínico, N-(3-trietoxisililpropil)-4-hidroxibutilamida (SIT8189.5) 50%, N-(trietoxisililpropil)gluconamida (SIT8189.0), pluronic L121 e hidróxido de tetrametilamonio; y

en donde (iii) dicho SolB3 es al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en aminopropiltriethoxisilano (APTES), 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMOS), N-trietoxisililpropil-O-poliethilenoimidocarbato (PEOU), glicerol, PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 y PEG8000.

5 También se describe un estuche para preparar un biochip, en el que el estuche se usa en dicho método de preparación e incluye un primer recipiente que contiene al menos un primer monómero de silicato, SolB1, seleccionado del grupo que consiste en metiltriethoxisilano (MTES), etiltriethoxisilano (ETrEOS), silicato sódico, ortosilicato de tetrametilo (TMOS), ortosilicato de tetraetilo (TEOS) y tetrametoxisilicato (TMS);

10 un segundo recipiente que contiene al menos un segundo monómero de silicato, SolB2, seleccionado del grupo que consiste en 3-aminotrimetoxisilano (3-ATMS), diglicerilsilano (DGS), trimetoxisilicato de metilo (MTMS), poli(silicato de glicerilo) (PGS), poli(acetato de vinilo), polivinilpirrolidona, metacrilato de glicerilo, acrilato de hidroxietilo, carbonato de N,N-dicisnimidilo (DSC), 1,3,5-trimetilbenceno, cloruro de cetiltrimetilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio, anhídrido (triethoxisilil)propilsuccínico, N-(3-trietoxisililpropil)-4-hidroxibutilamida (SIT8189.5), N-(triethoxisililpropil)gluconamida (SIT8189.0), pluronic L121 e hidróxido de tetrametilamonio;

15 un tercer recipiente que contiene al menos un aditivo, SolB3, seleccionado del grupo que consiste en aminopropiltriethoxisilano (APTES), 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMOS), N-trietoxisililpropil-O-poliethilenoimidocarbato (PEOU), glicerol, PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 y PEG8000;

20 un cuarto recipiente que contiene SolBH seleccionado del grupo que consiste en HCl, H₂SO₄, HNO₃ y CH₃COOH; y

un quinto recipiente que contiene tampón SolBS,

25 en donde el SolBH seleccionado del grupo que consiste en HCl, H₂SO₄, HNO₃ y CH₃COOH, el tampón SolBS, el agua destilada y el material biológico que interactúa con material biológico elegido se añaden secuencialmente a una composición en estado de sol que consiste en SolB1, SolB2 y SolB3 de modo que la composición en estado de sol se gelifique.

30 La presente invención también proporciona un biochip, preparado usando dichos método de preparación y composición en estado de sol, un método para analizar un biomaterial elegido usando el biochip y un método para analizar un material biológico elegido, comprendiendo el método una etapa de añadir una muestra, que contiene el material biológico elegido capaz de interactuar con el material biológico que interactúa con el material biológico elegido, al biochip preparado mediante el método.

35

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra un biochip fabricado al distribuir una solución de sol mezclada de la composición en estado de sol de la invención (S-Sol), la solución I y la solución II usando un robot.

40

La FIG. 2 muestra una respuesta al suero de un paciente de HIV en puntos que incluyen cinco antígenos de HIV1 (1, 2, 3, 4 y 5 son marcadores para el diagnóstico del anticuerpo de HIV1 y son p24, p31, gp41, gp120 y gp160, respectivamente).

45 La FIG. 3 muestra respuestas a diluciones en serie del suero de un paciente de HIV en puntos que incluyen diluciones en serie de antígeno.

La FIG. 4 es una gráfica que muestra los resultados de cuantificar una respuesta a un suero de HIV estándar en puntos que incluyen cada uno de los cinco antígenos para HIV1 (1, 2, 3, 4 y 5 son marcadores para el diagnóstico de anticuerpo de HIV1 y son p24, p31, gp41, gp120 y gp160, respectivamente).

50

La FIG. 5 es una tabla que muestra una comparación de los resultados de una detección llevada a cabo usando el chip proteínico de la invención y un estuche de diagnóstico convencional con respecto a sueros de pacientes con HIV1 recogidos en diversos días después de la infección.

55

La FIG. 6 muestra una fotografía del escáner Axon GenePix (A) y una imagen fotográfica de cámara (B) de un chip fabricado usando sciFLEXARRAYER S11.

60 La FIG. 7 muestra esquemáticamente la configuración del chip proteínico de la invención, que contiene proteínas detectoras en estructuras encapsuladas mientras microanaliza la superficie.

La FIG. 8 es un conjunto de fotografías que muestran una comparación de la uniformidad entre el biochip de la invención (derecha) y un biochip convencional (izquierda).

65 La FIG. 9 es un conjunto de fotografías que muestran una comparación de la uniformidad y la velocidad de gelificación entre la mezcla en estado de sol de la invención (A) y una mezcla en estado de sol (B) obtenida al

mezclar aleatoriamente las soluciones.

La FIG. 10 muestra los resultados de analizar una proteína específica usando un chip proteínico según la presente invención.

5 La FIG. 11 muestra los resultados de analizar un antígeno específico usando un chip proteínico según la presente invención.

10 La FIG. 12 muestra los resultados de analizar un anticuerpo contra una enfermedad específica usando un chip proteínico según la presente invención.

La FIG. 13 muestra los resultados de examinar la unión entre un compuesto específico (bisfenol A) y un adaptámero de DNA usando un chip de sol-gel según la presente invención.

15 La FIG. 14 es una imagen de un producto comercial que comprende un chip proteínico de sol-gel según la presente invención.

Descripción detallada de la presente invención y realización preferida

20 En lo sucesivo, la presente invención se describirá con detalle.

En un aspecto, la presente invención se dirige a un método para preparar un biochip mediante la gelificación de una composición en estado de sol, comprendiendo el método las etapas de:

25 (a) añadir a una composición en estado de sol que comprende SolB1, SolB2 y SolB3 una solución SolBH (solución I) seleccionada del grupo que consiste en HCl, H₂SO₄, HNO₃ y CH₃COOH;

30 (b) mezclar la solución de la etapa (a) con tampón SolBS y agua destilada, y a continuación estabilizar la solución mezclada a una temperatura que varía de -20°C a 4°C; y

(c) mezclar la solución estabilizada de la etapa (b) con una solución que contiene un material biológico que interactúa con un material biológico elegido, distribuir la solución mezclada sobre un sustrato y gelificar la solución distribuida,

35 en donde (i) dicho SolB1 es al menos un primer monómero de silicato seleccionado del grupo que consiste en metiltrietoxisilano (MTES), etiltrietoxisilano (ETREOS), silicato sódico, ortosilicato de tetrametilo (TMOS), ortosilicato de tetraetilo (TEOS) y tetrametoxisilicato (TMS);

40 en donde (ii) dicho SolB2 es al menos un segundo monómero de silicato seleccionado del grupo que consiste en 3-aminotrimetoxisilano (3-ATMS), diglicerilsilano (DGS), trimetoxisilicato de metilo (MTMS), poli(silicato de glicerilo) (PGS), poli(acetato de vinilo), polivinilpirrolidona, metacrilato de glicerilo, acrilato de hidroxietilo, carbonato de N,N-dicisinimidilo (DSC), 1,3,5-trimetilbenceno, cloruro de cetiltrimetilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio, anhídrido (trietoxisilil)propilsuccínico, N-(3-trietoxisililpropil)-4-hidroxiutilamida (SIT8189.5) 50%, N-(trietoxisililpropil)gluconamida (SIT8189.0), pluronic L121 e hidróxido de tetrametilamonio; y

45 en donde (iii) dicho SolB3 es al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en aminopropiltrietoxisilano (APTES), 3-glicidoxipropiltrietoxisilano (GPTMOS), N-trietoxisililpropil-O-poli(etileno)oxidouretano (PEOU), glicerol, PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 y PEG8000.

50 En la presente invención, el SolBH preferiblemente tiene una concentración que varía de 1 mM a 100 mM.

En la presente invención, el SolBS puede ser al menos una solución seleccionada del grupo que consiste en NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ y Na₃PO₄, que tiene una concentración que varía de 1 mM a 100 mM.

55 Un método convencional para fabricar un biochip usando un procedimiento de sol-gel comprende mezclar una composición en estado de sol, un tampón y un material biológico que interactúa con un material biológico elegido en orden aleatorio para elaborar una solución de sol mezclada, someter a la solución de sol mezclada a un postratamiento tal como un procedimiento a vacío, y gelificar la solución postratada. Los métodos de mezcladura de la composición en estado de sol, el tampón y la proteína detectora incluyen turbulencia o mezcladura ultrasónica, y los métodos para elaborar conformaciones de sol-gel incluyen un método de formación de puntos sobre una placa de pocillos de sustrato, un método de revestimiento de la superficie del sustrato con una solución de sol-gel o un método de vertido de una solución de sol-gel en un molde y gelificación de la solución vertida.

65 En tales métodos, la concentración del material biológico que interactúa con un material biológico elegido puede ser diferente entre los puntos formados de la solución de sol mezclada y puede variar dependiendo de los operarios. Además, la posibilidad de contaminación durante el procedimiento de mezcladura es alta y la viscosidad de la

mezcla de sol-gel puede ser diferente entre muestras y, así, el grado de formación de puntos y la conformación y el tamaño de los puntos pueden ser diferentes entre muestras. Por esta razón, ha habido una necesidad de un método capaz de preparar un biochip uniforme que pueda vencer tales problemas.

5 Según el método de la invención para preparar el biochip, el biochip se prepara usando un procedimiento de sol-gel simple, y la concentración del material biológico que interactúa con un material biológico elegido es uniforme en todos los puntos, haciendo así posible detectar proteína con alta eficacia de un modo más preciso.

Una realización del método de la invención para preparar el biochip se describirá ahora con detalle.

10 En primer lugar, el primer monómero de silicato SolB1, el segundo monómero de silicato So1B2 y el aditivo SolB3 se mezclan secuencialmente para preparar una composición en estado de sol.

15 El SolB 1 que se usa en la presente invención es uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en metiltrietoxisilano (MTES), etiltrietoxisilano (ETrEOS), silicato sódico, ortosilicato de tetrametilo (TMOS), ortosilicato de tetraetilo (TEOS) y tetrametoxisilicato (TMS). En un Ejemplo de la presente invención, se usó TEOS como el primer monómero de silicato.

20 El SolB2 que se usa en la presente invención es uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en 3-aminotrimetoxisilano (3-ATMS), diglicerilsilano (DGS), trimetoxisilicato de metilo (MTMS), poli(silicato de glicerilo) (PGS), poli(acetato de vinilo), polivinilpirrolidona, metacrilato de glicerilo, acrilato de hidroxietilo, carbonato de N,N-dicussinimidilo (DSC), 1,3,5-trimetilbenceno, cloruro de cetiltrimetilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio, 3-anhídrido (trietoxisilil)propilsuccínico, N-(3-trietoxisililpropil)-4-hidroxitilamida (SIT8189.5), N-(trietoxisililpropil)gluconamida (SIT8189.0), pluronic L121 e hidróxido de tetrametilamonio. En un Ejemplo de la presente invención, se usó DGS como el segundo monómero de silicato.

25 Además, el SolB3, un aditivo que se usa en la presente invención, puede ser uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en aminopropiltrietoxisilano (APTES), 3-glicidoxipropiltrietoxisilano (GPTMOS), N-trietoxisililpropil-O-poli(etileno)oxidoureano (PEOU), glicerol, PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 y PEG8000. En un Ejemplo de la presente invención, se usó PEG como el aditivo SolB3.

30 El primer monómero de silicato, el segundo monómero de silicato y el aditivo se pueden seleccionar adecuadamente dependiendo de las propiedades de un biomaterial que se va a introducir en los monómeros o de la configuración de un chip de sol-gel que se va a preparar.

35 La composición en estado de sol para preparar el biochip según la presente invención comprende preferiblemente, basado en el volumen total de la composición en estado de sol, aproximadamente 2-30% en volumen del primer monómero de silicato, aproximadamente 2-8% en volumen del segundo monómero de silicato y 0-5% en volumen del aditivo. Debido a que la inhalación de la composición en estado de sol tiene un efecto perjudicial sobre el cuerpo humano, la preparación de la composición en estado de sol se lleva a cabo bajo buenas condiciones de ventilación.

40 La composición en estado de sol de la invención para preparar el biochip se caracteriza por que se forman microcanales debido a los poros cuando la composición se gelifica. A saber, tales canales proporcionan medios capaces de interactuar con un material elegido que se va a analizar. Particularmente, el aditivo (iii) sirve para controlar el tamaño de los microcanales en el gel.

En la presente invención, se realiza una técnica de punteado a mano sin usar ningún robot o se usa un robot sin contacto.

50 En la presente invención, el sustrato se puede optimizar a una temperatura superior al punto de rocío antes de su uso, y "una temperatura superior al punto de rocío" es una temperatura superior a una temperatura a la que se forma el rocío, y la temperatura se puede variar dependiendo de la condición de humedad, por ejemplo, el punto de rocío es 8,6°C cuando la temperatura de la atmósfera es 20°C y la humedad relativa es superior a 50%, en general, la temperatura es 14~17°C cuando la humedad es 70-80%.

55 En la presente invención, el sustrato puede estar hecho de uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en poli(metacrilato de metilo) (PMMA), plástico, silicio y vidrio, etc.

60 En la presente invención, el material biológico que interactúa con un material biológico elegido puede ser uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en un ácido nucleico, una proteína, un péptido, un material de bajo peso molecular y una célula.

65 En la presente invención, la solución añadida en la etapa (a), la mezcla en estado de sol, se puede estabilizar dejándola reposar a una temperatura que varía de -20°C a 4°C durante 30 minutos o más. Además, un recipiente en el que se va a introducir la composición en estado de sol usando un robot se puede graduar a 14-17°C (superior a la temperatura del punto de rocío a una humedad de 70-80%), y la composición en estado de sol se puede distribuir a

una humedad de 70-80% y a una temperatura atmosférica (temperatura del aire) de 20°C, condiciones de temperatura y humedad que son óptimas para la transición sol-gel.

5 A través de tales procedimientos de estabilización y optimización, la velocidad de gelificación de la composición en estado de gel se puede retrasar, con lo que se puede facilitar la formación de puntos, se puede evitar la separación de los puntos después de la gelificación, y se puede facilitar la formación de microcanales en el chip.

10 En la presente invención, la solución mezclada de la composición en estado de sol, el SolBH y el SolBS, y el agua destilada y el material biológico que interactúa con un material biológico elegido se mezclan entre sí en una relación entre 3:1:4 y 1:2:8.

En la presente invención, el SolBH y el SolBS tienen una concentración que varía de 1 mM a 100 mM.

15 En la presente invención, la relación en volumen del SolBS:el agua destilada:el material biológico que interactúa con un material biológico elegido está entre 1:2:1 y 2:5:1.

En la presente invención, el tampón es tampón de fosfato sódico que tiene un pH que varía de 3 a 8.

20 En la presente invención, el sustrato se trata superficialmente con plasma, se mordenta o se trata con PDMS, monómero de silicato o un material polimérico.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a un método para preparar un biochip mediante la gelificación de una composición en estado de sol, incluyendo el método las etapas de:

25 (a) distribuir sobre un sustrato una composición en estado de sol que consiste en SolB1, SolB2 y SolB3 y distribuir el SolBH (solución I) seleccionado del grupo que consiste en HCl, H₂SO₄, HNO₃ y CH₃COOH sobre el sustrato sobre el que se ha distribuido la composición en estado de sol; y

30 (b) distribuir la solución II, que comprende el tampón SolBS, un material biológico que interactúa con un material biológico elegido y agua destilada, sobre el sustrato sobre el que se ha distribuido la solución I, y a continuación gelificar las soluciones distribuidas,

35 en donde (i) dicho SolB1 es al menos un primer monómero de silicato seleccionado del grupo que consiste en metiltrietoxisilano (MTES), etiltrietoxisilano (ETrEOS), silicato sódico, ortosilicato de tetrametilo (TMOS), ortosilicato de tetraetilo (TEOS) y tetrametoxisilicato (TMS);

40 en donde (ii) dicho SolB2 es al menos un segundo monómero de silicato seleccionado del grupo que consiste en 3-aminotrimetoxisilano (3-ATMS), diglicerilsilano (DGS), trimetoxisilicato de metilo (MTMS), poli(silicato de glicerilo) (PGS), poli(acetato de vinilo), polivinilpirrolidona, metacrilato de glicerilo, acrilato de hidroxietilo, carbonato de N,N-dicusinimidilo (DSC), 1,3,5-trimetilbenzocloruro de cetiltrimetilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio, anhídrido (trietoxisilil)propilsuccínico, N-(3-trietoxisililpropil)-4-hidroxitilamida (SIT8189.5), N-(trietoxisililpropil)gluconamida (SIT8189.0), pluronic L121 e hidróxido de tetrametilamonio;

45 en donde (iii) dicho SolB3 es al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en aminopropiltrietoxisilano (APTES), 3-glicidoxipropiltrietoxisilano (GPTMOS), N-trietoxisililpropil-O-poli(etileno)uretano (PEOU), glicerol, PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 y PEG8000;

50 en donde (iv) dicha solución SolBH es al menos una solución seleccionada del grupo que consiste en HCl, H₂SO₄, HNO₃ y CH₃COOH, que tiene una concentración que varía de 1 mM a 100 mM; y

en donde (v) dicha solución SolBS es al menos una solución seleccionada del grupo que consiste en NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ y Na₃PO₄, que tiene una concentración que varía de 1 mM a 100 mM.

55 En la presente invención, el sustrato se puede optimizar a una temperatura superior al punto de rocío antes de su uso, y "una temperatura superior al punto de rocío" es una temperatura superior a la temperatura a la que se forma el rocío, y la temperatura se puede variar dependiendo de la condición de humedad, por ejemplo, el punto de rocío es 8,6°C cuando la temperatura de la atmósfera es 20°C y la humedad relativa es mayor de 50%, en general, la temperatura es 14~17°C cuando la humedad es 70~80%.

60 Al hacer esto, cuando las soluciones se distribuyen secuencialmente sobre el sustrato, la velocidad de gelificación de la composición en estado de sol se puede retrasar, con lo que se puede facilitar la formación de puntos, se puede evitar la separación de los puntos después de la gelificación y se puede facilitar la formación de microcanales en el chip.

65 Según el método de la presente invención, después de que se haya distribuido la composición en estado de sol, el

SolBH (solución I) seleccionado del grupo que consiste en HCl, H₂SO₄, HNO₃ y CH₃COOH se distribuye sobre la misma. La solución I sirve para formar un ambiente de pH en el que se induce la gelificación de la composición en estado de sol. La concentración de dicho HCl, H₂SO₄, HNO₃ o CH₃COOH es preferiblemente 5-30 mM. La solución I sirve para ajustar el pH de la composición en estado de sol hasta 1-3.

Finalmente, la solución II, que comprende el tampón SolBS, la proteína detectora y agua destilada, se distribuye sobre el sustrato y las soluciones distribuidas se gelifican.

En la presente invención, el tampón SolBS es tampón de fosfato sódico que tiene un pH que varía de 3 a 8.

El tampón y el agua doblemente destilada tienen la función de prevenir la descomposición de un biomaterial (p. ej., una proteína). A un pH fuera de un intervalo de pH adecuado, es probable que un biomaterial disminuya su actividad o se descomponga, y la gelificación del sol es más lenta a pH superior y más rápida a pH inferior. Por esta razón, es importante ajustar el pH de la composición en estado de sol de modo que la gelificación de la composición se pueda realizar durante un tiempo adecuado mientras se evita la disminución en la actividad del biomaterial y la descomposición del biomaterial. En general, un biomaterial está presente establemente a un pH que varía de 5 a 8 y, por esta razón, el tampón se usa para evitar que el biomaterial se descomponga debido a un ambiente de pH provocado por la solución I. El tampón que se puede usar en la presente invención no está limitado específicamente y puede ser seleccionado adecuadamente por un experto normal en la técnica dependiendo del biomaterial que se añada. En un Ejemplo de la presente invención, se usó como el tampón un tampón de fosfato sódico que tenía un pH que variaba de 3 a 8. Además, según se usa en la presente, el término "material biológico que interactúa con un material biológico o biomaterial elegido" se refiere a un material biológico que puede interactuar con un material elegido (p. ej., una proteína elegida), y ejemplos del mismo incluyen ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, materiales de bajo peso molecular, células y similares. A fin de incorporar este material biológico que interactúa con un material biológico o biomaterial elegido en la solución II, se puede usar un tampón adecuado. A saber, un biomaterial de interés se añade a una solución tamponadora para formar una solución de muestra para detección. Por ejemplo, si el biomaterial es una proteína, se puede usar tampón de PBS (solución salina tamponada con fosfato) y, si existe una reacción enzimática, si es necesario, HEPES, NaCl, EDTA y similares se pueden usar en diferentes concentraciones. En un Ejemplo de la presente invención, se usó un anticuerpo derivado de un paciente de HIV1 (virus de inmunodeficiencia humana 1) como el material biológico elegido (proteína elegida), y se usó como la proteína detectora una solución de cinco marcadores antigénicos (capaces de unirse al anticuerpo de HIV) en tampón de PBS.

En la presente invención, la relación en volumen de tampón SolBS:agua destilada:un material biológico que interactúa con el material biológico elegido en la solución II está preferiblemente entre 1:2:1 y 2:5:1 y lo más preferiblemente 1:2:1. Por ejemplo, la solución II puede comprender, basándose en el volumen total de la solución II, aproximadamente 20-30% en volumen de tampón, aproximadamente 40-60% en volumen de agua destilada y aproximadamente 20-30% en volumen de la proteína detectora. En un Ejemplo de la presente invención, se usó como solución II una mezcla de 10 µl de tampón, 20 µl de agua destilada y 10 µl de una solución que contiene proteína detectora.

La presente invención se caracteriza por que la composición en estado de sol, la solución I y la solución II se distribuyen secuencialmente en cantidades exactas, fabricando de ese modo un chip proteínico uniforme.

En la presente invención, la relación de las cantidades de composición en estado de sol:solución I:solución II que se distribuyen puede estar entre 3:1:4 y 1:2:8, y es preferiblemente 3:1:4. Por ejemplo, la composición en estado de sol se distribuye preferiblemente en una cantidad de 25-35 µl, y lo más preferiblemente aproximadamente 30 µl. Además, la solución I se distribuye preferiblemente en una cantidad de 5-15 µl y lo más preferiblemente aproximadamente 10 µl. Además, la solución II se distribuye preferiblemente en una cantidad de 35-45 µl y lo más preferiblemente aproximadamente 40 µl.

En el método para preparar el biochip según la presente invención, la composición en estado de sol, la solución I y la solución II se mezclan entre sí y a continuación se distribuyen sobre un sustrato. En este caso, preferiblemente, se realiza una técnica de punteado manual usando una pipeta u otra herramienta o se usa un robot sin contacto.

En la presente invención, el método no tiene un procedimiento de pretratamiento. El procedimiento de pretratamiento puede ser uno o más seleccionados del grupo que consiste en (i) un procedimiento de mezclado de SolB1, SolB2, SolB3, SolBH, SolBS o material biológico que interactúa con un material biológico elegido; (ii) un procedimiento de turbulencia de la solución mezclada de (i); y (iii) un procedimiento de estabilización de la solución mezclada de (i) o (ii).

En la presente invención, los SolB1, SolB2, SolB3, SolBH, SolBS y el material biológico que interactúa con un material biológico elegido pueden estar contenidos en el recipiente antes de la distribución, y la distribución se puede realizar succionando a través de la tobera.

En la presente invención, los SolB1, SolB2, SolB3, SolBH, SolBS y el material biológico que interactúa con un

material biológico elegido pueden estar contenidos en un cartucho de producción en masa que conecta con la tobera de distribución, y la cantidad de distribución puede ser más de 100 veces comparada con la distribución mediante un procedimiento de succión a través de una tobera, así el método es capaz de conseguir una producción en masa.

5 Cuando la composición en estado de sol, la solución I y la solución II se distribuyen secuencialmente directamente sobre un sustrato sin un procedimiento de pretratamiento a fin de fabricar un chip, la distribución se puede realizar usando un robot que permita que la composición en estado de sol, las soluciones I y II se distribuyan en cantidades exactas. A este respecto, como el robot se puede usar para distribuir la composición en estado de sol, la solución I y la solución II en volúmenes exactos, preferiblemente se usa un robot sin contacto.

10 Los robots se dividen, según el método para disponer en forma de matriz un material detector sobre un biochip, en un 'robot de contacto' y un 'robot sin contacto'. El robot de contacto dispone en forma de matriz una proteína detectora sobre la superficie del chip usando, por ejemplo, una aguja que tiene un espacio muy estrecho en la misma. En este método, una solución que contiene la proteína detectora fluye poco a poco de la aguja y se dispone en forma de matriz sobre la superficie del chip mientras entra en contacto directo con la superficie del chip. Este método tiene una ventaja en que puede disponer en forma de matriz una variedad de proteínas detectoras en un tiempo corto, pero no puede controlar exactamente el volumen de solución, y así se puede reducir la uniformidad del chip resultante. Por otra parte, el robot sin contacto es un método para disponer en forma de matriz proteínas detectoras sobre la superficie del chip sin contacto directo al poner una solución que contiene proteína detectora en un tubo fino, poner el tubo justo por encima de la superficie del chip y aplicar cierta presión al mismo. Este método tiene una ventaja en que el volumen de solución que se distribuye se puede determinar exactamente. Según esto, cuando la composición en estado de sol, la solución I y la solución II se distribuyen secuencialmente sin un procedimiento de pretratamiento a fin de fabricar un chip, el robot sin contacto hace posible controlar el volumen de cada solución, que se distribuye, hasta un volumen predeterminado. Por lo tanto, en la presente invención, se usa preferiblemente este robot sin contacto.

15 La composición en estado de sol, la solución I seleccionada del grupo que consiste en HCl, H₂SO₄, HNO₃ y CH₃COOH y la solución II (una solución de mezcla del material biológico que interactúa con el material biológico elegido, tampón y agua destilada) se pueden distribuir secuencialmente sobre una placa de pocillos de sustrato usando el robot sin contacto que permite que estos componentes se distribuyan en volúmenes exactos. Cuando se distribuye otra solución sobre puntos pequeños que se han distribuido sobre la superficie, la solución formará conformaciones puntuales sin extenderse debido a la tensión superficial de la solución. En este momento, la energía superficial que se produce cuando la solución cae se convertirá en vibración, con lo que el flujo (convección) de material se produce en los puntos de modo que las dos soluciones se mezclarán fácilmente entre sí. Usando este principio, los presentes inventores han diseñado un método automatizado para fabricar un chip de sol-gel punteando directamente materiales sobre la superficie del chip sin pretratar los materiales.

20 Por ejemplo, se puede usar un microrrobot (disponible comercialmente de Scienion AG). Particularmente, el uso de la tecnología de control del punto de rocío (Scienion AG) hace posible minimizar la incertidumbre de la concentración resultante de la humedad sobre la superficie de la placa, fabricando así puntos que tienen un volumen y un tamaño más exactos. En un Ejemplo de la presente invención, se usó como el robot sciFLEXARRAYER S11 (Scienion AG, Alemania).

25 A saber, en la presente invención, el microrrobot sin contacto se usa en la fabricación del biochip, con lo que el biochip se puede fabricar de un modo más cómodo al distribuir un volumen exacto de cada solución sobre un sustrato, y se puede fabricar un biochip más uniforme, debido a que no se requiere un procedimiento de pretratamiento de premezcladura de un monómero de tipo sol-gel, un tampón, una muestra de proteína detectora y similares, a diferencia del método convencional.

30 Mientras, el sustrato que se usa en la presente invención tiene la propiedad de ser transparente después de que la composición en estado de sol se haya gelificado y, por esta razón, la placa de pocillos de sustrato o el portaobjetos están hechos preferiblemente de un material que pueda mantener buena transparencia. Por ejemplo, el sustrato puede estar hecho de un material plástico, tal como poli(metacrilato de metilo) (PMMA) muy transparente, silicio o vidrio.

35 Además, la superficie del sustrato que se usa en la presente invención se usa después de un tratamiento superficial de modo que la solución en estado de sol mezclada se pueda fijar al sustrato cuando se gelifica. Un requisito importante del biochip de la presente invención es que la solución en estado de sol mezclada se fije fuertemente al sustrato cuando se gelifica de modo que los puntos no se liberen cuando estos se dejan reaccionar con una solución que contiene un material elegido. Por esta razón, en el análisis del material elegido usando el biochip, se requiere un procedimiento de lavado intensivo después de la reacción con material elegido, y así, a fin de soportar esta fuerza física, es esencial una fijación fuerte de los puntos. Con este propósito, es preferible usar un sustrato de plástico cuya superficie no se haya tratado, un sustrato de plástico cuya superficie se haya tratado con plasma, un sustrato de vidrio cuya superficie no se haya tratado, un sustrato de vidrio cuya superficie se haya tratado (p. ej., un sustrato de vidrio mordentado) o un chip de silicio que tenga una estructura porosa.

En la presente invención, una superficie del sustrato se puede pretratar con plasma. Por otra parte, el sustrato de la presente invención se puede mordentar o tratar por adelantado con PDMS o un monómero de silicato o un material polimérico.

5 Cuando se usa el robot en la fabricación del biochip según la presente invención, se deben prestar las siguientes atenciones.

10 En primer lugar, debido a que el biochip se prepara usando un material especial (sol) y tiene la propiedad de gelificarse con el paso del tiempo, a diferencia de un chip de DNA, es muy importante distribuir el sol usando el robot en el tiempo más corto posible a fin de evitar que el sol se gelifique durante la distribución.

15 En segundo lugar, la humedad y la temperatura son factores importantes. Debido a que la velocidad de gelificación y la actividad de los puntos formados sobre el sustrato están determinadas por la humedad y la temperatura de un ambiente en el que se forman los puntos, la humedad y la temperatura iniciales son muy importantes. Así, en la fabricación del biochip usando la solución de sol-gel, es muy importante presentar la temperatura y la humedad que rodean al robot.

20 En la presente invención, la humedad a la que se lleva a cabo el procedimiento de disposición en forma de matriz es aproximadamente 50% o más, y más particularmente 70-80%, y la temperatura preferida a la que se lleva a cabo el procedimiento de disposición en forma de matriz es aproximadamente 25°C o menos, y más particularmente 10-25°C (temperatura ambiente). Particularmente, debido a que la alta humedad inicial es un factor importante en la gelificación de puntos, la humedad se debe fijar en aproximadamente 80% antes de la disposición en forma de matriz. Además, si la temperatura es 25°C o superior, es probable que el sol se gelifique rápidamente y, por esta razón, el procedimiento de disposición en forma de matriz se lleva a cabo preferiblemente a la temperatura más baja posible.

25 Como se describe anteriormente, después de que la temperatura y la humedad se hayan fijado y se haya preparado un programa que permita una rápida disposición en forma de matriz, las soluciones se distribuyen en orden.

30 En la presente invención, el material biológico que interactúa con un material biológico elegido es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en un ácido nucleico, una proteína, un péptido, un material de bajo peso molecular y una célula.

35 También se describe un estuche para la preparación de un biochip, incluyendo el estuche: un primer recipiente que contiene al menos un primer monómero de silicato, SolB1, seleccionado del grupo que consiste en metiltrietoxisilano (MTES), etiltrietoxisilano (ETREOS), silicato sódico, ortosilicato de tetrametilo (TMOS), ortosilicato de tetraetilo (TEOS) y tetrametoxisilicato (TMS); un segundo recipiente que contiene al menos un segundo monómero de silicato, SolB2, seleccionado del grupo que consiste en 3-aminotrimetoxisilano (3-ATMS), diglicerilsilano (DGS),
40 trimetoxisilicato de metilo (MTMS), poli(silicato de glicerilo) (PGS), poli(acetato de vinilo), polivinilpirrolidona, metacrilato de glicerilo, acrilato de hidroxietilo, carbonato de N,N-dicusinimidilo (DSC), 1,3,5-trimetilbenceno, cloruro de cetiltrimetilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio, anhídrido (trietoxisilil)propilsuccínico, N-(3-trietoxisililpropil)-4-hidroxi-butilamida (SIT8189.5), N-(trietoxisililpropil)gluconamida (SIT8189.0), pluronic L121 e hidróxido de tetrametilamonio; un tercer recipiente que contiene al menos un aditivo, SolB3, seleccionado del grupo que consiste
45 en aminopropiltriethoxisilano (APTES), 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMOS), N-trietoxisililpropil-O-poli(etileno)idoureto (PEOU), glicerol, PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 y PEG8000; un cuarto recipiente que contiene SolBH seleccionado del grupo que consiste en HCl, H₂SO₄, HNO₃ y CH₃COOH; y un quinto recipiente que contiene una solución tamponadora, SolBS,

50 en donde SolBH seleccionada del grupo que consiste en HCl, H₂SO₄, HNO₃ y CH₃COOH, una solución tamponadora, SolBS, agua destilada y un biomaterial que interactúa con un biomaterial elegido se añaden secuencialmente a una composición en estado de sol que consiste en SolB1, SolB2 y SolB3 de modo que la composición en estado de sol se gelifique.

55 El material de los recipientes no está limitado. El estuche puede tomar la forma de botellas, cubetas, bolsitas, sobres, tubos, ampollas y similares, que pueden estar formados en parte o totalmente de plástico, vidrio, papel, papel metalizado, cera y similares. Los recipientes para el sensor pueden estar equipados con una tapa totalmente o parcialmente liberable que inicialmente puede ser parte del recipiente o se puede fijar al recipiente por medios mecánicos, adhesivos u otros. El estuche puede comprender un envase exterior que puede incluir instrucciones
60 relativas al uso de los componentes.

También se describe un método para analizar un biomaterial elegido usando el biochip preparado según dicho método de preparación.

65 Más específicamente, se describe un método para analizar un material biológico elegido, comprendiendo el método una etapa de adición de una muestra, que contiene el material biológico elegido capaz de interactuar con un

biomaterial que interactúa con el material biológico elegido que se va a detectar, a un biochip preparado según dicho método de preparación.

Después de que se haya preparado como se describe anteriormente, el chip proteínico que se va a dejar reaccionar con el material biológico elegido, se deja reaccionar con una solución que contiene el material biológico elegido. La solución de reacción se usa preferiblemente en una cantidad de 50 ~ 100 µl en el caso de un chip de 96 pocillos, y el tiempo de reacción es preferiblemente aproximadamente 1 hora. El material biológico elegido que interactúa con un material biológico que interactúa con un material biológico elegido también es un material biológico, y ejemplos del material biológico pueden incluir ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, materiales de bajo peso molecular y células.

La solución de reacción que contiene el material biológico elegido penetra en los puntos a través de las estructuras microporosas de los puntos e interactúa y se une con la proteína fijada en las estructuras encapsuladas (1ª incubación). Después de la reacción, a fin de analizar el material biológico elegido que se unió al material biológico que interactúa con biomaterial elegido en los puntos, el material biológico elegido se puede dejar reaccionar con una proteína marcadora para detectar el material biológico elegido. En un Ejemplo de la presente invención, se usó un colorante fluorescente (Cy3) conjugado frente a la proteína elegida (2ª incubación). A este respecto, el tiempo de reacción se fija en 30 minutos, y la cantidad de la solución de reacción se fija en 50-100 µl. Los procedimientos de incubación 1ª y 2ª anteriores se llevan a cabo todos a temperatura ambiente. Si la solución de reacción que contiene el material biológico elegido es una mezcla que contiene diversos materiales, se puede llevar a cabo un procedimiento de bloqueo antes del 1º procedimiento de incubación a fin de evitar la unión no específica al material biológico que interactúa con un material biológico elegido contenido en el chip proteínico. En este procedimiento de bloqueo, se puede usar una solución de bloqueo tal como leche desnatada, BSA (albúmina de suero bovino) o IgG.

Después de cada uno de los procedimientos de incubación 1º y 2º, se lleva a cabo un procedimiento de lavado usando un tampón de lavado convencional. En un Ejemplo de la presente invención, se usó tampón de PBS que contenía 0,2% de Tween-20. En el procedimiento de lavado, se usa un lavador para ELISA. El 1º procedimiento de lavado se repite 4 veces, y el 2º procedimiento de lavado se repite 4 veces. Después de que se haya llevado a cabo el procedimiento de lavado, se lleva a cabo un procedimiento de secado hasta que la solución se retire completamente de cada pocillo.

Después de que termine el procedimiento de secado, si se produce una reacción real se puede examinar al explorar el pocillo en el que se ha producido la reacción, usando un escáner de imágenes que puede detectar el colorante fluorescente. Además, el grado de la reacción se puede examinar al medir la oscuridad de la imagen usando un software. A saber, el método de la invención para analizar el material biológico elegido comprende adicionalmente una etapa de permitir que el material elegido reaccione con un biomaterial, tal como una proteína o un adaptámero marcado con un isótopo radiactivo, un colorante fluorescente u otras sustancias marcadoras. Según se usa en la presente, el término "adaptámero" se refiere a un oligonucleótido monocatenario pequeño que se puede unir específicamente al material biológico que interactúa con un material biológico elegido con una gran afinidad.

Además, se describe un estuche de detección que comprende un biochip preparado mediante dicho método de preparación.

El estuche para la detección de un material biológico detector puede tomar la forma de botellas, cubetas, bolsitas, sobres, tubos, ampollas y similares, que pueden estar formados en parte o totalmente de plástico, vidrio, papel, papel metalizado, cera y similares. Los recipientes para el sensor pueden estar equipados con una tapa totalmente o parcialmente liberable que inicialmente puede ser parte del recipiente o se puede fijar al recipiente por medios mecánicos, adhesivos u otros. El estuche puede comprender un envase exterior que puede incluir instrucciones relativas al uso de los componentes

Posteriormente, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a ejemplos. Sin embargo, se ha de entender que estos ejemplos tienen solamente propósitos ilustrativos y no se debe considerar que limiten el alcance de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de cada solución constitutiva para preparar un biochip

Se mezclaron entre sí 20 µl de SolB1, 6 µl de SolB2 y 4 µl de SolB3, cada uno de los cuales se ha seleccionado de los componentes mostrados en la Tabla 1 posterior, para preparar una composición en estado de sol. Como solución I, se prepararon 10 µl de SolBH.

[Tabla 1]

Componentes de cada solución

Clasificación	Componentes
SolB1	Al menos un primer monómero de silicato seleccionado del grupo que consiste en metiltrietoxisilano (MTES), etiltrietoxisilano (ETREOS), silicato sódico, ortosilicato de tetrametilo (TMOS), ortosilicato de tetraetilo (TEOS) y tetrametoxisilicato (TMS)
SolB2	Al menos un segundo monómero de silicato seleccionado del grupo que consiste en 3-aminotrimetoxisilano (3-ATMS), diglicerilsilano (DGS), trimetoxisilicato de metilo (MTMS), poli(silicato de glicerilo) (PGS), poli(acetato de vinilo), polivinilpirrolidona, metacrilato de glicerilo, acrilato de hidroxietilo, carbonato de N,N-dicusinimidilo (DSC), 1,3,5-trimetilbenceno, cloruro de cetiltrimetilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio, 3-anhídrido (trietoxisilil)propilsuccínico, N-(3-trietoxisililpropil)-4-hidroxiutilamida (SIT8189.5), N-(trietoxisililpropil)gluconamida (SIT8189.0), pluronic L121 e hidróxido de tetrametilamonio
SolB3	Al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en aminopropiltrietoxisilano (APTES), 3-glicidoxipropiltrietoxisilano (GPTMOS), N-trietoxisililpropil-O-polietilenoimidocarbodiimato (PEOU), glicerol, PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 y PEG8000.
SolBH	Al menos uno seleccionado del grupo que consiste en HCl, H ₂ SO ₄ , HNO ₃ y CH ₃ COOH

5

Mientras tanto, se mezclaron entre sí 10 µl de al menos SolBS seleccionado del grupo que consiste en NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ y Na₃PO₄ y 20 µl de agua doblemente destilada (DDW), mientras que 10-200 ng de cada una de cinco proteínas detectoras (p24, p31, gp41, gp120 y gp160) capaces de interactuar con anticuerpo para HIV1 se mezclaron con tampón de PBS para preparar 10 µl de una solución de muestra. La solución de muestra se añadió a la mezcla, que a continuación se sometió a turbulencia durante 5 segundos y se centrifugó para preparar la solución II.

10

[Tabla 2] Componentes de la composición en estado de sol, la solución I, la solución II y las proteínas detectoras

15

	Componentes
Composición en estado de sol	20 µl de SolB1 6 µl de SolB2 y 4 µl de SolB3
Solución I	10 µl de SolBH
Solución II	10 µl de SolBS y 20 µl de DDW 10 µl de solución de PBS que contiene cinco tipos de antígenos de HVI

Ejemplo 2: Fabricación de un biochip

20

(1) Preparación de una placa de pocillos de sustrato

Una placa de 96 pocillos disponible comercialmente hecha de PMMA, cuya superficie se ha tratado con plasma, se adquirió de SPL Co., Ltd. (Corea).

25

(2) Fabricación de un biochip (chip proteínico)

30

Para fabricar un chip proteínico, un robot se ajustó a una temperatura de 16°C y una humedad de 80%, y, como una placa de pocillos fuente a la que se iba a añadir la solución en estado de sol mezclada obtenida en el Ejemplo 1, se preparó una placa de 384 pocillos general y, como una placa de pocillos elegida como objetivo, se preparó una placa de 96 pocillos hecha de PMMA, preparada en la sección (1) anterior. Además, se preparó un robot sciFLEXARRAYER S11 (Scienion, Alemania) que distribuye un volumen exacto predeterminado.

35

A continuación, 30 µl de la composición en estado de sol preparada al mezclar 20 µl de SolB1, 6 µl de SolB2 y 4 µl de SolB3 en el Ejemplo 1, 10 µl de SolBH (solución I) y 40 µl de solución II se añadieron a la placa fuente del robot sciFLEXARRAYER S11 (Scienion, Alemania).

40

Volúmenes predeterminados de la composición en estado de sol, la solución I y la solución II se distribuyeron secuencialmente en la placa de 96 pocillos preparada hecha de PMMA. Estas soluciones se distribuyeron en una cantidad de 450 pl o menos por punto usando una tobera PDC90 (ScienionAG, Alemania). La frecuencia de punteado se graduó a 500 Hz. El tamaño de los puntos formados era aproximadamente 300 µm (8 gotas por punto).

45

La FIG. 6 muestra una fotografía (A) obtenida al escanear con un escáner Axon GenePix (Axon) a 532 nm y una imagen fotográfica (B) obtenida usando sciFLEXARRAYER equipado con una cámara. La distancia (paso de gota) entre los puntos en el chip proteínico era 600 µm.

Ejemplo comparativo 1: Comparación de la uniformidad con un chip proteínico convencional

El chip proteínico según la presente invención se comparó con un chip proteínico convencional a fin de examinar si el chip proteínico de la presente invención tiene una uniformidad muy alta en comparación con el chip proteínico convencional.

En primer lugar, como un control, se fabricó un chip proteínico según un método convencional conocido. Un monómero de silicato, HCl, DW, SP y una solución de muestra se mezclaron en orden, y la solución mezclada se distribuyó en una placa fuente usando un robot de agujas y se punteó en una placa de 96 pocillos hecha de PMMA. Como el robot de agujas, se usó OnmiGrid Accent Arrayer (Genomic Solutions, EE. UU. de A.).

Además, la imagen del chip proteínico fabricado según este método se fotografió con una cámara digital bajo un microscopio, y la imagen fotográfica se comparó con la imagen fotográfica (FIG. 6B) del chip proteínico fabricado según el método de los Ejemplos 1 y 2 de la presente invención.

Como resultado, como se puede observar en la FIG. 8, en el caso del chip proteínico de la invención fabricado al usar la composición en estado de sol específica y distribuir la solución I y la solución II secuencialmente sin un procedimiento de pretratamiento de las soluciones de mezcladura I y II, la conformación y el tamaño de los puntos eran constantes, pero en el caso del chip proteínico fabricado según el método convencional, la conformación o el tamaño de los puntos no era constante. Esto sugiere que el chip proteínico según la presente invención tiene una uniformidad significativamente alta en comparación con el chip proteínico convencional.

Ejemplo comparativo 2: Comparación con el caso en el que se cambiaba el orden de mezcladura

La mezcla en estado de sol obtenida al mezclar las soluciones en el orden de mezcladura según la presente invención se comparó con una mezcla en estado de sol obtenida al mezclar las soluciones en un orden diferente al orden de mezcladura de la presente invención.

Según el orden de mezcladura de la presente invención, se añadieron secuencialmente SolBH, SolBS, agua destilada y tampón a la composición en estado de sol que consistía en SolB1, SolB2 y SolB3 para preparar una mezcla. Para comparación, se preparó una mezcla del mismo modo, excepto que finalmente se añadió SolBH. Las dos mezclas se fotografiaron con una cámara digital y las fotografías se compararon entre sí.

Como resultado, como se puede observar en la FIG. 9, cuando la mezcla se preparaba según el orden de mezcladura de la presente invención, las soluciones se mezclaban fácilmente entre sí, y así eran claras y no se gelificaban durante mucho tiempo (FIG. 9A), pero cuando la mezcla se preparaba según el orden de mezcladura diferente, las soluciones no se mezclaban fácilmente entre sí y se gelificaban rápidamente (FIG. 9B).

Ejemplo 3: Análisis y diagnóstico de HIV usando un chip proteínico

El chip proteínico fabricado en el Ejemplo 2 se bloqueó usando solución de leche desnatada al 10%, después de lo cual se añadieron a cada pocillo del chip 50 µl de suero de paciente de HIV diluido y se incubaron primariamente a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de terminar la incubación primaria, el suero se retiró y una etapa de someter a turbulencia el chip con tampón de lavado que contenía 0,2% de Tween-20 en un lavador para ELISA durante 5 minutos se repitió 4 veces (primer lavado). Después de terminar el primer lavado, 50 µl de una dilución de anticuerpo humano que reconoce anticuerpo Cy3 humano β (Jackson ImmunoResearch) se añadieron al chip que a continuación se incubó secundariamente a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de terminar la incubación secundaria, el Cy3 humano β se retiró, y una etapa de someter a turbulencia el chip con una solución de lavado en un lavador para ELISA durante 5 minutos se repitió 4 veces (segundo lavado).

Después del final del segundo lavado, cada pocillo se secó dejándolo reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos o más, y los puntos en los que se ha producido la reacción se escanearon con el escáner de imágenes láser FUJI FLA-9000. Además, la intensidad de una señal fluorescente en cada punto en que se ha producido la reacción se midió usando el programa de análisis de imágenes ImageQuant TL, cuantificando de ese modo la reacción y analizando el grado de la reacción.

Como se muestra en la FIG. 2, los cinco marcadores (p24, p31, gp41, gp120 y gp160; Abcam Co., Ltd., Fitzgerald Co., Ltd.) mostraban respuestas al suero del paciente, y el chip de control negativo que no contenía marcador antigénico no mostraba respuesta.

La FIG. 3 muestra los resultados obtenidos al diluir en serie los 4 antígenos (p24, p31, gp41, gp120) que reaccionaban más activamente entre los cinco antígenos y un antígeno de HIV1 tipo O, punteando cada una las diluciones en cada pocillo y permitiendo que la dilución reaccionara con un suero estándar de HIV. Como se esperaba, se podía observar que la cuantificación de la reacción se alcanzaba correctamente. Los resultados anteriores indican que la reacción antígeno-anticuerpo en el chip proteínico fabricado en la presente invención se produce específicamente.

La FIG. 4 muestra los resultados de cuantificar una respuesta al suero estándar de HIV1 en puntos que contienen cada uno de los cinco tipos de antígenos. El eje X de la FIG. 4 indica un título cuando el HIV del suero estándar se diagnosticaba con un estuche de diagnóstico de ELISA convencional y, como se puede observar en la FIG. 4, los resultados de análisis obtenidos usando el chip proteínico de la presente invención tienen correlación con los resultados de análisis obtenidos usando el chip de diagnóstico convencional. El PRB204-00 en el eje X era una muestra de suero estándar del paciente adquirida de Bostonbiomedica, Inc. El nombre del producto era Anti-HIV1 mixed titer performance panel y el número de serie era PRB204(M). El valor del título es el valor s/co detectado por el estuche de diagnóstico convencional y el valor es una relación de señal a límite (valor estándar de positivo y negativo) y, cuando el valor es mayor que 1, el resultado se juzga positivo. El eje Y de la FIG. 4 indica la intensidad ("señal") de una señal fluorescente en los puntos, dividida por la intensidad ("control") de una señal fluorescente en los puntos de control negativos.

La FIG. 5 es una tabla que muestra una respuesta a paneles de seroconversión recogidos de un paciente infectado con HIV en diversos días, en comparación con el estuche de diagnóstico convencional. El suero del paciente es una muestra estándar adquirida de Bostonbiomedica, Inc. El resultado de detección usando el estuche de diagnóstico convencional también se proporcionó junto con la muestra estándar. El nombre de la muestra era Anti-HIV1 seroconversion panel V y el número de serie era PRB922.

Como se puede observar en la presente, unos pocos días después de la infección con HIV, el estuche de diagnóstico de ELISA convencional no podía detectar la infección por HIV, pero el chip proteínico de la presente invención podía detectar la infección por HIV incluso en la fase inicial de la infección, como el estuche de detección de antígeno.

Esto sugiere que el biochip de la presente invención tiene una sensibilidad significativamente alta en comparación con el estuche de ELISA de diagnóstico por anticuerpos convencional.

Ejemplo 4: Sustitución del método de inmunotransferencia por un chip proteínico

El método de inmunotransferencia e inmunotinción es una técnica para encontrar una proteína específica en una mezcla de diversas proteínas y es un método para detectar la presencia de una proteína específica al provocar una reacción antígeno-anticuerpo usando un anticuerpo contra la proteína que se va a encontrar.

En general, un procedimiento para encontrar una proteína específica mediante inmunotransferencia comprende someter a electroforesis a una mezcla de proteínas sobre SDS-gel de poliacrilamida para separar la mezcla según el tamaño, transferir la proteína a una membrana de nitrocelulosa o nailon y encontrar un antígeno contra un anticuerpo específico usando una reacción antígeno-anticuerpo sobre la membrana a la que se ha transferido la proteína. El anticuerpo que se usa en el procedimiento se marca con un isótopo radiactivo o se conjuga con una enzima específica (p. ej., peroxidasa de rábano picante) o un colorante fluorescente, y así hace posible visualizar la proteína que se va a encontrar.

Cuando se usaba el chip proteínico preparado en el Ejemplo 2 en lugar la inmunotransferencia que comprende etapas complejas, una proteína específica en una mezcla de proteínas se podía encontrar de un modo fácil y simple al inmovilizar la mezcla de proteínas y a continuación ensayar la mezcla de proteínas con un anticuerpo conjugado a un colorante fluorescente.

Además, debido a que la electroforesis de una proteína se lleva a cabo generalmente en un estado reducido, se deja que la proteína se una a un anticuerpo en un estado desnaturalizado. Si un anticuerpo específico sólo reconoce la forma natural de la proteína, la proteína no se puede encontrar mediante una inmunotransferencia general. Sin embargo, el chip proteínico de sol-gel según la presente invención hace posible inmovilizar una proteína en una forma natural, indicando que el chip de la presente invención es más útil.

Los siguientes experimentos se realizaron usando el chip de sol-gel preparado en el Ejemplo 2.

(1) Experimento de comparación según la forma natural y la forma desnaturalizada de p24

(i) En primer lugar, se llevó a cabo un experimento usando un anticuerpo que se une sólo a la forma natural sin unirse a la forma desnaturalizada. Como resultado, no aparecía una banda en la inmunotransferencia, y el anticuerpo sólo era positivo en el chip de sol-gel.

(ii) Se llevaron a cabo análisis por inmunotransferencia y análisis con el chip proteínico de sol-gel usando un anticuerpo contra el mismo antígeno pero que se une a la forma desnaturalizada. Como resultado, el anticuerpo era positivo tanto en la inmunotransferencia como en el chip de sol-gel.

Esto sugiere que el chip de sol-gel según la presente invención puede detectar las formas tanto desnaturalizada como natural.

(2) Experimento usando extracto en bruto de E. coli en el que se ha expresado proteína p24

(i) Extracto en bruto de E. coli en el que se ha expresado proteína p24 se fijó al chip proteínico de sol-gel a diversas concentraciones (Lisados 1, 2 y 3), y a continuación se ensayó con un anticuerpo contra la proteína expresada. Como resultado, el anticuerpo era positivo en el chip proteínico de sol-gel (FIG. 10).

(ii) Extracto en bruto de E. coli (N) en el que no se ha expresado una proteína se fijó al chip proteínico de sol-gel y a continuación se ensayó con el anticuerpo descrito anteriormente. Como resultado, según se muestra en la FIG. 10, el anticuerpo era negativo en el chip proteínico de sol-gel (FIG. 10).

En la FIG. 10, "N" es un control negativo al que se ligaba extracto en bruto de E. coli en el que no se ha expresado una proteína específica, el Lisado 1 es un grupo al que se fijaba extracto en bruto de E. coli en el que se ha expresado una proteína específica en una concentración de 0,09 ug/ul, el Lisado 2 es un grupo al que se fijaba extracto en bruto de E. coli en el que se ha expresado una proteína específica en una concentración de 0,18 ug/ul y el Lisado 3 es un grupo al que se fijaba extracto en bruto de E. coli en el que se ha expresado una proteína específica en una concentración de 0,27 ug/ul. Además, "P" es un control positivo al que se fijaba material fluorescente Cy3.

(3) (i) Un anticuerpo contra proteína p24 se fijó al chip proteínico de sol-gel a diversas concentraciones, y a continuación se ensayó usando un método de ensayo tipo sándwich con extracto en bruto de E. coli en el que se ha sobreexpresado proteína p24. A continuación, se dejó que el anticuerpo se uniera al chip proteínico y se ensayó. Como resultado, la proteína era positiva al chip de sol-gel (FIG. 11). (ii) Un anticuerpo contra un antígeno que se va a detectar se fijó al chip proteínico de sol-gel en diversas concentraciones, y a continuación se ensayó usando un método de ensayo tipo sándwich con extracto en bruto de E. coli en el que no se ha expresado un antígeno específico. A continuación, se dejó que el anticuerpo se uniera al chip y se ensayó. Como resultado, el anticuerpo era negativo en el chip de sol-gel (FIG. 11).

En la FIG. 11, "N" es un control negativo al que no se fijaba el anticuerpo, y Ab1 y Ab2 se fijaban a diversas concentraciones (0,063 ug/ul y 0,125 ug/ul). Además, "P" es un control positivo al que se fijaba material fluorescente Cy3.

(4) (i) Los antígenos (p24, p31, gp41, gp120 y gp160) contra un anticuerpo para una enfermedad (sida) que se va a detectar se fijaron al chip proteínico de sol-gel, y a continuación se ensayaron con un material (suero positivo) que contenía un anticuerpo específico, tal como un suero de paciente. Como resultado, el anticuerpo era positivo en el chip de sol-gel (FIG. 12).

(ii) Los antígenos contra un anticuerpo que se va a detectar se fijaron al chip de sol-gel, y a continuación se ensayaron con un material (suero negativo) que no contenía anticuerpo específico, tal como suero. Como resultado, el anticuerpo era negativo en el chip de sol-gel (FIG. 12).

Ejemplo 5: Detección de proteína o material específico que se une a un compuesto

Como se muestra en la FIG. 13, un compuesto específico (bisfenol A) se fijó al chip de sol-gel fabricado en el Ejemplo 2. Como un control negativo, solo se fijaba al chip una solución tamponadora que se usaba para disolver el compuesto. Además, el chip se analizó usando un adaptámero de DNA monocatenario marcado con colorante fluorescente (cy3) (PCL, Inc.) capaz de unirse a bisfenol A.

La unión proteína-proteína se puede detectar mediante doble híbrido de levadura o inmunoprecipitación (IP), pero son raros los métodos capaces de detectar fácilmente la unión compuesto-proteína o la unión compuesto-DNA. Como se puede observar en los resultados experimentales anteriores, el chip proteínico fabricado en el Ejemplo 2 puede fijar diversos materiales, incluyendo materiales de bajo peso molecular, tales como compuestos o DNA, proteínas y anticuerpos, y así detectar fácilmente la unión de diversos materiales.

Aplicabilidad industrial

Según se describe anteriormente, cuando el biochip se prepara mediante la gelificación de la composición en estado de sol según la presente invención, la composición en estado de sol que consiste en SolB1, SolB2 y SolB3, SolBH, SolBS, DW y solución tamponadora se mezclan en orden, y a continuación se estabilizan a baja temperatura, con lo que se puede retrasar la velocidad de gelificación de la composición en estado de sol y se puede inducir la gelificación, facilitando así la distribución de la solución de sol y manteniendo la actividad de los puntos. Además, se puede fabricar un biochip uniforme de un modo simple y fácil al puntear soluciones sobre la superficie del sustrato usando un robot sin un procedimiento de pretratamiento de premezcla de las soluciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un biochip mediante la gelificación de una composición en estado de sol, comprendiendo el método las etapas de (a) y (b) en orden secuencial:
- 5 (a) distribuir sobre un sustrato una composición en estado de sol que consiste en SolB1, SolB2 y SolB3 en una forma puntual y distribuir SolBH (solución I) seleccionada del grupo que consiste en HCl, H₂SO₄, HNO₃ y CH₃COOH sobre el sustrato sobre el que se ha distribuido la composición en estado de sol; y
- 10 (b) distribuir la solución II, que comprende el tampón SolBS, un material biológico que interactúa con un material biológico buscado y agua destilada, sobre el sustrato sobre el que se ha distribuido la solución I, y a continuación gelificar las soluciones distribuidas,
- 15 en donde el método no tiene un procedimiento de pretratamiento, que es uno o más seleccionados del grupo que consiste en (i) un procedimiento de mezcla de SolB1, SolB2, SolB3, SolBH, SolBS o un material biológico que interactúa con un material biológico elegido; (ii) un procedimiento de turbulencia de la solución mezclada de (i); y (iii) un procedimiento de estabilización de la solución mezclada de (i) o (ii);
- 20 en donde (i) dicho SolB1 es al menos un primer monómero de silicato seleccionado del grupo que consiste en metiltrietoxisilano (MTES), etiltrietoxisilano (ETrEOS), silicato sódico, ortosilicato de tetrametilo (TMOS), ortosilicato de tetraetilo (TEOS) y tetrametoxisilicato (TMS);
- 25 en donde (ii) dicho SolB2 es al menos un segundo monómero de silicato seleccionado del grupo que consiste en 3-aminotrimetoxisilano (3-ATMS), diglicerilsilano (DGS), trimetoxisilicato de metilo (MTMS), poli(silicato de glicerilo) (PGS), poli(acetato de vinilo), polivinilpirrolidona, metacrilato de glicerilo, acrilato de hidroxietilo, carbonato de N,N-disuccinimidilo (DSC), 1,3,5-trimetilbenceno, cloruro de cetiltrimetilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio, anhídrido 3-(trietoxisilil)propilsuccínico, N-(3-trietoxisililpropil)-4-hidroxibutilamida (SIT8189.5), N-(trietoxisililpropil)gluconamida (SIT8189.0), pluronic L121 e hidróxido de tetrametilamonio; y
- 30 en donde (iii) dicho SolB3 es al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en aminopropiltrimetoxisilano (APTES), 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMOS), N-trietoxisililpropil-O-poli(etileno)oxidouretano (PEOU), glicerol, PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 y PEG8000.
- 35 2. El método según la reivindicación 1, en el que se realiza una técnica de punteado manual sin usar ningún robot o se usa un robot sin contacto.
- 40 3. El método según la reivindicación 1, en el que los SolB1, SolB2, SolB3, SolBH, SolBS y el material biológico que interactúa con un material biológico elegido están contenidos en un recipiente antes de la distribución, y la distribución se realiza al succionar a través de una tobera.
- 45 4. El método según la reivindicación 1, en el que los SolB1, SolB2, SolB3, SolBH, SolBS y el material biológico que interactúa con un material biológico elegido están contenidos en un cartucho de producción en masa que conecta con la tobera de distribución, y la cantidad de distribución es más de 100 veces comparada con la distribuida mediante un procedimiento de succión a través de una tobera, así el método es capaz de alcanzar una producción en masa.
- 50 5. El método según la reivindicación 1, en el que el sustrato está hecho de uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en poli(metacrilato de metilo) (PMMA), plástico, silicio y vidrio.
- 55 6. El método según la reivindicación 1, en el que el material biológico que interactúa con un material biológico elegido es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en un ácido nucleico, una proteína, un péptido, un material de bajo peso molecular y una célula.
7. El método según la reivindicación 1, en el que el sustrato se optimiza a una temperatura superior al punto de rocío antes de su uso, y la segunda solución mezclada se distribuye sobre el sustrato a una humedad mayor de 50%.
8. El método según la reivindicación 1, en el que la relación de las cantidades de la composición en estado de sol:la solución I:la solución II que se distribuyen está entre 3:1:4 y 1:2:8.
- 60 9. El método según la reivindicación 1, en el que el SolBH y el SolBS tienen una concentración que varía de 1 mM a 100 mM.
- 65 10. El método según la reivindicación 1, en el que la relación en volumen de el SolBS:el agua destilada:el material biológico que interactúa con un material biológico elegido en la solución II está entre 1:2:1 y 2:5:1.
11. El método según la reivindicación 1, en el que el tampón SolBS es tampón de fosfato sódico que tiene un pH que

varía de 3 a 8.

12. El método según la reivindicación 1, en el que el sustrato se trata con plasma, se mordenta o se trata con PDMS, monómero de silicato o un material polimérico.

5 13. Un método para preparar un biochip mediante la gelificación de una composición en estado de sol, comprendiendo el método las etapas de (a) y (b) en orden secuencial:

10 (a) añadir a una composición en estado de sol que comprende SolB1, SolB2 y SolB3 una solución de SolBH (solución I) seleccionada del grupo que consiste en HCl, H₂SO₄, HNO₃ y CH₃COOH;

(b) mezclar la solución de la etapa (a) con tampón SolBS y agua destilada, y a continuación estabilizar la solución mezclada a una temperatura que varía de -20°C a 4°C;

15 (c) mezclar la solución estabilizada de la etapa (b) con una solución que contiene un material biológico que interactúa con material biológico elegido, distribuir la solución mezclada sobre un sustrato y gelificar la solución distribuida;

20 en donde (i) dicho SolB1 es al menos un primer monómero de silicato seleccionado del grupo que consiste en metiltrietoxisilano (MTES), etiltrietoxisilano (ETrEOS), silicato sódico, ortosilicato de tetrametilo (TMOS), ortosilicato de tetraetilo (TEOS) y tetrametoxisilicato (TMS);

25 en donde (ii) dicho SolB2 es al menos un segundo monómero de silicato seleccionado del grupo que consiste en 3-aminotrimetoxisilano (3-ATMS), diglicerilsilano (DGS), trimetoxisilicato de metilo (MTMS), poli(silicato de glicerilo) (PGS), poli(acetato de vinilo), polivinilpirrolidona, metacrilato de glicerilo, acrilato de hidroxietilo, carbonato de N,N-disuccinimidilo (DSC), 1,3,5-trimetilbenceno, cloruro de cetiltrimetilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio, anhídrido 3-(trietoxisilil)propilsuccínico, N-(3-trietoxisililpropil)-4-hidroxibutilamida (SIT8189.5) 50%, N-(trietoxisililpropil)gluconamida (SIT8189.0), pluronic L121 e hidróxido de tetrametilamonio; y

30 en donde (iii) dicho SolB3 es al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en aminopropiltrietoxisilano (APTES), 3-glicidoxipropiltrietoxisilano (GPTMOS), N-trietoxisililpropil-O-poli(etileno)oxidouretano (PEOU), glicerol, PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 y PEG8000.

FIG. 1

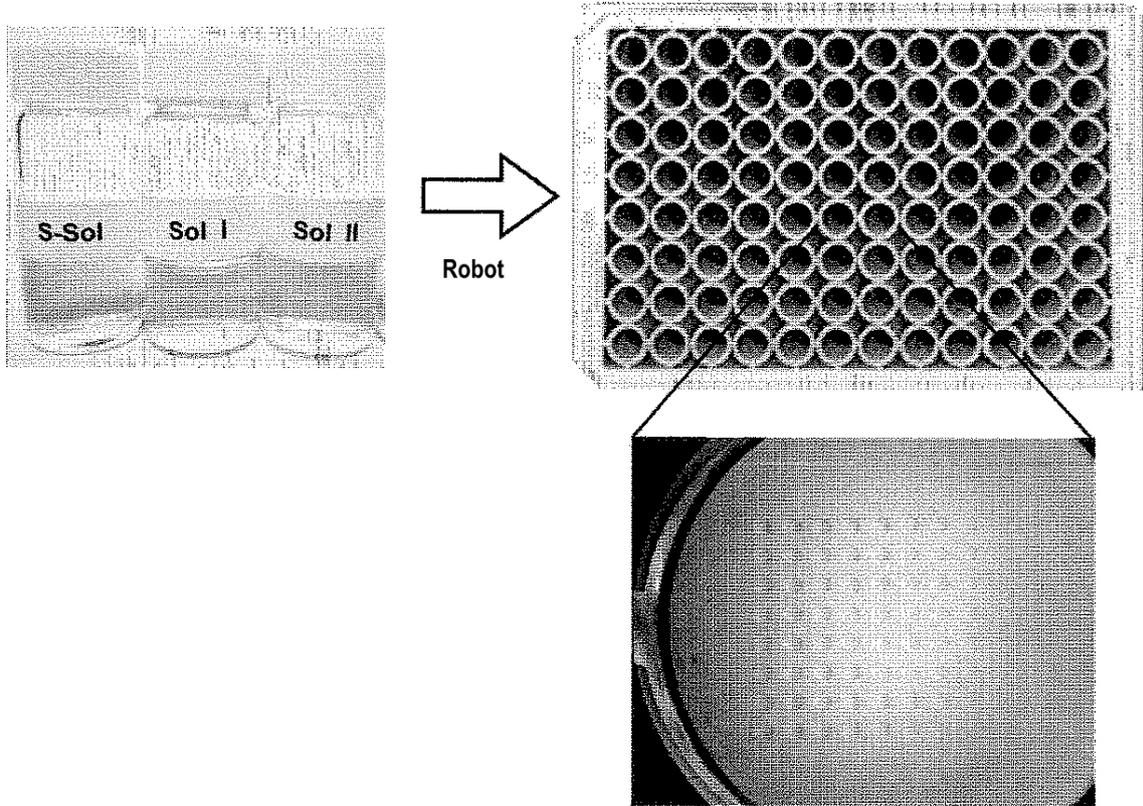
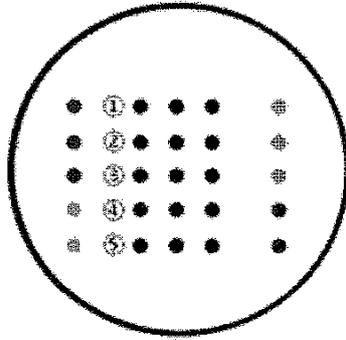


FIG. 2

(A)



- : Cinco tipos de marcadores de HIV (1, 2, 3, 4, 5)
- ⊗ : Control Negativo (Albúmina de Suero Bovino)
- : Control Positivo (Cys3)

(B)

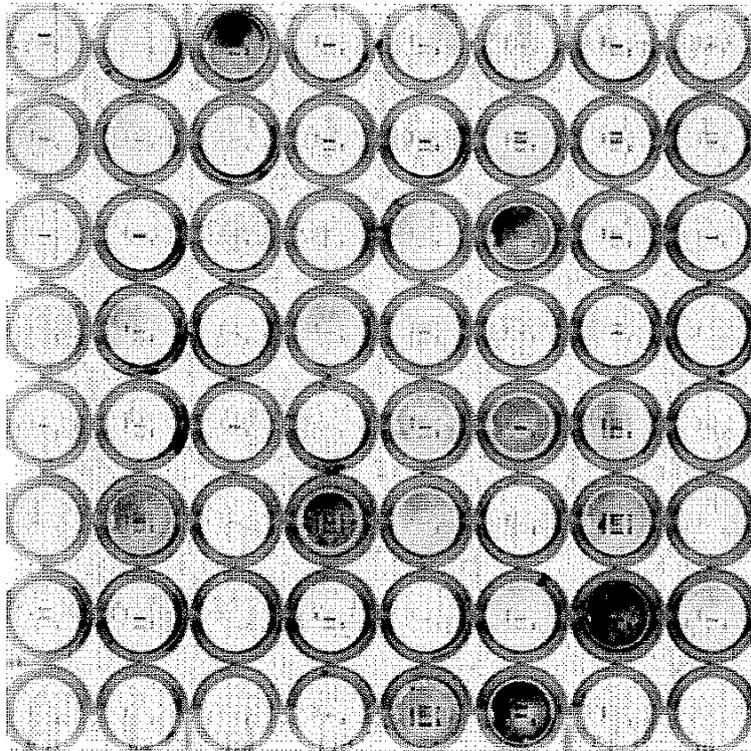


FIG. 3

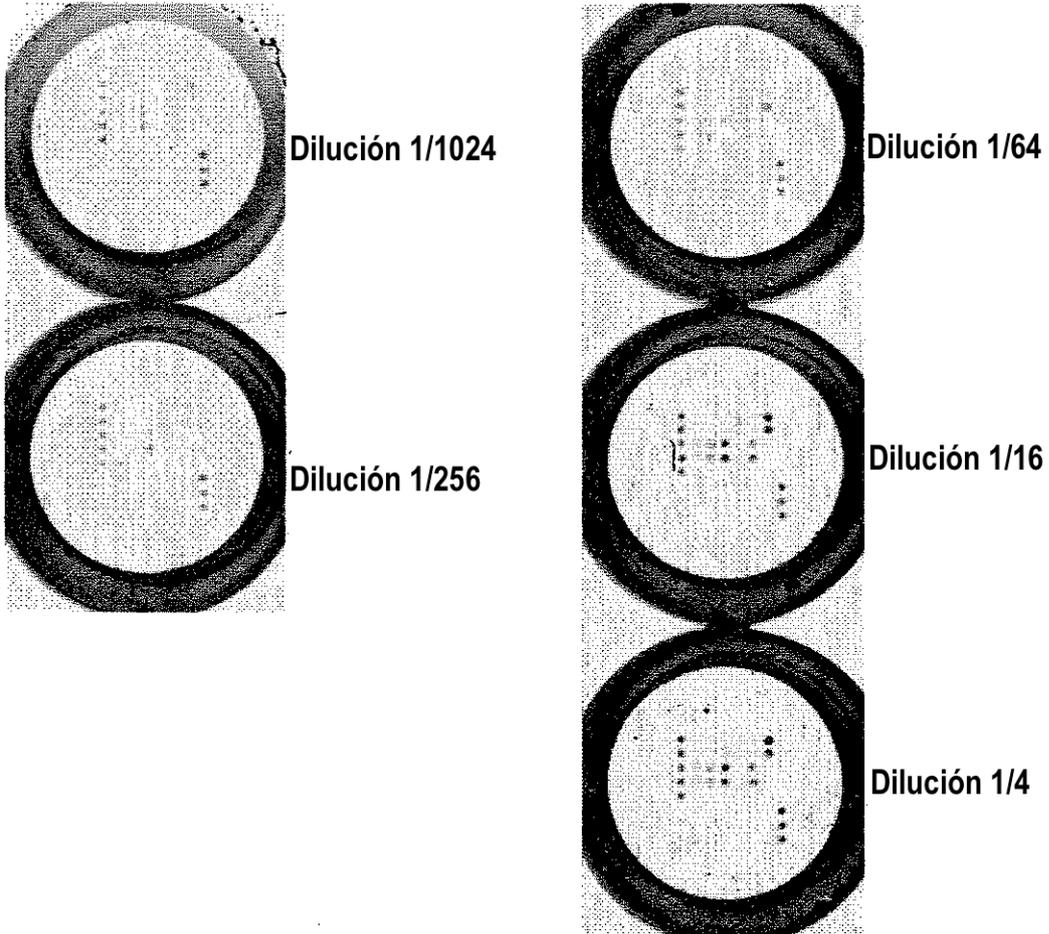


FIG. 4

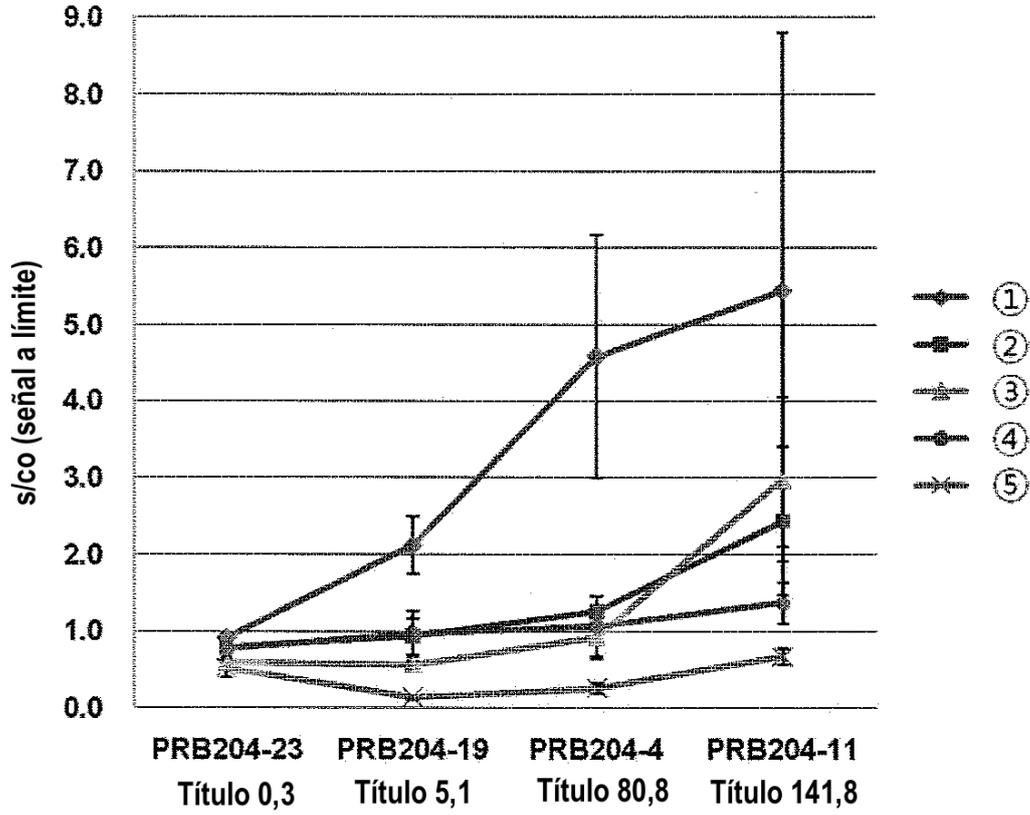


FIG. 5

Muestra estándar		Prueba anti-HIV PCI, Inc.	Pruebas anti-HIV autorizadas por la FDA de EE. UU.							Ag HIV (MAb)	Inmunotransferencia
Id. Miembro	Días desde 1 ^{er} Sangrado	Resultados	Abbott	CBC	CPI	Gen. Sys.	Org. Tek.	Syva	Abbott	Ortho	
PRB922-01	0	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	
PRB922-02	4	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	
PRB922-03	7	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG	
PRB922-04	11	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	

FIG. 6

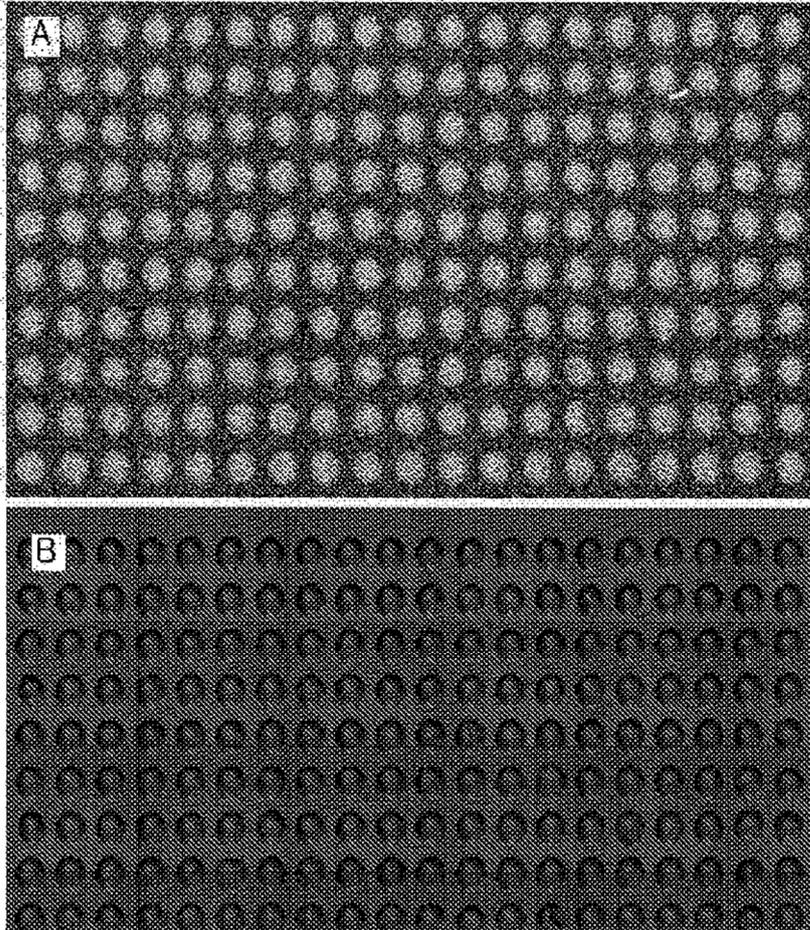
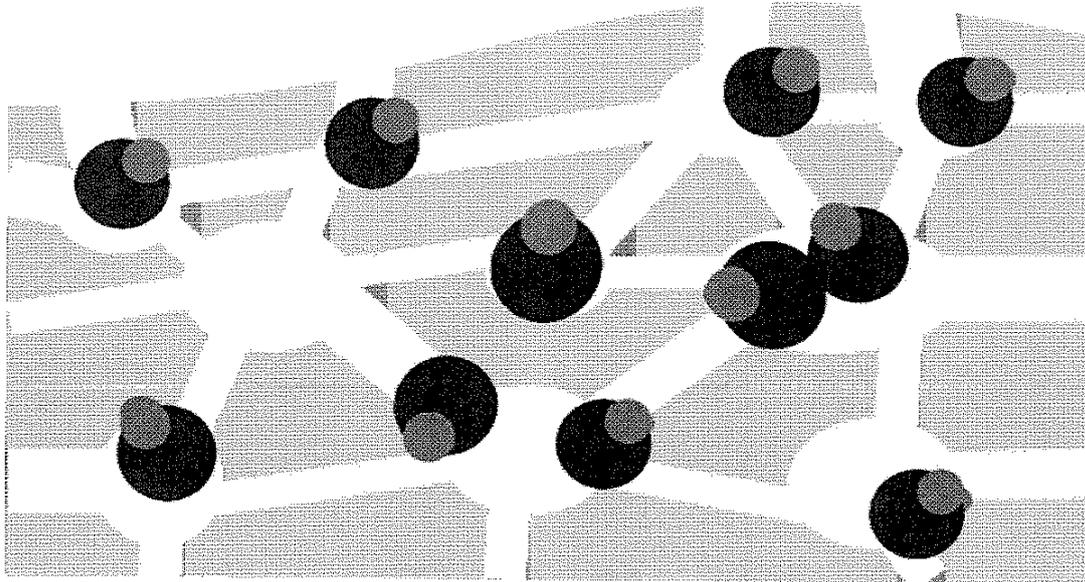


FIG. 7



- **Proteínas Encapsuladas**
- ◐ **Proteínas que Interactúan o Anticuerpos Añadidos del Ensayo**

FIG. 8

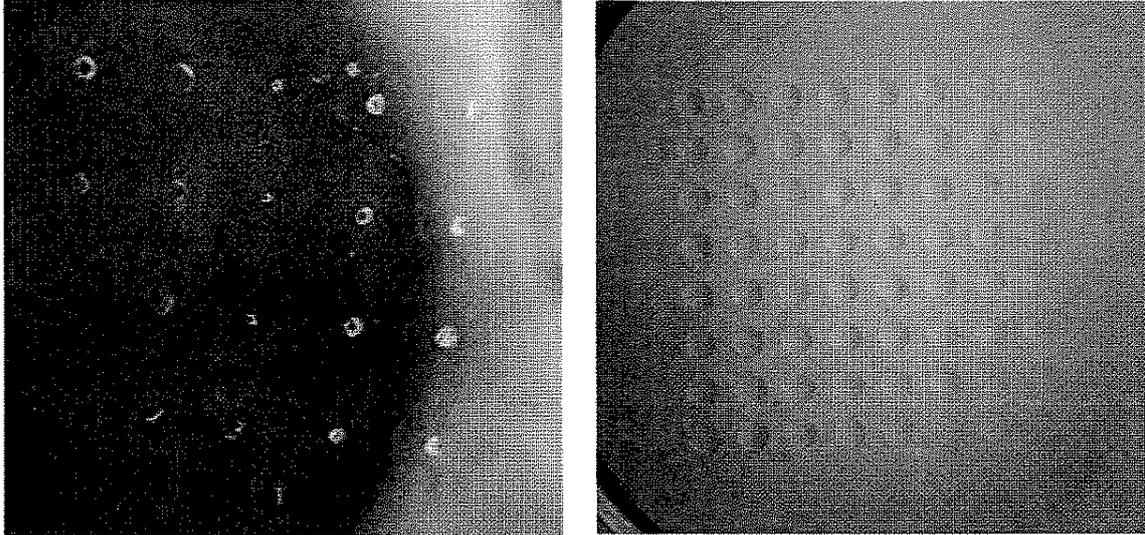
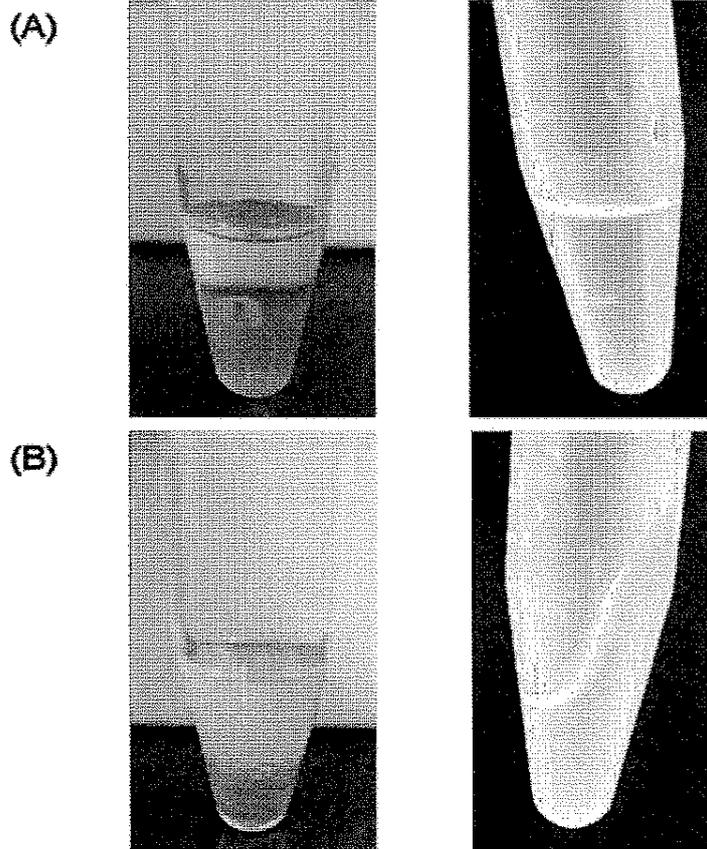


FIG. 9



10 minutos después de la preparación

3 horas después de la preparación

FIG. 10

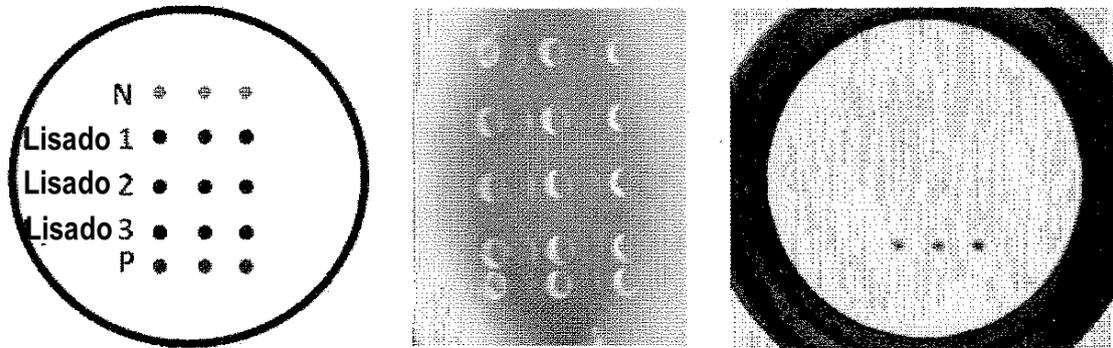


FIG. 11

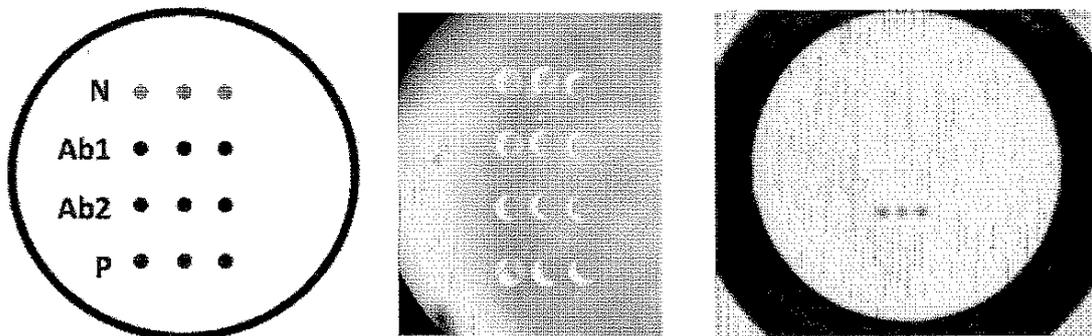
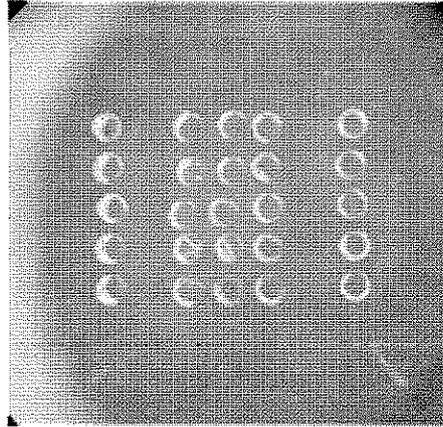
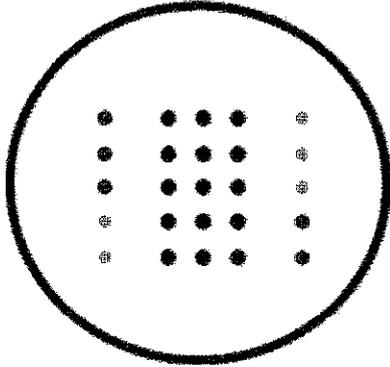


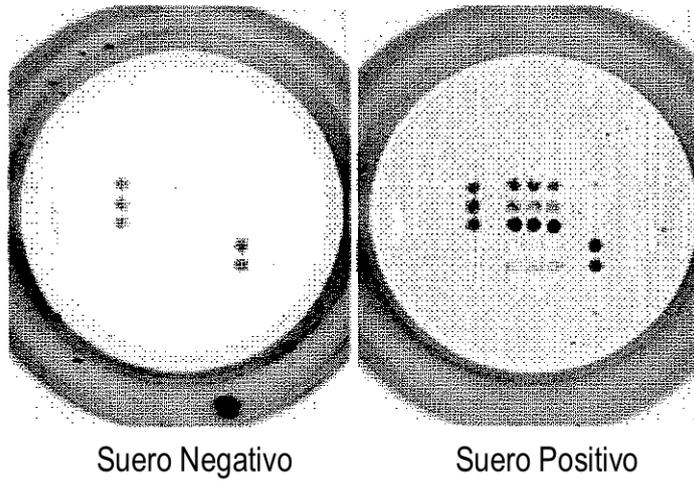
FIG. 12

1. Preparación del chip de sol-gel



- : Cinco tipos de antígenos contra una enfermedad específica (HIV)
- : Control Negativo (Albúmina de Suero Bovino)
- : Control Positivo (Cy3)

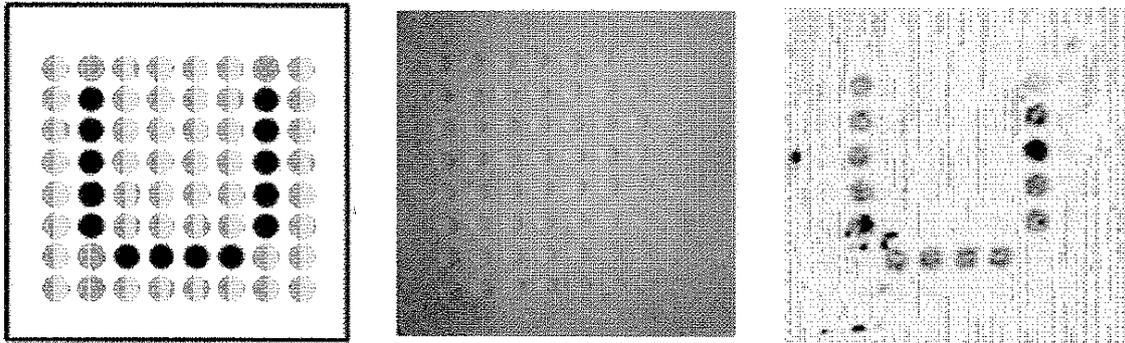
2. Resultado de ensayo usando suero de un paciente infectado con HIV



Suero Negativo

Suero Positivo

FIG. 13



- : Bisfenol A
- (stippled) : Control Negativo (solución tamponadora)

FIG. 14

Solución para Ensayo de Unión

SoIB™ Complete Kit

