

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 581**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/64** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2014 PCT/EP2014/058477**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014 WO14174088**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2014 E 14723745 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2989448**

54 Título: **Método de cuantificación de una superficie funcionalizada**

30 Prioridad:

**25.04.2013 EP 13165451**

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

**25.07.2017**

73 Titular/es:

**MYCARTIS N.V. (100.0%)  
VIB Bio-Incubator Technologiepark 4  
9052 Zwijnaarde / Ghent, BE**

72 Inventor/es:

**SHE, KING SHING JOSEPH**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 626 581 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

Método de cuantificación de una superficie funcionalizada

La presente invención hace referencia a un método para cuantificar al menos un grupo funcional que funcionaliza una superficie.

5 Las superficies funcionalizadas son herramientas importantes para las tecnologías de biosensores. Por lo tanto, los métodos para evaluar la funcionalización de la superficie son necesarios para garantizar la fiabilidad de dichas tecnologías y los métodos de control de calidad son útiles para aportar tecnologías con eficacia y exactitud probada.

10 Se han descrito diferentes grupos funcionales como entidades eficientes para fijar materiales biológicos a una superficie. Dichos materiales se podrían injertar en una superficie presentando, por ejemplo, un grupo amina (-NH<sub>2</sub>), un ácido carboxílico (-COOH) o derivados del mismo o bien un grupo hidroxilo (-OH). Dichos grupos funcionales químicos permiten el enlace covalente de una amplia gama de moléculas a la superficie usando protocolos de acoplamiento bien establecidos de la literatura.

15 Desde el punto de vista de la fabricación, la detección y caracterización de ciertos grupos funcionales, como los grupos superficiales -COOH, no se han establecido correctamente en las superficies funcionalizadas y muchas técnicas de caracterización habituales presentan varios inconvenientes tanto para un uso rutinario como preciso. Ciertamente, en primer lugar dichos métodos, como la espectroscopia de infrarrojos y la espectroscopia de fotoelectrones por rayos X (XPS), son caros en su manejo y en segundo lugar presentan a menudo una especificidad baja, y parece que han sido diseñados más bien enfocados a una superficie cargada que a un grupo funcional específico. Por consiguiente, en lo que se refiere a la superficie atacada por ácido carboxílico, dichos métodos a menudo eran incapaces de distinguir ácido carboxílico de otros grupos funcionales que contienen oxígeno. Además, los métodos mencionados antes normalmente no son adecuados para aportar información referente a superficies de dimensiones pequeñas.

25 Existen otras técnicas emergentes. Un método de este tipo se basa en la adsorción/desorción de una molécula activa colorimétricamente o bien de una molécula fluorescente en una superficie cargada. Por ejemplo, un método describe la adsorción de toluidina azul O cargada positivamente en una superficie cargada negativamente, tal como se ha mencionado en el artículo de WANG, Y. (Surface graft polymerization of SU-8 for bio-MEMS applications, Journal of Micromechanics and Microengineering, 2007, vol. 17, páginas 1371, 1380). En general dichos métodos se encargan de cuantificar las moléculas remanentes en la solución a granel después de la adsorción a la superficie, o bien de cuantificar las moléculas eluidas o arrastradas de la superficie después de la desorción. Aunque dichos métodos se pueden aplicar a cualquier superficie cargada (baja especificidad), la etapa de cuantificación no puede distinguir de forma precisa enlaces específicos de no específicos de la molécula activa o fluorescente colorimétricamente. Para la escala micrométrica o bien superficies inferiores, el porcentaje de disminución es demasiado pequeño para ser evaluado con exactitud.

40 El método denominado etiquetado por fluorescencia de especies superficiales (FLOSS) es una alternativa atractiva para la caracterización de grupos funcionales superficiales derivados carboxílicos. A este respecto, XING, Y. (Specificity and sensitivity of fluorescence labelling of Surface species, Langmuir. 2007, vol. 23, páginas 684, 688) muestra o revela un procedimiento para etiquetar de forma selectiva los grupos aldehído en una superficie que además comprende grupos ácidos carboxílicos a través de un procedimiento de limpieza, posterior a la reacción, para eliminar de forma eficaz los límites no específicos (límites débiles e iónico) de manera que el etiquetado de los grupos aldehído por el colorante a base de aminas modificadas no se vea afectado por la presencia de grupos -COOH. En lo que se refiere a la caracterización selectiva de los grupos -COOH, PELLENBARG, T. (Detecting and quantifying oxygen functional groups on graphite nanofibers by fluorescence labelling of Surface species, Carbon 2010, vol. 48, páginas 4256, 4267) describe las moléculas fluorescentes que reaccionan de forma específica a los grupos -COOH para etiquetar la superficie mediante la formación de enlaces covalentes.

50 La superficie etiquetada se caracteriza luego por espectroscopia de fluorescencia. Aunque la densidad del grupo funcional se puede medir directamente desde la superficie con la metodología FLOSS, solamente es útil para superficies relativamente grandes (del orden de mm). Para un intervalo de micrómetros o bien inferior, hemos observado que el método no es cuantitativo y que para una superficie determinada, una fluorescencia medida puede corresponder a dos concentraciones de grupo funcional. Consecuentemente, la metodología FLOSS no es aplicable a superficies de micrómetros o inferiores. Por el momento, no se ha propuesto ninguna solución para estos temas en lo que respecta a la caracterización de superficies de micrómetros o inferiores.

La presente invención pretende resolver todas o bien una parte de las desventajas anteriormente mencionadas.

60 La presente invención cumple estos objetivos con un método para cuantificar al menos un grupo funcional que funcionalice una superficie conforme a lo establecido en la reivindicación 1 adjunta. Por consiguiente, la presente invención resuelve el problema al poner en contacto la superficie funcionalizada con una solución que comprende un primer reactivo que es etiquetado con una primera concentración y un segundo

reactivo que no es etiquetado con una segunda concentración, evitando así el tema de la autoextinción observada con los métodos habituales. Ciertamente, al poner la superficie funcionalizada en contacto con la solución, el primer reactivo y el segundo reactivo reaccionan con los grupos funcionales injertados en una superficie y la reacción de acoplamiento funciona según las afinidades respectivas del primer reactivo y del segundo reactivo con el grupo funcional. Además, el primer reactivo comprende una molécula fluorescente diseñada para emitir fluorescencia. Por consiguiente, dicho grupo funcional de la superficie se acopla o bien con un primer reactivo o con un segundo reactivo, de manera que cada grupo funcional se puede acoplar con el primer reactivo o con el segundo reactivo no etiquetado. El método conforme a la presente invención separa físicamente el primer reactivo en la superficie correspondiente por lo que se evita el fenómeno de la autoextinción.

El método conforme a la presente invención permite también cuantificar el grupo funcional en la superficie. Ciertamente, en primer lugar, la concentración del primer reactivo y la concentración del segundo reactivo son parámetros predeterminados. En segundo lugar, el cociente de afinidad respectivo mencionado proporciona información acerca de la afinidad del primer reactivo y del segundo reactivo con el grupo funcional. De ahí que, después de medir la fluorescencia de la superficie, se pueda cuantificar la presencia del grupo funcional examinado, teniendo en cuenta el porcentaje de concentraciones y el ratio respectivo de las afinidades entre el primer reactivo y el segundo reactivo con el grupo funcionalizado.

El método conforme a la presente invención permite también la cuantificación de diferentes grupos funcionales injertados en una superficie. Por ejemplo, el método conforme a la presente invención permite también la cuantificación independiente de todos los grupos funcionales en una superficie funcionalizada con grupos hidroxilo (-OH) y grupos amina (-NH<sub>2</sub>). Cuando la superficie consta de diferentes grupos funcionales, se eligen para cada grupo funcional una serie de primeros reactivos y de segundos reactivos con el fin de trabajar específicamente dicho grupo funcional. El primer reactivo y el segundo reactivo serán de una concentración predeterminada y presentarán respectivas afinidades predeterminadas con dicho grupo funcional.

Según una configuración, el método consta además, previamente a una etapa a) de una etapa de activación del grupo funcional de la superficie. Esta configuración pretende preparar el grupo funcional diseñado para acoplarse con el primer reactivo y con el segundo reactivo. Por consiguiente, la reactividad del grupo funcional injertado en la superficie puede ser desencadenada por esta etapa de activación. Después de esta etapa de activación, un grupo funcional inactivo hacia el primer reactivo y/o el segundo reactivo puede volverse en un grupo funcional reactivo listo para acoplarse al primer reactivo y/o al segundo reactivo.

En una configuración, dicha activación tiene lugar a través de al menos una reacción química. Por consiguiente, esta reacción química permite promocionar o desencadenar el acoplamiento del primer reactivo y del segundo reactivo con el grupo funcional. Es fácil de implementar dicha activación química.

De acuerdo con una configuración, el cociente entre la primera concentración y la segunda concentración se encuentra entre 1:99 y aproximadamente 50:50, preferiblemente entre 2:98 y 25:75, más preferiblemente entre 3:97 y aproximadamente 10:90, y más preferiblemente entre 4:96 y 7:93.

De acuerdo con la invención, la superficie se encuentra en una micropartícula. Se pueden medir un gran número de micropartículas de forma simultánea para conseguir información respecto a la densidad del grupo funcional en una micropartícula. Además, los métodos permiten tener información detallada sobre una población específica o bien entre distintas poblaciones con distintos códigos en una única medición.

En una configuración, el primer reactivo y/o el segundo reactivo se eligen entre proteínas, anticuerpos, péptidos, ácidos nucleicos o una mezcla de los mismos.

De acuerdo con una configuración, el grupo funcional es un grupo carbonilo elegido entre los ácidos carboxílicos o derivados de los mismos, cetonas y aldehídos. Por consiguiente, en esta configuración el primer y el segundo reactivo se pueden acoplar al grupo funcional usando cualquier grupo diseñado para acoplarse con al menos un grupo funcional conforme a esta invención.

En una configuración, el primer reactivo y/o el segundo reactivo se han acoplado al grupo funcional de la superficie por medio de un enlace peptídico.

Conforme a una configuración, el primer reactivo y/o el segundo reactivo presentan un grupo amino implicado en el acoplamiento con el grupo funcional de la superficie. Por tanto, conforme a esta configuración el grupo funcional se puede elegir entre cualquier diseño de grupo funcional para ser acoplado a un grupo amino.

En una configuración, la superficie es de vidrio, silicona o polímero.

Conforme a una configuración, el primer reactivo se obtiene mediante el etiquetado del segundo reactivo. En muchos métodos de caracterización basados en la fluorescencia, se desarrolla una etiqueta específica fluorescente

para la detección, mientras que en el método conforme a la presente invención, se puede utilizar cualquier molécula fluorescente que se pueda conjugar con el segundo reactivo.

En una configuración, el segundo reactivo es la estreptavidina.

Conforme a una configuración, el primer reactivo se ha etiquetado con FITC (CAS Number 3326-32-7), rodamina (CAS Number 81-88-9), cianina 3 (CAS Number 605-91-4), cianina 5 (CAS Number 14187-31-6), AlexaFluor® 488, AlexaFluor® 532, AlexaFluor® 647 (los colorantes AlexaFluor® son comercializados por Molecular Probes, Suiza), ATTO 488, ATTO 532, ATTO 647N (los colorantes ATTO son comercializados por ATTO-TEC GmbH, Alemania) o una mezcla de los mismos.

En una configuración, la estreptavidina se etiqueta con ATTO 647N.

En una configuración, el primer reactivo y el segundo reactivo constan de una fracción de biotina, y el primer reactivo consta además de estreptavidina etiquetada y el segundo reactivo consta además de una estreptavidina no etiquetada.

La presente invención se ilustra además con la siguiente descripción que se plantea a la vista de la figura adjunta, que representa una configuración explicativa y a modo de ejemplo de un método para cuantificar al menos una superficie que funcionaliza grupos funcionales.

La figura 1 ilustra un método conforme a la invención para cuantificar una superficie funcionalizada con grupos de ácidos carboxílicos (-COOH) tal como se muestra en la figura 1.

Para cuantificar el grupo funcional (1) que es el grupo del ácido carboxílico, el método se inicia con una etapa de activación que consiste en poner en contacto la superficie (2) con una solución activante que comprende un agente que acopla péptidos, como el EDC clorhidrato de (N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida).HCl (5 mg) y sulfonhído (12,5 mg – sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida) en 3,6 ml de tampón de activación (100 mM MES, 0,3% (v/v) Tween®-20, pH 2,3). En la etapa de activación, la micropartícula (3) se sumerge en la solución de activación durante unos 60 minutos a temperatura ambiente.

Después de la etapa de activación, la micropartícula (3) se lava para eliminar el exceso de sustancias químicas con un tampón de lavado (fosfato 10mM, cloruro potásico 2,7 mM, cloruro sódico 137 mM, 0,3% (v/v) de Tween®-20, pH 7,4).

Posteriormente, la superficie (2) entra en contacto con una solución que comprende un primer reactivo (4) y un segundo reactivo (5). El segundo reactivo (5) es una estreptavidina y el primer reactivo (4) es una estreptavidina etiquetada, que tiene al menos un fluoróforo (6) ATTO 647 N comercializado por ATOO-TECH GmbH, Alemania. El fluoróforo (6) ATTO 647 N está unido al primer reactivo (4) por medio de un enlace peptídico que implica al menos un residuo de lisina. Un grupo amino (7) de la estreptavidina se ha diseñado para acoplarse al grupo carboxílico de la superficie(2) por medio de un enlace peptídico. En la solución, el primer reactivo(4) está presente en una primera concentración C1 y el segundo reactivo (5) está presente en una segunda concentración C2, de manera que el cociente C1/C2 entre la primera concentración C1 y la segunda concentración C2 ya se ha predeterminado. En la práctica, la solución que contiene 60 µl de un 5% de ATTO 647 N-estreptavidina y un 95% de estreptavidina y una solución salina tamponada de fosfato (PBS) de 500 µg/ml se añade a las micropartículas (3) en 2,1 ml de tampón de acoplamiento (acetato sódico 10 mM, 0,3% de (v/v)Tween®-20 comercializada por Sigma-Aldrich, CAS nr. 9005-64-5), pH 4,8) y la reacción transcurre a temperatura ambiente durante 30 minutos. La micropartícula (3) se lavará luego con el tampón de lavado para eliminar el exceso de reactivos.

Para cuantificar la presencia del grupo funcional (1) en la superficie (2), la micropartícula (3) se coloca primero bajo un microscopio de fluorescencia para cuantificar la medición. Posteriormente, la presencia de grupos carboxílicos en la superficie se cuantifica teniendo en cuenta la fluorescencia medida con respecto al ratio de concentración de C1/C2, entre la primera concentración C1 y la segunda concentración C2.

Otras configuraciones de la invención son evidentes para los expertos en el tema teniendo en cuenta la especificación y la práctica de la invención aquí revelada. Se ha previsto que la especificación y los ejemplos se consideren únicamente a modo de ejemplo, con el verdadero objetivo de la invención que se indica en las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

- 5
1. Método para cuantificar al menos un grupo funcional (1) que funcionaliza una superficie (2), que consiste en las etapas sucesivas siguientes:
- 10
- a) Disponer de al menos una superficie(2) de una micropartícula que tenga dimensiones micrométricas y funcionalizada con al menos un grupo funcional (1),
- b) Poner la superficie (2) en contacto con una solución que comprenda al menos un primer reactivo(4) de una primera concentración y un segundo reactivo(5) de una segunda concentración, habiendo predeterminado el cociente entre la primera y la segunda concentración; dicho primer reactivo(4) y dicho segundo reactivo(5) habrán sido diseñados para acoplarse de forma selectiva a al menos un grupo funcional(1) con una afinidad respectiva, habiendo predeterminado el cociente de dichas afinidades; el primer reactivo(4) se habrá etiquetado por emitir una fluorescencia y el segundo reactivo (5) no está rotulado.
- 15
- c) Medir la fluorescencia de dicho primer reactivo (4) acoplado a la superficie (2) y cuantificar dicho grupo funcional (1) usando la fluorescencia medida de dicho primer reactivo y dichos cocientes predeterminados.
2. Método conforme a la reivindicación 1, donde dicho método comprende además, previamente a la etapa a), una etapa de activación para activar el grupo funcional (1) de la superficie (2).
- 20
3. Método conforme a la reivindicación 2, donde dicha activación se lleva a cabo a través de al menos una reacción química.
4. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cociente entre la primera concentración y la segunda concentración se sitúa entre 1:99 y aproximadamente 50:50, preferiblemente entre 2:98 y 25:75, más preferiblemente entre 3:97 y aproximadamente 10:90, y más preferiblemente entre 4:96 y 7:93.
- 25
5. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el primer reactivo (4) y/o el segundo reactivo (5) se eligen entre proteínas, anticuerpos, péptidos, ácidos nucleicos o una mezcla de los mismos.
- 30
6. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el grupo funcional (1) es un grupo carbonilo elegido entre los ácidos carboxílicos o derivados de los mismos, las cetonas, los aldehídos.
- 35
7. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el primer reactivo (4) y/o el segundo reactivo (5) se unen al grupo funcional (1) de la superficie (2) mediante un enlace peptídico.
- 40
8. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el primer reactivo (4) y/o el segundo reactivo (5) presentan un grupo amino implicado en el enlace al grupo funcional (1) de la superficie (2).
9. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la superficie (2) es de vidrio, silicona o polímero.
10. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el primer reactivo (4) se obtiene por el marcado del segundo reactivo (5).
- 45
11. Método conforme a la reivindicación 10, donde el segundo reactivo (5) es estreptavidina.
12. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde el primer reactivo (4) se marca con FITC, rodamina, cianina 3, cianina 5, AlexaFluor® 488, AlexaFluor® 532, AlexaFluor® 647, ATTO 488, ATTO 532, ATTO 647N o una mezcla de los mismos.
- 50
13. Método conforme a la reivindicación 11 en combinación con la 12, donde la estreptavidina se marca con ATTO 647N.
- 55
- 60
- 65

Fig. 1

