

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 245 899**

21 Número de solicitud: 200401733

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **15.07.2004**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2006**

Fecha de la concesión: **25.06.2007**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **16.08.2007**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

73 Titular/es: **Universidad de Sevilla**
Pabellón de Brasil
Paseo de las Delicias, s/n
41012 Sevilla, ES

72 Inventor/es: **Flores Mosquera, María;**
Rodríguez Gil, Alfonso;
Gañán Calvo, Alfonso;
Chávez de Diego, Sebastián y
Cebolla Ramírez, Ángel

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Soporte sólido para la unión y/o síntesis química en fase sólida y procedimiento de utilización.**

57 Resumen:

Soporte sólido para la unión y/o síntesis química en fase sólida y procedimiento de utilización.

En la presente invención se describe la utilización de un polímero de poliimida como soporte sólido para, o bien inmovilizar moléculas sobre él o sintetizarlas *in situ*. Los compuestos pueden ser pegados directamente a la superficie del soporte o bien pueden ser activados con moléculas pequeñas que contengan grupos reactivos actuando como espaciadores o "conectores". Los sectores para los cuales la presente invención puede ser de interés son los relacionados con el desarrollo de un nuevo soporte para síntesis en fase sólida (incluyendo la introducción de materiales de partida), inmovilización de moléculas orgánicas (por ejemplo biopolímeros) y la utilización de estos soportes en "arrays" y "microarrays".

ES 2 245 899 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Soporte sólido para la unión y/o síntesis química en fase sólida y procedimiento de utilización.

5 **Objeto de la invención**

La presente invención está relacionada con la utilización de un nuevo soporte para síntesis en fase sólida, inmovilización de moléculas orgánicas y bio-orgánicas y, la posibilidad de utilizarlo en la fabricación de arrays (matrices) y microarrays (micromatrices). Más particularmente, la presente invención se refiere a polímeros de poliimida como
10 soporte sólido, preferentemente polímeros de poliimida aromática obtenidos por la condensación de dianhidridos con diaminas.

Estado de la técnica

15 En las dos últimas décadas la biotecnología ha experimentado notables avances en el desarrollo de nuevas tecnologías para aplicaciones médicas y biológicas. En este campo, el esfuerzo por obtener mejores dispositivos de investigación ha aumentado el interés por las aplicaciones de los “arrays” (matrices) y “microarrays” (micromatrices). Los “arrays” y “microarrays” son dispositivos con una alta densidad de biopolímeros (por ejemplo oligonucleótidos, proteínas, péptidos, oligosacáridos y otras pequeñas moléculas orgánicas. Algunas aplicaciones específicas de
20 estos dispositivos son el análisis de mezclas complejas de moléculas, interacciones proteína- proteína, proteína-ADN, investigación toxicológica, descubrimiento de fármacos, etc.

El trabajo con “arrays” y “microarrays” requiere la combinación de muchos componentes. Algunos de los aspectos críticos son el soporte sólido y la forma de inmovilizar las biomoléculas sobre dicho soporte. Hay dos vías
25 fundamentales para la inmovilización de biomoléculas sobre soportes sólidos:

- a) el compuesto puede ser sintetizado “*in situ*” sobre la superficie del soporte sólido (utilizando técnicas de síntesis en fase sólida) o
- 30 b) sintetizar el compuesto fuera del soporte sólido y unirlo posteriormente.

Cada metodología requiere soportes sólidos con propiedades diferentes, pero, en general, el soporte sólido debe mostrar un equilibrio entre una buena estabilidad bajo condiciones extremadamente desfavorables y una moderada activación superficial para pegar la molécula deseada o sus precursores.
35

La inmovilización de ADN en soportes sólidos está siendo un tema muy importante en el desarrollo de sistemas de ADN. Hay muy pocos ejemplos de fabricación de arrays en superficies de plásticos. En general, la mayoría de los trabajos de unión de ADN en este tipo de superficies se han realizado en el formato de placas de microvaloración de 96 pocillos. En estos estudios se ha descrito la inmovilización de ADN por adsorción pasiva, por radiación de luz UV,
40 por formación de enlaces covalentes con moléculas adsorbidas previamente en la superficie del plástico o por uniones covalentes a través de las bases nitrogenadas modificadas.

Otra aproximación es modificar el soporte sólido introduciendo grupos funcionales o un conector. Existen numerosos ejemplos en los que se une el ADN de forma covalente a soportes de poliestireno modificado con grupos funcionales reactivos como hidroxilos, carboxilos, aminas, aldehidos, hidrazina, epóxidos, maleimidados, tioles, etc (U.S. Pat. No 5,474,895). Sin embargo, aunque estos soportes tienen una elevada capacidad de carga, presentan altos niveles de adsorción inespecífica de los oligonucleótidos. Más recientemente, se ha descrito la unión covalente de moléculas de ADN modificado a soportes de polipropileno activado superficialmente con grupos amino (U.S. Pat. N° 6,013,789), y a un polímero hidrofóbico especialmente diseñado para ello (U.S. Pat. N° 6,403,368).
50

El material más utilizado para la fabricación de microarrays mediante síntesis *in situ* de oligonucleótidos es el “vidrio de poro controlado” (Controlled Pore Glass, CPG. U.S. Pat. N° 4,458,066). Sin embargo este material inorgánico presenta algunos problemas, entre los que se puede destacar su baja capacidad de unión de oligonucleótidos y la posibilidad de obtención de falsos rendimientos de acoplamiento. Se hace necesario por tanto, la búsqueda de nuevos materiales, fundamentalmente de naturaleza orgánica. Entre ellos se puede destacar el polipropileno activado con grupos amino desarrollado por Beckman tanto para la unión covalente de oligonucleótidos como para su síntesis *in situ* (U.S. Pat. N° 5,554,501).
55

Otro de los aspectos que hay que tener en cuenta en el desarrollo de nuevos soportes sólidos que se pueden utilizar en la fabricación de microarrays, es el método de detección de los procesos que se quieren medir en cada caso. Una de las metodologías más extendidas se basa en la medición de la fluorescencia sobre el propio microarray. En general, los ensayos basados en la detección de fluorescencia tienen muchas ventajas frente a otras técnicas, gran sensibilidad y especificidad, posibilidad de detectar simultáneamente varias respuestas, seguridad, simplificación de la instrumentación, etc. Uno de los factores que afectan a la sensibilidad de la detección de la señal fluorescente es el ruido de fondo de la superficie sobre la que se está realizando la detección, por lo que es necesario validar las propiedades ópticas del soporte sólido utilizado.
60
65

Recientemente se ha descrito la utilización de medidas de conductividad en microarrays electroquímicos para la detección de interacciones entre biomoléculas y/o moléculas orgánicas (WO 0121635). La ventaja fundamental de este tipo de técnica es que evita el marcaje de las muestras sin afectar a la sensibilidad del proceso. Sin embargo, es necesario que el soporte sólido presente ciertas propiedades conductoras.

Se hace necesario por lo tanto, el desarrollo de nuevos soportes sólidos que combinen todas las propiedades necesarias para la fabricación de microarrays que se adapten a los continuos avances que tienen lugar en el campo de la biotecnología.

10 Explicación de la invención

El objeto de la presente invención es un soporte sólido para la unión y/o síntesis química en fase sólida que incluye una poliimida capaz de reaccionar con compuestos orgánicos que contengan grupos nucleófilos en su estructura bajo condiciones aptas para la formación de un enlace covalente entre ambos. La poliimida incluye sustancias dopantes que modifican sus propiedades mecánicas, ópticas, en particular disminuir la emisión de fluorescencia, su conductividad eléctrica o su conductividad térmica. Cuando la sustancia dopante es grafito, carbono o sus derivados y la emisión de fluorescencia disminuye entre un 78% y un 95% respecto a la poliimida sin dopar.

La poliimida se forma mediante condensación de anhídridos de ácido carboxílico bifuncionales con diaminas aromáticas primarias seleccionándose los anhídridos entre los siguientes: anhídrido maleico, anhídrido piromelítico, anhídrido trimelítico, dianhidrido 2,3,6,7-naftalen tetracarboxílico, dianhidrido 1,2,5,6-napftalen tetracarboxílico, dianhidrido 2,2',3,3'-bifenil tetracarboxílico, dianhidrido 3,3',4,4'-bifenil tetracarboxílico, dianhidrido bis(2,3-dicarboxifenil) metano, dianhidrido bis(3,4-dicarboxifenil) metano, dianhidrido 1,1-bis(2,3-dicarboxifenil) etano, dianhidrido 1,1-bis(3,4-dicarboxifenil) etano, dianhidrido 2,2-bis(3,4-dicarboxifenil) propano, dianhidrido bis(3,4-dicarboxifenil) propano, dianhidrido 3,4,9,10-perilen tetracarboxílico, dianhidrido 4,4'-oxidifalico, dianhidrido 3,3',4,4'- benzofenona tetracarboxílico, dianhidrido bis(3,4-dicarboxifenil) sulfona y similares. Las aminas aromáticas se seleccionan entre las siguientes: *o*-diaminobenceno, *m*-diaminobenceno, *p*-diaminobenceno, tolueno diamino, 1,5-diamino naftalene, benzidina, 3,3'-dicloro benzidina, metilendianilina, 2,2-bis(4-aminofenil) propano, oxidianilina, 4,4'-diamino difenil sulfuro, 3,3'-diamino difenil sulfona, 4,4'-diamino difenil sulfona, 4,4'-diamino difenil N-metil amina, 4,4'-diamino difenil N-fenil amina, 4,4'-diamino difenil silano, 4,4'-diamino difenil dietilsilano, óxido de 4,4'-diamino difenil etil fosfina y similares. Particularmente preferida es la poliimida formada mediante condensación de anhídrido piromelítico (PMDA) y oxidianilina (ODA).

La poliimida puede adoptar geometría diversa tal como películas, membranas, filamentos, capilares, canales, partículas, placas de microvaloración, espumas, hilos, mallas, tamices, hojas, varillas o manguitos.

Constituye otro objeto de la presente invención un procedimiento de utilización del soporte sólido que incluye una poliimida que incluye las siguientes etapas:

- poner en contacto la superficie del soporte sólido que tiene grupos imida reactivos con una disolución de un compuesto orgánico que tiene un grupo nucleófilo en su estructura bajo condiciones aptas para la formación de un enlace covalente entre ambos.
- llevar a cabo el análisis objetivo de los compuestos unidos covalentemente al soporte sólido.

Alternativamente, el compuesto orgánico unido covalentemente al soporte sólido constituye un producto de partida para procesos de síntesis química que dan lugar al compuesto final unido covalentemente a dicho soporte sólido. El enlace covalente se produce entre los grupos nucleófilos del compuesto orgánico que se va a unir y los carbonos carbonílicos del grupo imida de la superficie del soporte sólido. La formación de dicho enlace covalente entre el grupo nucleófilo del compuesto orgánico y la superficie del soporte sólido da lugar a la apertura del grupo imida generando enlaces amida repartidos homogéneamente a lo largo de la superficie del soporte sólido.

El grupo nucleófilo del compuesto orgánico tiene un par de electrones libres que son compartidos para formar un nuevo enlace y se selecciona preferentemente entre aminas, alcoholes, tioles, derivados de P, éteres y tio-éteres.

La disolución del compuesto orgánico puede ser neutra o básica, en disolventes orgánicos o agua. Cuando las disoluciones son básicas incluyen bases orgánicas o inorgánicas, seleccionándose la base orgánica del grupo de aminas alifáticas terciarias. Cuando la base es inorgánica se selecciona del grupo de los carbonatos. Cuando el disolvente es orgánico se selecciona de entre DMF, NMP, CH₃CN y MeOH.

Opcionalmente, los compuestos orgánicos incluyen polímeros de interés biológico (biopolímeros), los productos de partida necesarios para la síntesis de esos biopolímeros, y pequeñas moléculas que se pueden utilizar como espaciadores y/o conectores tanto para los biopolímeros como para los productos de partida para realizar la síntesis en fase sólida. Los biopolímeros incluyen péptidos, oligonucleótidos, ácidos nucleicos, PNA, LNA, proteínas, glicoproteínas, lípidos, fosfolípidos, carbohidratos, oligosacáridos y mezclas de los mismos y están modificados con un grupo nucleófilo capaz de formar un enlace covalente con los grupos imida de la superficie del soporte sólido.

Alternativamente, los biopolímeros están modificados con un espaciador y/o conector que contiene un grupo nucleófilo capaz de formar un enlace covalente con los grupos imida de la superficie del soporte sólido o son los propios biopolímeros los que están modificados con un grupo capaz de formar un enlace covalente con el grupo reactivo del espaciador y/o conector unido al soporte sólido.

5 Los posibles productos de partida para la síntesis de biopolímeros incluyen aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, monosacáridos y los monómeros y sus derivados que se utilizan en la síntesis de dichos biopolímeros. Dichos productos de partida están modificados con un grupo nucleófilo capaz de formar un enlace covalente con los grupos imida de la superficie del soporte sólido o bien con un espaciador y/o conector que contiene un grupo nucleófilo capaz de formar un enlace covalente con los grupos imida de la superficie del soporte sólido. Alternativamente, los productos de partida están modificados con un grupo capaz de formar un enlace covalente con el grupo reactivo del espaciador y/o conector unido al soporte sólido. En este caso, los espaciadores y/o conectores incluyen moléculas orgánicas con un grupo nucleófilo que reacciona con la poliimida y otro grupo reactivo donde se une covalentemente el biopolímero o su producto de partida.

15 Por último, también pueden los biopolímeros y sus productos de partida estar modificados con un espaciador y/o conector que contenga un grupo capaz de formar un enlace covalente con el grupo reactivo del espaciador y/o conector unido al soporte sólido.

20 El proceso de síntesis química que se lleva a cabo sobre los productos de partida incluye las reacciones químicas específicas para la obtención del compuesto orgánico de interés y particularmente las reacciones químicas habituales en la síntesis de oligonucleótidos.

Dicho proceso de síntesis química incluye uno o varios ciclos que constan de:

- desprotección de la posición sobre la que se va a elongar la cadena.
- acoplamiento del monómero concreto en cada momento.
- inactivación de las posiciones libres que no han reaccionado.
- oxidación a fosfato.

Opcionalmente se lleva a cabo tras los ciclos de elongación de la cadena la desprotección de las bases y/o la separación del soporte sólido.

Sobre el soporte sólido de poliimida con biomoléculas unidas covalentemente se realizan experimentos de interacción entre los compuestos unidos y otras biomoléculas y/o compuestos orgánicos. Dichas interacciones se pueden medir por fluorescencia, radioactividad o cualquier otro método utilizado habitualmente.

Los soportes sólidos pueden utilizarse para la preparación de matrices ("arrays") y micromatrices ("microarrays") de ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, proteínas, polisacáridos, y cualquier tipo de librerías de compuestos químicos ordenados.

45 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a un soporte sólido formado por un polímero que contiene al menos un grupo funcional imida capaz de reaccionar con compuestos orgánicos que contengan grupos nucleófilos en su estructura bajo condiciones aptas para la formación de un enlace covalente entre ambos. Dicho polímero incluye sustancias dopantes que modifican sus propiedades mecánicas, ópticas, su conductividad eléctrica o su conductividad térmica y se forma mediante condensación de anhídridos de ácido carboxílico bifuncionales con diaminas aromáticas primarias.

Además el polímero de la presente invención podría estar dopado con diferentes sustancias que modificasen alguna de sus propiedades químico-físicas. Entre estas sustancias se encuentran el carbono, la alúmina, mezcla de ambas, derivados de plata, oro o estaño, titanato de bario o cualquier otra sustancia que modificase las propiedades ópticas, mecánicas, la conductividad térmica o electrónica, etc.

La geometría que pueden adoptar dichos soportes es diversa: películas, membranas, filamentos, capilares, canales, partículas, placas de microvaloración, espumas, hilos, mallas, tamices, hojas, varillas, manguitos, etc.

La metodología de la presente invención aprovecha la reactividad química de los grupos funcionales imida que contiene el polímero con un nucleófilo. Este tipo de reacciones da lugar a la formación de un enlace covalente entre el soporte sólido de poliimida y la molécula que contiene el grupo nucleófilo. La formación del nuevo enlace provoca la apertura del grupo imida generando enlaces amida en el soporte sólido. Los enlaces amida se sitúan a lo largo de la superficie del polímero. Los grupos nucleófilos reactivos pueden ser aminas, tioles, derivados de fósforo, éteres, tioéteres, y otros similares bien conocidos.

Constituye igualmente objeto de la presente invención el desarrollo de un procedimiento para unir a la superficie de poliimida de un soporte sólido cualquier tipo de molécula orgánica que posea funcionalidad química que la haga comportarse como nucleófila. Como ejemplos de estas moléculas pueden mencionarse: biopolímeros, monómeros de dichos biopolímeros, moléculas orgánicas que hagan el papel de espaciadores o conectores y en general cualesquiera otras moléculas orgánicas de interés.

Una vez unida la molécula orgánica al soporte sólido, constituye otro objeto de la presente invención la utilización del sistema para llevar a cabo síntesis química sobre la molécula pegada. En relación con esto, dicha molécula pegada puede ser usada como material de partida para la realización de síntesis en fase sólida y/o como conector o espaciador para unir las moléculas orgánicas referidas anteriormente. Este ciclo puede llevarse a cabo todas las veces que se requiera.

La presente invención puede aplicarse a la inmovilización sobre dichos polímeros de poliimida de ácidos nucleicos, análogos de ácidos nucleicos como LNAs, PNAs, polipéptidos, oligonucleótidos, proteínas, glicoproteínas, lípidos, fosfolípidos, carbohidratos, oligosacáridos, y otras macromoléculas. Más concretamente, la presente invención tiene como ejemplo de aplicación preferente la síntesis *in situ* de oligonucleótidos. Esta se puede llevar a cabo mediante dos aproximaciones diferentes:

- unión directa al soporte sólido de un nucleótido modificado con un grupo nucleófilo terminal.

- unión de un espaciador y/o conector con un grupo nucleófilo en uno de los extremos y un grupo reactivo en el otro. El grupo nucleófilo une la molécula al soporte sólido y el grupo reactivo se unirá al nucleótido sobre el que se alargará la cadena. El nucleótido podrá o no estar modificado para que reaccione con el espaciador y/o conector.

En general y salvo que se indique otra cosa, todos los términos científicos y técnicos que se emplean en este documento tienen el mismo significado que lo que se entiende habitualmente cuando se utilizan en entornos relacionados con la química de polímeros, química orgánica, bioquímica y biología molecular.

El soporte sólido de poliimida tiene suficiente estabilidad térmica, compatibilidad con solventes y es químicamente inerte frente a un amplio espectro de reactivos. En particular, el polímero de poliimida es estable frente a todas las condiciones de reacción requeridas en los distintos pasos de la síntesis de oligonucleótidos.

Constituye un objeto de esta invención la utilización de polímeros de poliimida como soportes sólidos óptimos para la utilización de diversos métodos de detección de resultados. Más concretamente, la utilización de poliimidias dopadas con distintas sustancias, que se pueden incluir en la síntesis del polímero de forma individual o como mezclas, que les confieran distintas propiedades físico-químicas útiles en el proceso de detección final. Alguna de las propiedades que se pueden optimizar teniendo en cuenta la posterior aplicación del sistema del que forma parte el soporte sólido, son: las propiedades ópticas, la opacidad del sustrato aumenta la sensibilidad en la detección de la fluorescencia; - la conductividad eléctrica, pudiéndose utilizar el soporte en la fabricación de microarrays electrónicos, etc.

Constituye el último objeto de la presente invención el uso de estos soportes sólidos para la fabricación de "arrays" y "microarrays" y para sus aplicaciones.

Modo de realización de la invención

Ejemplo 1

El presente ejemplo muestra la fluorescencia (ruido de fondo) de 2 polímeros de poliimida medida en un Typhoon 9410 (Amersham Pharmacia Biotech). La tabla I presenta los valores relativos de la fluorescencia (ruido de fondo) emitida por kapton[®] HN (25 μ m) y kapton[®] CB (25 μ m), respecto a la fluorescencia emitida por un portaobjetos de vidrio estándar (filas 1 y 2) y relacionándolas entre sí (fila 3). El valor por debajo de 1 de la razón entre el kapton[®] CB (25 μ m) y el vidrio indica su menor fluorescencia en todas las combinaciones de radiaciones de excitación y emisión usadas. Otras variantes de material como el kapton[®] HN muestran mayor fluorescencia que el vidrio salvo cuando se usa luz de excitación de 532 nm y se registra la luz emitida con un filtro de 526 nm.

TABLA I

λ_{exc}	532	532	532	532	633
λ_{em}	526	555	560	610	670
kapton® HN/ vidrio	0.47	1.57	1.44	5.75	8.36
kapton® CB/ vidrio	0.07	0.16	0.32	0.29	0.59
kapton® CB/ kapton® HN	0.14	0.10	0.22	0.05	0.07

Ejemplo 2

Unión de oligonucleótidos 1

El presente ejemplo muestra como se puede inmovilizar covalentemente un oligonucleótido sobre un polímero de poliimida. Para realizar el ejemplo se puede obtener un oligonucleótido sintético de 60 bases modificado en la posición 3' con un grupo amino y se marca radiactivamente con ^{32}P . Una lámina de kapton® CB de 25 μm (DuPont) a temperatura ambiente, se impregna con una disolución acuosa 0.16 mM del oligonucleótido anterior. Pasadas 5 h se elimina la solución de la lámina, se lava con agua 5 veces y se mide la radiactividad. La unión obtenida es de 31.1 pmol/cm², lo que corresponde a una densidad de moléculas de 1.87×10^{13} moléculas/cm².

Ejemplo 3

Unión de oligonucleótidos 2

Un oligonucleótido sintético de 60 bases modificado en la posición 3' con un grupo amino, se marca radiactivamente con ^{32}P . Se prepara una disolución 0.23 mM del oligonucleótido marcado en tampón carbonato pH 8.5. Con esta disolución se impregna una lámina de kapton® CB de 25 μm (DuPont). Pasadas 5 h se elimina la solución con el oligonucleótido de la lámina, se lava con agua 5 veces y se mide la radiactividad como indicación de las moléculas unidas a la superficie. La unión obtenida es de 4.9 pmol/cm², lo que corresponde a una densidad de moléculas de 2.97×10^{12} moléculas/cm².

Ejemplo 4

Unión directa de nucleótidos modificados 1

El ejemplo siguiente presenta como se puede unir a un sustrato de poliimida oligonucleótidos marcados. Sobre una superficie de kapton® CB de 25 μm (DuPont), se hace circular una disolución 0.33 mM de dT-Tamra-NH₂ comercial en DMF con un 0.09% DIPEA. Transcurridas 5 h se lava la lámina con DMF y se mira la fluorescencia en un microscopio Leica DMR (modelo DC-350F). Se obtiene una superficie repleta de puntos fluorescentes discretos distribuidos homogéneamente por la zona donde se hizo pasar la solución del oligonucleótido marcado. Para descartar la adsorción se realiza el mismo experimento pero sin añadir DIPEA a la disolución. En este caso no se observa nada de fluorescencia en la superficie.

Ejemplo 5

Unión directa de nucleótidos modificados 2

En un primer paso se sintetiza dT-fluoresceína modificada en 3' con un grupo amino a partir de dT-fluoresceína comercial. Sobre una superficie de kapton® CB de 25 μm (DuPont), se hace circular una disolución 0.33 mM de dT-fluoresceína-NH₂ en DMF con un 0.09% DIPEA. Transcurridas 5h se lava la lámina con DMF y se mira la fluorescencia en un microscopio Leica DMR (modelo DC-350F). Se obtiene una superficie fluorescente homogénea en la zona donde se hizo pasar la solución del oligonucleótido marcado.

ES 2 245 899 B1

Ejemplo 6

Unión de nucleótidos modificados a través de un conector

5 El siguiente ejemplo muestra como la unión al sustrato de distintas moléculas puede hacerse a través de un conector intermediario. Más concretamente, como puede unirse un conector a la superficie del polímero de poliimida para posteriormente realizar enlaces a las moléculas de interés, como puede ser un oligonucleótido. Las láminas de kapton® HN 125 μm (DuPont) se sumergen, con agitación, en una disolución 10 mM de N,N'-dimetil-1,6-hexanodiamina en CH₃CN. Transcurridas 22 h 30 min, la superficie se lava con CH₃CN, se secan a vacío y se guardan a 4°C bajo argón.

10 Sobre el grupo amino introducido en el paso anterior se lleva a cabo la reacción de acoplamiento de un nucleótido mediante la aproximación del fosforamidito. Una lámina de kapton "activado" según se ha explicado anteriormente, se impregna con una disolución de dT-Tamra (1.4 mM) y 5-etiltio-1H-tetrazol (9.25 mM) en CH₃CN. Transcurridos 30 min se lava la superficie con MeOH y CH₃CN y se seca a vacío. Se impregna entonces la lámina con una disolución 15 1 M de ^tBuOOH/CH₃CN con agitación constante. Pasados 15 min, se lava con CH₃CN, se seca a vacío y se mira en el microscopio de fluorescencia. Se obtiene una superficie fluorescente homogénea en la zona donde se hizo pasar la solución del oligonucleótido marcado.

Ejemplo 7

Síntesis sobre kapton

20 El siguiente ejemplo muestra como puede realizarse un proceso de síntesis, preferentemente de oligonucleótidos sobre el sustrato de poliimida. Las reacciones se llevan a cabo sobre las láminas de kapton® CB de 25 μm de espesor del ejemplo 5, a las que se ha unido a su superficie dT-fluoresceína-NH₂ preparada sintéticamente. La lámina se introduce en un sistema fluídico especialmente diseñado para el proyecto. Los reactivos circulan sobre la muestra con flujo constante que puede ser diferente en cada paso. Los pasos de reacción se realizan consecutivamente, bajo Argón y separados por etapas de lavado con CH₃CN. Las condiciones de reacción de cada paso se indican a continuación:

- 30 - Desprotección del OH-5: 3% Cl₂CHCO₂H/(ClCH₂)₂, 5 min
- Acoplamiento: dT-tamra (1.4 mM), 5-etiltio-1H-tetrazol (9.2 mM) en CH₃CN, 20 min
35 - Oxidación: 1 M tBuOOH en CH₃CN, 10 min

Tras el último lavado, se saca la lámina del sistema y se mira la fluorescencia en condiciones de excitación y detección específicas para la rodamina, que es el fluoróforo introducido en el paso de elongación de la cadena. Se obtiene una superficie con puntos fluorescentes discretos distribuidos homogéneamente en la zona bañada por los reactivos.

Ejemplo 8

Hibridación de oligonucleótidos sobre kapton 1

45 El siguiente ejemplo muestra como puede realizarse un proceso de hibridación y su posterior detección, sobre el sustrato de poliimida. La hibridación se lleva a cabo sobre las láminas de kapton® CB de 25 μm de espesor a las que se ha unido a su superficie un oligonucleótido de 60 bases modificado con un grupo amino. En la hibridación se utilizan dos oligonucleótidos diferentes de 40 bases cada uno: el antisense como complementario del oligo previamente unido, y el sense como blanco para detectar la adsorción. Ambos oligos están marcados con ³²P. La hibridación se realiza 50 en 1 x SSC a 66°C durante 14 h. La radiactividad se detecta con un phosphoroimager (FUJI FLA-3000) durante 24 h con el fin de visualizar los resultados de la hibridación. En el experimento que se hibrida con el oligonucleótido complementario se observan altos niveles de radiactividad, mientras que en el que se hibrida con el "sense" se observan niveles de ruido de fondo.

Ejemplo 9

Hibridación de oligonucleótidos sobre kapton 2

60 El siguiente ejemplo muestra como puede realizarse un proceso de hibridación de oligonucleótidos y su posterior detección con muestras biológicas, sobre el sustrato de poliimida. La hibridación se lleva a cabo sobre dos láminas de kapton® CB de 25 μm de espesor a las que se ha unido a su superficie los oligonucleótidos Gal1-NH₂, ACT1-NH₂ respectivamente; una tercera lámina de kapton® CB se utiliza como blanco. En la hibridación se utilizan dos muestras de ARN provenientes del cultivo de una estirpe silvestre de *Saccharomyces cerevisiae* en dos medios diferentes, YPD (medio rico con glucosa, el gen GAL1 se encuentra reprimido) e YPGAL (medio rico con galactosa, el gen GAL1 se encuentra activado). Antes de su extracción el ARN se marca radiactivamente tras permeabilizar las células y añadir 65 UTP marcado con ³²P en su fosfato α .

ES 2 245 899 B1

Cada uno de los fragmentos de kapton se dividió en dos partes iguales, para hibridar una de ellos con la muestra proveniente del cultivo crecido en YPD y la otra con la proveniente de YPGAL. Tras una prehibridación realizada durante 1 h. a 65°C en un horno de hibridación rotatorio, se lleva a cabo la hibridación con las muestras radiactivas durante 12 h (SSC1x, SDS 0'1%, tRNA 100 µg/ml).

La radiactividad se detecta y cuantifica con un phosphororimager FUJI FLA-3000. Los datos de radiactividad, detraído en nivel de fondo, se muestran en la tabla II y están representados en la figura 1.

TABLA II

		Kapton con	
		GAL1	ACT1
ARN proveniente del cultivo con	GLUCOSA	1,88	170,4
	GALACTOSA	31,62	73,27

Ejemplo 10

Unión de una proteína al kapton

El siguiente ejemplo muestra como puede realizarse un proceso de unión de una proteína sobre el sustrato de poliimida. Se prepara una disolución 1 mg/mL de BSA MaxiBind (Abkem Iberia) en tampón borato pH 9.23 (Panreac). Con esta disolución se impregna una lámina de kapton® CB de 25 µm (DuPont). Pasadas 15 h a TA se elimina el líquido con la proteína, se lava 3 veces con Tween-20 (1%) durante 30 seg y 3 veces con agua durante 30 seg. La detección de la unión de la proteína a la superficie del kapton® CB se realiza de forma indirecta por fluorescencia.

Una lámina de Kapton con proteína unida a su superficie obtenida según se ha explicado anteriormente, se sumerge en una disolución de isotiocianato de fluoresceína en tampón borato pH 9.23 (1 mg/mL). Pasados 75 min se elimina la disolución sobrante y la lámina se lava con tampón borato pH 9.23 y agua. La fluorescencia se mide en un microscopio Leica DMR (modelo DC-350F), obteniéndose una superficie fluorescente en la zona que estuvo en contacto con la proteína.

Como blanco se utiliza una lámina de kapton® CB de 25 µm (DuPont) sometida al mismo proceso de unión del isotiocianato de fluoresceína. En este caso, en el que la lámina no ha estado en contacto con la proteína, no se observa fluorescencia en el microscopio en las mismas condiciones utilizadas anteriormente.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Soporte sólido para la unión y/o síntesis química en fase sólida que incluye una poliimida capaz de reaccionar con compuestos orgánicos que contengan grupos nucleófilos en su estructura bajo condiciones aptas para la formación de un enlace covalente entre ambos y **caracterizado** porque la poliimida incluye sustancias dopantes que modifican sus propiedades mecánicas, ópticas, su conductividad eléctrica o su conductividad térmica.
- 10 2. Soporte sólido para la unión y/o síntesis química en fase sólida según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la poliimida incluye una sustancia dopante que permite disminuir la emisión de fluorescencia.
- 15 3. Soporte sólido para la unión y/o síntesis química en fase sólida según la reivindicación 2, **caracterizado** porque cuando la sustancia dopante es grafito, carbono o sus derivados y la emisión de fluorescencia disminuye entre un 78% y un 95% respecto a la poliimida sin dopar.
- 20 4. Soporte sólido para la unión y/o síntesis química en fase sólida según las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** porque la poliimida se forma mediante condensación de anhídridos de ácido carboxílico bifuncionales con diaminas aromáticas primarias.
- 25 5. Soporte sólido para la unión y/o síntesis química en fase sólida según la reivindicación 4, **caracterizado** porque los anhídridos se seleccionan entre los siguientes: anhídrido maleico, anhídrido piromelítico, anhídrido trimelítico, dianhidrido 2,3,6,7-naftalen tetracarboxílico, dianhidrido 1,2,5,6-napftalen tetracarboxílico, dianhidrido 2,2',3,3'-bifenil tetracarboxílico, dianhidrido 3,3',4,4'-bifenil tetracarboxílico, dianhidrido bis(2,3-dicarboxifenil) metano, dianhidrido bis(3,4-dicarboxifenil) metano, dianhidrido 1,1-bis(2,3- dicarboxifenil) etano, dianhidrido 1,1-bis(3,4-dicarboxifenil) etano, dianhidrido 2,2-bis(3,4-dicarboxifenil) propano, dianhidrido bis(3,4-dicarboxifenil) propano, dianhidrido 3,4,9,10-perilen tetracarboxílico, dianhidrido 4,4'-oxidifitalico, dianhidrido 3,3',4,4'-benzofenona tetracarboxílico, dianhidrido bis(3,4-dicarboxifenil) sulfona y similares.
- 30 6. Soporte sólido para la unión y/o síntesis química en fase sólida según la reivindicación 4., **caracterizado** porque las aminas aromáticas se seleccionan entre los siguientes: *o*-diaminobenceno, *m*-diaminobenceno, *p*-diaminobenceno, tolueno diamino, 1,5-diamino naftalene, benzidina, 3,3'-dicloro benzidina, metilendianilina, 2,2-bis(4-aminofenil) propano, oxidianilina, 4,4'-diamino difenil sulfuro, 3,3'-diamino difenil sulfona, 4,4'-diamino difenil sulfona, 4,4'-diamino difenil N-metil amina., 4,4'-diamino difenil N-fenil amina, 4,4'-diamino difenil silano, 4,4'-diamino difenil dietilsilano, óxido de 4,4'-diamino difenil etil fosfina y similares.
- 35 7. Soporte sólido para la unión y/o síntesis química en fase sólida según las reivindicaciones 4-6, **caracterizado** porque la poliimida se forma mediante condensación de anhídrido piromelítico (PMDA) y oxidianilina (ODA).
- 40 8. Soporte sólido para la unión y/o síntesis química en fase sólida según las reivindicaciones 1-7, **caracterizado** porque la poliimida puede adoptar geometría diversa tal como películas, membranas, filamentos, capilares, canales, partículas, placas de microvaloración, espumas, hilos, mallas, tamices, hojas, varillas o manguitos.
- 45 9. Procedimiento de utilización del soporte sólido que incluye una poliimida según las reivindicaciones 1-8, **caracterizado** porque incluye las siguientes etapas:
- poner en contacto la superficie del soporte sólido que tiene grupos imida reactivos con una disolución de un compuesto orgánico que tiene un grupo nucleófilo en su estructura bajo condiciones aptas para la formación de un enlace covalente entre ambos.
 - llevar a cabo el análisis objetivo de los compuestos unidos covalentemente al soporte sólido.
- 50 10. Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 9, **caracterizado** porque el compuesto orgánico unido covalentemente al soporte sólido constituye un producto de partida para procesos de síntesis química que den lugar al compuesto final unido covalentemente a dicho soporte sólido.
- 55 11. Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 9, **caracterizado** porque el enlace covalente se produce entre los grupos nucleófilos del compuesto orgánico que se va a unir y los carbonos carbonílicos del grupo imida de la superficie del soporte sólido.
- 60 12. Procedimiento de utilización del soporte sólido según las reivindicaciones 9 y 11, **caracterizado** porque la formación del enlace covalente entre el grupo nucleófilo del compuesto orgánico y la superficie del soporte sólido da lugar a la apertura del grupo imida generando enlaces amida repartidos homogéneamente a lo largo de la superficie del soporte sólido.
- 65 13. Procedimiento de utilización del soporte sólido según las reivindicaciones 9, 11 y 12 **caracterizado** porque el grupo nucleófilo del compuesto orgánico tiene un par de electrones libres que son compartidos para formar un nuevo enlace.

ES 2 245 899 B1

14. Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 13, **caracterizado** porque el grupo nucleófilo se selecciona preferentemente entre aminas, alcoholes, tioles, derivados de P, éteres y tío-éteres.
- 5 15. Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 9, **caracterizado** porque la disolución del compuesto orgánico puede ser neutra o básica, en disolventes orgánicos o agua.
16. Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 15, **caracterizado** porque las disoluciones básicas incluyen bases orgánicas o inorgánicas.
- 10 17. Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 16, **caracterizado** porque la base orgánica se selecciona del grupo de aminas alifáticas terciarias.
18. Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 16, **caracterizado** porque la base inorgánica se selecciona del grupo de los carbonatos.
- 15 19. Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 15, **caracterizado** porque el disolvente orgánico se selecciona de entre DMF, NMP, CH₃CN y MeOH.
20. Procedimiento de utilización del soporte sólido según las reivindicaciones 9 y 10, **caracterizado** porque los compuestos orgánicos incluyen polímeros de interés biológico (biopolímeros), los productos de partida necesarios para la síntesis de esos biopolímeros, y pequeñas moléculas que se pueden utilizar como espaciadores y/o conectores tanto para los biopolímeros como para los productos de partida para realizar la síntesis en fase sólida.
- 20 21. Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 20, **caracterizado** porque los biopolímeros incluyen péptidos, oligonucleótidos, ácidos nucleicos, PNAs, LNAs, proteínas, glicoproteínas, lípidos, fosfolípidos, carbohidratos, oligosacáridos y mezclas de los mismos.
- 25 22. Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 21, **caracterizado** porque los biopolímeros están modificados con un grupo nucleófilo capaz de formar un enlace covalente con los grupos imida de la superficie del soporte sólido.
- 30 23. Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 21, **caracterizado** porque los biopolímeros están modificados con un espaciador y/o conector que contiene un grupo nucleófilo capaz de formar un enlace covalente con los grupos imida de la superficie del soporte sólido.
- 35 24. Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 21, **caracterizado** porque los biopolímeros están modificados con un grupo capaz de formar un enlace covalente con el grupo reactivo del espaciador y/o conector unido al soporte sólido.
- 40 25. Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 20, **caracterizado** porque los productos de partida incluyen aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, monosacáridos y los monómeros y sus derivados que se utilizan en la síntesis de dichos biopolímeros.
- 45 26. Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 25, **caracterizado** porque los productos de partida están modificados con un grupo nucleófilo capaz de formar un enlace covalente con los grupos imida de la superficie del soporte sólido.
- 50 27. Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 25, **caracterizado** porque los productos de partida están modificados con un espaciador y/o conector que contiene un grupo nucleófilo capaz de formar un enlace covalente con los grupos imida de la superficie del soporte sólido.
- 55 28. Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 25, **caracterizado** porque los productos de partida están modificados con un grupo capaz de formar un enlace covalente con el grupo reactivo del espaciador y/o conector unido al soporte sólido.
- 60 29. Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 20, **caracterizado** porque los espaciadores y/o conectores incluyen moléculas orgánicas con un grupo nucleófilo que reacciona con la poliimida y otro grupo reactivo donde se une covalentemente el biopolímero o su producto de partida.
- 60 30. Procedimiento de utilización del soporte sólido según las reivindicaciones 23 y 27 **caracterizado** porque los biopolímeros y sus productos de partida están modificados con un espaciador y/o conector que contiene un grupo capaz de formar un enlace covalente con el grupo reactivo del espaciador y/o conector unido al soporte sólido.
- 65 31. Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 10, **caracterizado** porque el proceso de síntesis química que se lleva a cabo sobre los productos de partida incluye las reacciones químicas específicas para la obtención del compuesto orgánico de interés.

ES 2 245 899 B1

32. Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 31, **caracterizado** porque el proceso de síntesis química incluye las reacciones químicas habituales en la síntesis de oligonucleótidos.

5 33. Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 31, **caracterizado** porque el proceso de síntesis química incluye uno o varios ciclos que constan de:

- desprotección de la posición sobre la que se va a elongar la cadena.
- acoplamiento del monómero concreto en cada momento.
- 10 - inactivación de las posiciones libres que no han reaccionado.
- oxidación a fosfato.

15 34. Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 33, **caracterizado** porque opcionalmente se lleva a cabo tras los ciclos de elongación de la cadena la desprotección de las bases y/o la separación del soporte sólido.

20 35. Procedimiento de utilización del soporte sólido según las reivindicaciones 9-34, **caracterizado** porque sobre el soporte sólido de poliimida con biomoléculas unidas covalentemente se realizan experimentos de interacción entre los compuestos unidos y otras biomoléculas y/o compuestos orgánicos.

25 36. Procedimiento de utilización del soporte sólido según la reivindicación 35, **caracterizado** porque esas interacciones se pueden medir por fluorescencia, radioactividad o cualquier otro método utilizado habitualmente.

30 37. Procedimiento de utilización de un soporte sólido según las reivindicaciones 9 a 36 para la preparación de matrices ("arrays") y micromatrices ("microarrays") de ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, proteínas, polisacáridos, y cualquier tipo de librerías de compuestos químicos ordenados.

35

40

45

50

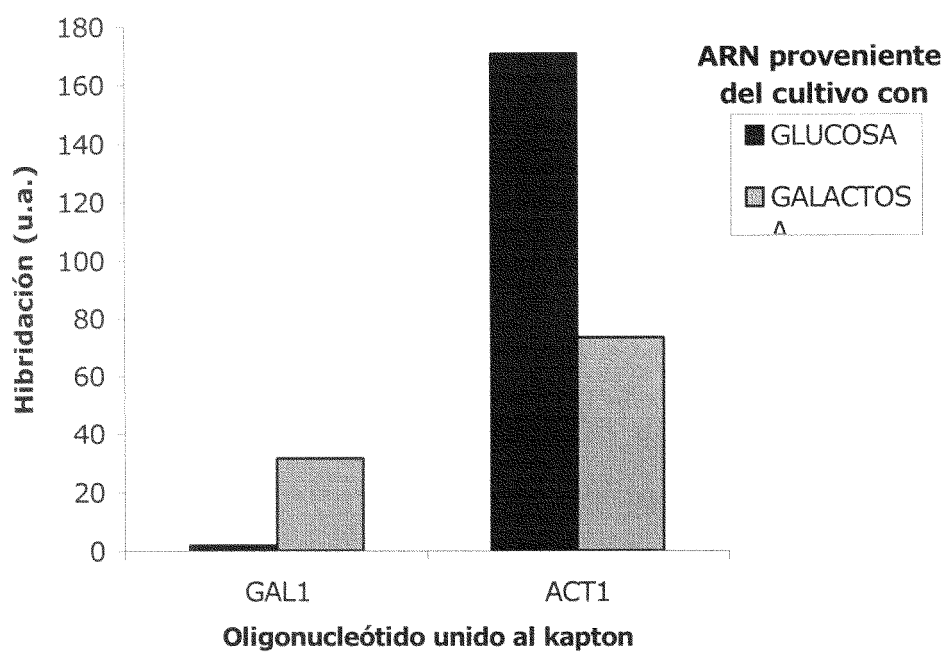
55

60

65

70

Figura 1





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 245 899

② Nº de solicitud: 200401733

③ Fecha de presentación de la solicitud: **15.07.2004**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **G01N 33/543** (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2190897 A1 16.08.2003, ejemplo 1.	1
A	WO 9959722 A1 25.11.1999	1-37
A	US 5356374 A 18.10.1994	1-37

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
29.07.2005

Examinador
M. Ojanguren Fernández

Página
1/1