

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 714**

51 Int. Cl.:
C07K 17/02 (2006.01)
C07K 17/06 (2006.01)
C09D 135/06 (2006.01)
G01N 33/547 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03718551 .9**
96 Fecha de presentación: **09.05.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1534755**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2005**

54 Título: **GENERACIÓN DE DIVERSIDAD DE RECUBRIMIENTOS DE SUPERFICIE.**

30 Prioridad:
10.05.2002 US 379966 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.02.2012

73 Titular/es:
BIO-LAYER PTY LIMITED
UNIT 4, 26 BRANDL STREET, BRISBANE
TECHNOLOGY PARK
EIGHT MILE PLAINS, QUEENSLAND 4113, AU

72 Inventor/es:
BARDEN, Michael, C y
KAMBOURIS, Peter, A

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 373 714 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

Generación de diversidad de recubrimientos de superficie

5 Campo de la invención:

10 La presente invención está relacionada con la tecnología de los recubrimientos de superficie. En particular, la invención está relacionada con un método para generar una biblioteca de distintos recubrimientos de superficie sobre un sustrato; con un método para la optimización de una superficie de sustrato para su aplicación en fase sólida y matrices o cuentas que poseen distintas regiones de recubrimientos de superficie optimizados particulares.

Antecedentes de la invención:

15 La tecnología de recubrimientos de superficie actual proporciona un número relativamente limitado de superficies establecidas que pueden utilizarse en nuevas aplicaciones químicas o bioquímicas de fase sólida. La falta de superficies establecidas radica principalmente en la dificultad asociada a la generación de recubrimientos de superficie distintos. Mientras que actualmente se puede generar sin gran dificultad un gran número de compuestos químicamente distintos en solución, la habilidad para enlazar esas moléculas en una fase sólida y crear un gran número de recubrimientos de superficie ha supuesto un problema mucho más difícil de resolver. En particular, la química para enlazar moléculas sobre fases sólidas para crear recubrimientos de superficie es altamente imprevisible, y hasta la fecha, se ha mantenido más como un arte que como una ciencia.

25 Existen numerosas aplicaciones en las que sería ventajoso un rango diverso de recubrimientos de superficie novedosos, como por ejemplo en el área de los ensayos biológicos de fase sólida. Con el número de proteínas nuevas creciendo cada día, existe la creciente necesidad de superficies novedosas de fase sólida que sean compatibles con la inmovilización de estas macromoléculas complejas. Hasta la fecha, a pesar de esta necesidad, en la práctica tan sólo hay disponibles unas pocas superficies sólidas entre el amplio rango de aplicaciones en fase sólida utilizadas para estudiar moléculas biológicas. Por ejemplo, en el área de captura y exposición de biomoléculas, cada proveedor comercial tiene su propia realización para superficies en fase sólida que se prescribe en una amplia gama de aplicaciones específicas. Un ejemplo específico es una superficie generada utilizando la consolidada reacción química con PEG (polietilenglicol) como se describe en un artículo de Ruiz-Taylor et al. ("Monolayers of derivatized poli(L-lysine)-grafted poli(etilen glycol) on metal oxides as a class of biomolecular interfaces," PNAS EEUU 98: 852-857 (2001)). Otro ejemplo es la relativamente reciente reacción química con complejos de ácido borónico utilizada para preparar superficies para la inmovilización de proteínas, descrita por Stolowitz et al. ("Fenilboronic Acid-Salicilhidroxamic Acid Bioconjugates. 1. A Novel Boronic Acid Complex for Protein Immobilization," Bioconjugate Chemistry 12: 229-239 (2001)).

40 Actualmente, la resonancia de plasmón superficial (SPR, del inglés *surface plasmon resonance*) se ha adoptado de forma general como técnica para la detección de interacciones de unión del tipo proteína-ligando y proteína-proteína. No obstante, la utilidad de la SPR en relación a un sistema de proteínas particular depende en gran medida de las peculiaridades con las que esa macromolécula se une a la superficie del sustrato sólido durante la inmovilización. Si una superficie de SPR particular provoca que una proteína de interés se una en una orientación desfavorable para la detección de la unión de los ligandos, sólo existe un puñado de superficies alternativas con un rango limitado de propiedades de unión de entre las cuales escoger (ver, por ejemplo Rich y Myszka "Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis," Current Opinion in Biotechnology 11: 54-61 (2000)).

50 De modo similar, hoy en día también se emplea extensamente la espectrometría de masas para el análisis de macromoléculas biológicas. Generalmente, estos métodos incluyen la inmovilización de una proteína sobre una superficie de un sustrato, en la que ésta se expone luego a una interacción de unión de ligando. A continuación de la unión (o no unión) a un ligando, la molécula se separa de la superficie y se absorbe en el espectrómetro utilizando un láser (ver, por ejemplo Merchant y Weinberger, "Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionización-time of flight-mass spectrometry," Electrophoresis 21: 1164-1177 (2000)). Como en el experimento con SPR, el éxito del experimento de la espectrometría de masas depende en gran medida de la interacción entre la proteína inmovilizada y la superficie. En vista de los miles de proteínas con diferentes interacciones de superficie, existe la clara necesidad de un mayor número de superficies de sustrato distintas para que se pueda aplicar exitosamente la espectrometría de masas para el análisis de alto rendimiento del proteoma.

60 La patente WO 00/12575 describe un método para la síntesis paralela y combinatoria de compuestos unidos a un material de soporte de fase sólida, polimérico y continuo.

La patente US 6.403.368 describe un portaobjetos/ microchip mejorado hidrofílico con puntos en su superficie.

65 La patente WO 02/40171 describe un aparato y un método para la separación de una mezcla de sólidos que contienen metales.

La patente US 6.346.413 describe las estrategias sintéticas para la creación de diversidad química a gran escala.

La patente US 5.922.545 describe los métodos para la identificación de péptidos y anticuerpos de cadena simple que se unen a receptores o epítos predeterminados.

5

La patente US 6.329.209 describe matrices de agentes que capturan proteínas.

10

Consecuentemente, la incapacidad para proporcionar una matriz diversa de recubrimientos de superficie representa un impedimento para el desarrollo de tecnologías biológicas en fase sólida, tales como los diagnósticos y ensayos biológicos, y biomateriales. Tal impedimento también se extiende sobre un amplio espectro de tecnologías, incluyendo la síntesis química en fase sólida, el desarrollo de la catálisis o las tecnologías de separación y purificación.

15

RESUMEN DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para la generación de una biblioteca de recubrimientos de superficie diferentes sobre un sustrato que incluye:

20

a) la selección de un sintón de recubrimiento de superficie con la fórmula B-S-F, en el que B es un copolímero de a menos un constituyente monomérico P y al menos un constituyente monomérico A, S es una unidad espaciadora y F es un grupo funcional capaz de actuar como punto para modificaciones adicionales de la superficie, en el que S se une a un constituyente monomérico A del copolímero B, y en el que el sintón tiene al menos un punto de diversidad seleccionado entre P, A, S y F;

25

b) la aplicación de un(os) recubrimiento(s) basal(es) del copolímero B seleccionado sobre un sustrato;

c) la unión de la(s) combinación(es) seleccionada(s) de la unidad espaciadora S y del grupo funcional F sobre el constituyente A del copolímero B de acuerdo con dicho sintón seleccionado;

30

en el que los pasos b) y c) se llevan a cabo de tal manera que los recubrimientos de superficie de acuerdo con el sintón se generan en regiones localizadas del sustrato, proporcionando así dicha biblioteca de diferentes recubrimientos de superficie sobre un sustrato.

35

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para la optimización de la superficie de un sustrato para su aplicación en fase sólida, incluyendo la inmovilización de una molécula, que se basa en:

a) la generación de una biblioteca de recubrimientos de superficie distintos sobre un sustrato mediante un método que incluye:

40

1) la selección de un sintón de recubrimiento de superficie con la fórmula B-S-F, en el que B es un copolímero de al menos un constituyente P monomérico y a menos un constituyente A monomérico, S es una unidad espaciadora y F es un grupo funcional capaz de actuar como punto para modificaciones adicionales de la superficie, en el que S se une a un constituyente A monomérico del copolímero B, y en el que el sintón tiene al menos un punto de diversidad seleccionado entre P, A, S y F;

45

2) la aplicación de un(os) recubrimiento(s) basal(es) del copolímero B seleccionado sobre un sustrato;

3) la unión de la(s) combinación(es) seleccionada(s) de la unidad espaciadora S y del grupo funcional F sobre el constituyente A del copolímero B de acuerdo con dicho sintón seleccionado;

50

en el que los pasos 2) y 3) se llevan a cabo de tal manera que los recubrimientos de superficie de acuerdo con el sintón se generan en regiones localizadas del sustrato, proporcionando así dicha biblioteca de diferentes recubrimientos de superficie sobre un sustrato.

55

b) la exposición de al menos dos de los recubrimientos de superficie de la biblioteca a la molécula que se va a inmovilizar; y

c) determinar cual de las al menos dos superficies da como resultado un mejor funcionamiento de la molécula inmovilizada en la aplicación en fase sólida.

60

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una unidad de detección de moléculas biológicas capaz de detectar al menos dos moléculas biológicas, en la que dicha unidad contiene un sustrato que tiene una gran variedad de recubrimientos de superficie y en la que al menos dos de dichos recubrimientos son diferentes, y adaptada para que reconozca, se una o se asocie a una molécula biológica particular. Una persona experta en la materia debe ser capaz de adaptar los métodos descritos aquí para preparar tal unidad de detección.

65

La presente invención proporciona un método para la generación de una biblioteca de recubrimientos de superficie diferentes sobre un sustrato que puede utilizarse ventajosamente como parte de un sistema de recubrimiento de superficies. La biblioteca se genera utilizando un método de sintón único que proporciona un marco arquitectónico a partir del cual se pueden realizar los recubrimientos de superficie específicos.

La presente invención llena un vacío crítico en la tecnología de superficies sólidas mediante la provisión de una plataforma de alto rendimiento para la generación y la exploración racional de recubrimientos de superficie con propiedades macroscópicas y moleculares nuevas. Las diversas bibliotecas combinatorias de recubrimientos de superficie que pueden generarse del modo de alto rendimiento que utiliza el método basado en el sintón descrito aquí pueden aplicarse sobre un amplio espectro de tecnologías, incluyendo la síntesis en fase sólida, el desarrollo de la catálisis, las tecnologías de separación y purificación, los ensayos y diagnósticos biológicos, y el desarrollo de biomateriales.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIBLES

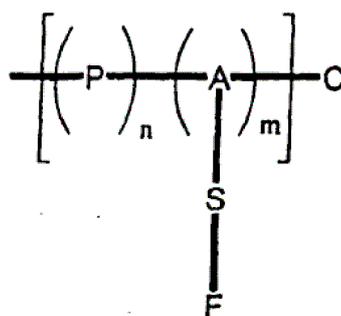
El sintón

Tal y como se utiliza aquí, el término "sintón" se utiliza para hacer referencia a una unidad química fundamental, o un elemento clave, que proporciona un marco arquitectónico para diseñar y desarrollar una matriz diversa de recubrimientos de superficie sobre un sustrato. El sintón contiene tres elementos básicos y puede representarse de un modo simplista como B-S-F, en el que B es un copolímero de al menos un constituyente monomérico P y a menos un constituyente monomérico A, S es una unidad espaciadora y F es un grupo funcional capaz de actuar como punto para modificaciones adicionales de la superficie. La unidad espaciadora S se une a un constituyente monomérico A del copolímero B, y el sintón tiene al menos un punto de diversidad seleccionado entre P, A, S y F;

Conjuntamente, la unidad espaciadora y el grupo funcional forman un "asa funcional" que puede modificarse adicionalmente con entidades químicas. La simple variación química combinatoria de los cuatro puntos de diversidad (es decir, el constituyente P, el constituyente A, la unidad espaciadora y el grupo funcional) del sintón descrito anteriormente permite la generación potencial de miles de superficies únicas pero relacionadas. La variación sistemática del constituyente A, el constituyente P, la unidad espaciadora y el grupo funcional permite la generación de bibliotecas de diferentes recubrimientos de superficie que abarcan una gran variedad de propiedades microscópicas y macroscópicas. Estas bibliotecas de superficies pueden explorarse adicionalmente utilizando una variedad de técnicas de análisis para descubrir la superficie óptima para una diversidad de aplicaciones. Consecuentemente, el método basado en el sintón para generar diversidad de recubrimientos de superficie descrito aquí proporciona una plataforma semejante para la síntesis combinatoria de bibliotecas de pequeñas moléculas y péptidos.

Aunque se han empleado métodos combinatorios para generar diversidad molecular en la generación de nuevos compuestos principales en el proceso de descubrimiento de fármacos, hasta la fecha estas estrategias no se han utilizado en la búsqueda de nuevos recubrimientos de superficie que muestren propiedades ventajosas. De hecho, los métodos químicos combinatorios estándar de fase sólida utilizados en el descubrimiento de fármacos se centran en la generación de variedad en las propiedades de la molécula pequeña y evitan la diversidad en la fase sólida a la cual ésta se adhiere. La fase sólida se contempla simplemente como un soporte conveniente del que deshacerse tras la escisión de la molécula pequeña. Consecuentemente, ha habido muy poca exploración sistemática de las superficies de fase sólida y de cómo sus propiedades pueden variarse para optimizar las aplicaciones en fase sólida. Conjuntamente, la unidad espaciadora y el grupo funcional forman una "asa funcional" que puede modificarse adicionalmente con entidades químicas. El esquema 1 a continuación ilustra una representación más detallada de una estructura potencial del sintón.

Esquema 1



En el esquema 1, el sintón además incluye un agente controlador C que puede unirse adicionalmente al copolímero B, representado como -[P-A]-. El agente controlador C puede utilizarse como medio para preparar el copolímero B

- bajo condiciones de polimerización viva/controlada, o alternativamente como medio para modificar el copolímero B. Los agentes controladores preferibles incluyen, pero no se limitan a, agentes controladores de la transferencia de la cadena de adición - fragmentación reversible (RAFT, del inglés *reversible addition-fragmentation chain transfer*), agentes controladores de polimerización de radicales por transferencia atómica (ATRP, del inglés *atom transfer radical polymerization*) y agentes controladores de nitróxido. La utilización de un agente controlador proporciona de forma ventajosa un medio para diseñar y controlar cuidadosamente la arquitectura molecular del copolímero B, por ejemplo mediante el control de la distribución del peso molecular y/o la distribución de las unidades monoméricas de la cadena del copolímero.
- La variación combinatoria simple de los cuatro puntos de diversidad (es decir, el constituyente P pasivo, el constituyente A, la unidad espaciadora, y el grupo funcional) que forman el sintón básico descrito anteriormente permite la generación potencial de miles de superficies únicas pero relacionadas. En una realización preferible, la diversidad deriva solamente de la unidad espaciadora S. En otra realización preferible, la diversidad deriva solamente del grupo funcional F. En aún otra realización preferible, la diversidad deriva tanto de la unidad espaciadora S como del grupo funcional F.
- En un ejemplo relativamente simple, se empieza con un tratamiento de recubrimiento basal sobre un material base (es decir, en el que los constituyentes P y A se mantienen constantes) con al menos diez variantes de la unidad espaciadora S y 10 transformaciones diferentes del grupo funcional F, da como resultado 100 superficies diferentes.
- Por supuesto, se pueden alcanzar números mayores de compuestos diferentes si se incorpora un agente controlador C como otro punto de diversidad. El agente controlador puede utilizarse como el punto de inicio para las reacciones de polimerización viva-controlada. Consecuentemente, el recubrimiento basal puede modificarse mediante la polimerización viva-controlada independiente de las modificaciones en la unidad espaciadora adherida al constituyente activo del recubrimiento basal.
- Adicionalmente, se puede lograr la diversidad mediante la utilización de estrategias de reacción ortogonal y/o la combinación de mezclas de elementos en la construcción de los sintones.
- Ventajosamente, la presente invención permite la construcción de bibliotecas que contienen preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 100, aún más preferiblemente al menos 1.000, lo más preferible al menos 10.000 recubrimientos de superficie diferentes.
- Preferiblemente, la biblioteca de acuerdo con la presente invención está preparada en un formato múltiple, y la biblioteca también se utiliza en un formato múltiple.
- El recubrimiento basal y sus parámetros
- La presente invención incluye la aplicación de un(os) recubrimiento(s) basal(es) del copolímero B seleccionado sobre un sustrato. El recubrimiento basal proporciona el elemento de diseño macroscópico del método y se une preferiblemente de forma covalente al sustrato subyacente. En una realización preferible, el recubrimiento basal se une al sustrato subyacente mediante métodos conocidos de enlace de polímeros, u otros métodos de recubrimiento de un sustrato sólido tales como el recubrimiento por inmersión, la polimerización por plasma, la deposición de vapor, la impresión por sellado, la irradiación gamma, la exposición a un haz de electrones, la radiación térmica y la fotoquímica.
- Como recubrimiento basal, el copolímero B incluye al menos un constituyente P monomérico y al menos un constituyente A monomérico. Estos constituyentes pueden verse como unidades monoméricas dentro del copolímero B. El copolímero B puede contener también otras unidades monoméricas. En algunas realizaciones, el recubrimiento basal puede incluir más de un constituyente A y más de un constituyente P. Tal y como se describe con mayor detalle más adelante, los constituyentes A y P pueden seleccionarse a partir de un amplio espectro de compuestos bien conocidos en la materia. Se prefieren los compuestos sensibles al proceso de enlace u otros métodos de recubrimiento de un sustrato sólido (por ejemplo, recubrimiento por inmersión, la polimerización por plasma, la deposición de vapor, la impresión por sellado, la irradiación gamma, la exposición a un haz de electrones, la radiación térmica y la fotoquímica).
- Generalmente, el recubrimiento basal puede unirse al sustrato subyacente mediante tanto el constituyente A como el P. En algunas realizaciones, ambos constituyentes pueden estar implicados en las interacciones de unión con el sustrato.
- Constituyente A
- El rol del constituyente A es el de proporcionar un punto para la futura diversidad y se representaría mediante un grupo funcional conocido en la materia por experimentar un gran número de transformaciones químicas, tal como una amina, un hidroxilo, un anhídrido, un éster, un ácido carboxílico, una cetona, un epóxido, un isocianato, etcétera. Muchos monómeros químicos conocidos pueden utilizarse como constituyentes A en la formación de un

recubrimiento basal de un sustrato. La selección de un conjunto particular de constituyentes A puede depender de los constituyentes P seleccionados y de la reacción química deseada para aplicar el recubrimiento basal sobre el sustrato.

5 Generalmente, el constituyente A incluye una porción química, o grupo sustitutivo que puede modificarse químicamente con un compuesto espaciador (ver la descripción más abajo).

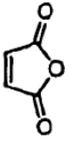
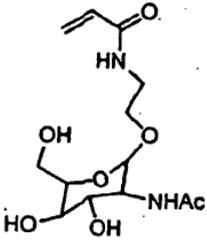
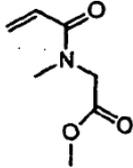
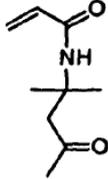
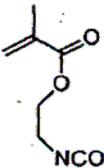
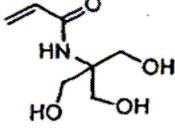
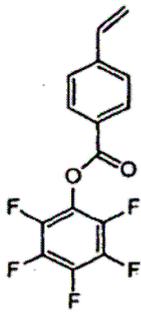
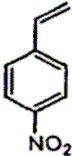
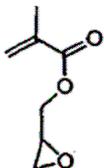
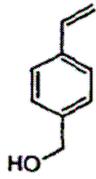
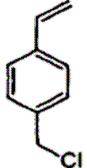
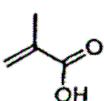
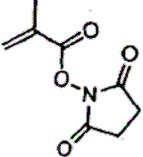
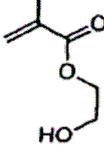
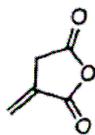
10 Por ejemplo, en una realización en la que se emplea el enlace gamma-iniciado libre de radicales, se podrían utilizar cualquiera de los siguientes monómeros como constituyente A en el recubrimiento basal: hidroxietilmetacrilato, anhídrido maleico, éster de N-hidroxisuccinimida metacrilato, ácido metacrílico, acrilamida de diacetona, glicidilmetacrilato, PEG-metacrilato.

15 En una realización alternativa, puede haber más de un constituyente A diferente en el mismo recubrimiento basal. Por ejemplo, el recubrimiento puede hacerse utilizando una mezcla de dos monómeros de constituyente A. Una vez preparados, mediante la utilización de métodos ortogonales de transformación química conocidos es posible modificar diferencialmente cada uno de los constituyentes A en presencia de los otros, de forma secuencial y predeterminada.

20 En realizaciones preferibles, el constituyente A contiene una porción química, o un grupo sustitutivo que es sensible a los métodos de enlace de superficie conocidos en la materia.

25 La Tabla 1 a continuación enumera una selección ejemplar de monómeros químicos que pueden utilizarse para proporcionar los constituyentes A en la presente invención. Los compuestos en esta Tabla no pretenden ser limitantes. También pueden utilizarse muchas de las variantes químicas comunes de estos compuestos, así como otros compuestos no enumerados aquí pero conocidos en la materia de modificación de superficies. Preferiblemente, el copolímero B contiene un constituyente A derivado del residuo polimerizado del anhídrido maleico.

Tabla 1: Selección de Constituyentes A

ACTIVO	1	2	3	4
A				
B				
C				
D				

Constituyente P

5 Mientras el constituyente A actúa principalmente como el punto de fijación del espaciador, el rol principal del constituyente P es la modificación del ambiente molecular o macroscópico del recubrimiento de superficie. Por ejemplo, un conjunto de constituyentes P puede seleccionarse para que modifique la carga o la hidrofili-
 10 dad del recubrimiento de superficie. Las modificaciones de los constituyentes P en un sistema tridimensional estable que forma un recubrimiento de superficie permiten la determinación de las propiedades de superficie óptimas para las aplicaciones en fase sólida. Por ejemplo, la determinación de una superficie que permite la unión de epítopos no contiguos de una biomolécula de tal manera que estos estén disponibles para un ensayo de unión.

15 Además, el constituyente P también puede actuar como unidad espaciadora para el compuesto activo del recubrimiento, con tal de distribuir el constituyente A de manera alterna, aleatoria, estadística o en gradiente a lo largo del recubrimiento.

La química del constituyente P puede estar proporcionada por monómeros químicos bien conocidos (preferiblemente aquellos que están comercialmente disponibles) tal como: estireno, dimetilacrilamida acrilonitrilo, N, N-dimetil (o dietil) etilmetacrilato, hidróxido de 2-metacrililoiloxi-etil-dimetil-3-sulfopropil-amonio, y metoxi-PEG-metacrilato. Preferiblemente, el copolímero B incluye un constituyente P derivado del residuo polimerizado del estireno.

5 En realizaciones preferibles, el constituyente P contiene una porción química, o un grupo sustitutivo sensible a los métodos de enlace de superficie conocidos en la materia.

10 La Tabla 2 a continuación enumera una selección de monómeros químicos que pueden utilizarse para proporcionar los constituyentes P en la presente invención. Los compuestos en esta Tabla no pretenden ser limitantes. También pueden utilizarse muchas de las variantes químicas comunes de estos compuestos, así como otros compuestos no enumerados aquí pero conocidos en la materia de la modificación de superficie.

15 En una realización alternativa, la propiedad macroscópica deseada de un recubrimiento de superficie para una aplicación en fase sólida seleccionada puede derivar de un análisis *in silico* de una gama de estructuras sintón. Basándose en los resultados *in silico*, se puede sintetizar un monómero constituyente pasivo con las características químicas necesarias para general la propiedad macroscópica. Alternativamente, las características químicas apropiadas del constituyente pasivo también pueden derivar de la transformación química *in situ* de un recubrimiento basal ya aplicado. En realizaciones preferibles, tales transformaciones *in situ* del constituyente P del recubrimiento

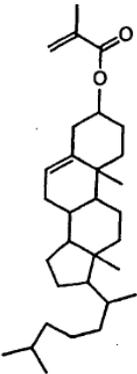
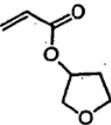
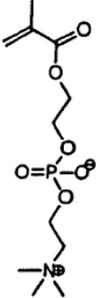
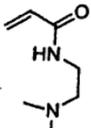
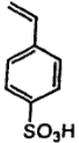
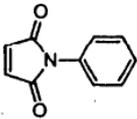
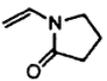
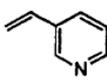
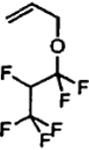
20 basal se llevan a cabo siguiendo una estrategia de reacción ortogonal con tal de mantener la integridad del constituyente A.

Tabla 2: Selección de Constituyentes P

25

PASIVO	1	2	3	4	5
A					
B					

(Continuación)

PASIVO	1	2	3	4	5
c					
d					

Aplicación del recubrimiento basal

Generalmente, el recubrimiento basal del sintón puede aplicarse sobre el sustrato utilizando cualquiera de los métodos de modificación de superficie presentes en el amplio surtido existente en la materia (por ejemplo, recubrimiento por inmersión, la polimerización por plasma, la deposición de vapor, la impresión por sellado, la irradiación gamma, la exposición a un haz de electrones, la radiación térmica y la fotoquímica).

En una realización, el recubrimiento basal se polimeriza a partir de los monómeros del constituyente sobre un sustrato sólido utilizando reacciones químicas conocidas en la materia. Pueden utilizarse un amplio rango de procesos de polimerización existentes en la materia. Por ejemplo, pueden utilizarse técnicas de polimerización controlada y/o viviente catiónica, aniónica, radical (tales como NMP (polimerización mediada por nitroxidos), ATP, ATRP, RAFT, Iniferter), de condensación, y metátesis (tales como ROMP (polimerización metatésica por apertura del anillo) y ADMET (polimerización metatésica de dienos acíclicos)). Con esta invención, también pueden utilizarse métodos no controlados de polimerización bien conocidos en la técnica.

En una realización preferible, el recubrimiento basal puede proporcionarse mediante métodos conocidos por proporcionar una polimerización viva. Por definición, los grupos finales de cada polímero viviente tienen la capacidad de ser transformados adicionalmente, ya sea mediante la adición de un monómero para extender la macromolécula con el mismo monómero, con una mezcla de monómeros o bien con nuevos compuestos monoméricos. Además, los grupos finales pueden modificarse mediante la utilización de cualquiera de las transformaciones químicas orgánicas bien conocidas dentro de la gamma existente en la materia de la manipulación de moléculas pequeñas.

En las realizaciones en las que el sintón incluye un agente controlador (C) como grupo final en el recubrimiento basal, se puede utilizar la polimerización viva-controlada para modificar adicionalmente el recubrimiento basal. Los agentes controladores y los métodos para llevar a cabo la polimerización viva-controlada se conocen bien en la materia. Los métodos de polimerización viva-controlada y de reiniciación sobre las superficies de sustratos sólidos no funcionalizados se describen en la solicitud de la patente en curso de EEUU 10/109.777 archivada el 28 de marzo de 2002. También ver, por ejemplo, las solicitudes de las patentes canadienses 2.341.387 y 2.249.955 que describen métodos de polimerización viva-controlada sobre sustratos de polímeros sólidos.

Alternativamente, el recubrimiento basal puede aplicarse sobre el sustrato en forma de solución de polímero, incluyendo macrómeros que permitirán el agarre a la superficie del sustrato mediante reacciones químicas complementarias o que potenciarán el enredijo del polímero en solución con el sustrato. En el caso de una solución de macrómeros, las unidades reactivas del macrómero pueden presentarse o bien en los grupos finales o estar espaciadas a lo largo del recubrimiento basal del macrómero de manera aleatoria, en bloque o por gradiente.

Preferiblemente, el recubrimiento basal se polimeriza a partir de los monómeros del constituyente para proporcionar un copolímero alterno o en bloque. Se cree que la característica alterna, o esencialmente alterna del copolímero proporciona una importante distribución espacial de los constituyentes P y A, lo que facilita un buen recubrimiento de superficie del sustrato. Los expertos en la materia entenderán el grado de regularidad necesario para que se considere que el copolímero tiene características alternas. Es preferible que el copolímero alterno tenga una característica alterna definida por un porcentaje superior al 70 % de unidades de residuo de comonómero

consecutivas alternadas entre residuos del primer comonomero y del segundo comonomero, más preferiblemente superior al 90%. La naturaleza en bloque del copolímero también puede variar de manera alterna.

Preferiblemente, el recubrimiento basal es un copolímero de anhídrido maleico y estireno.

El espaciador

El grupo espaciador proporciona un "asa" sintética mediante la cual los grupos funcionales se pueden unir al constituyente A del recubrimiento basal.

Tal y como se utiliza aquí, el término "espaciador," "molécula espaciadora" y "unidad espaciadora" pueden utilizarse indistintamente. Tal y como se utiliza aquí, el término "asa funcional" se utiliza para hacer referencia a la porción combinada de la molécula espaciadora modificada con el grupo funcional deseado para el sintón.

En una realización preferible, la molécula espaciadora puede representarse por la estructura genérica mostrada en el esquema 2:

Esquema 2:

X-Q-Y

Generalmente, tanto X como Y incluyen porciones químicas o grupos sustitutivos que pueden modificarse químicamente de forma independiente, secuencial o bajo condiciones ortogonales. Por ejemplo, X puede reaccionar químicamente con el constituyente A activo para unir el espaciador al recubrimiento basal. Posteriormente, Y puede modificarse químicamente con el grupo funcional F deseado.

Las especies típicas pueden incluir por ejemplo, moléculas espaciadoras en las que X es el residuo de un amino, hidroxilo, tiol, ácido carboxílico, anhídridos, isocianato, cloruro de sulfonilo, anhídrido sulfónico, cloroformato, acetona, o aldehído; Y es igual a lo definido para X; y Q es un grupo orgánico divalente lineal o ramificado; y X e Y no son reactivas entre sí o respecto a Q. Preferiblemente, Q se selecciona de entre alquilenos de C₁ a C₂₀ opcionalmente sustituidos, alquilenos de C₂ a C₂₀ opcionalmente sustituidos, cicloalquilenos de C₃ a C₂₀ opcionalmente sustituidos, alquilenos de C₂ a C₂₀ opcionalmente sustituidos y arilenos de C₆ a C₂₀ opcionalmente sustituidos, en los que uno o más átomos de carbono puede sustituirse por un heteroátomo seleccionado de entre O, S o N.

Se entiende por "opcionalmente sustituido" que un grupo puede o no sustituirse por uno o más grupos seleccionados de entre los grupos alquilo, alqueno, alquino, arilo, halo, haloalquilo, haloalqueno, haloalquino, haloarilo, hidroxilo, alcoxi, alquenoiloxi, ariloxi, benziloxi, haloalcoxi, haloalquenoiloxi, acetileno, carboximidilo, haloariloxi, isociano, ciano, formilo, carboxilo, nitro, nitroalquilo, nitroalqueno, nitroalquino, nitroarilo, alquilamino, dialquilamino, alquenoilamino, alquinoilamino, arilamino, diarilamino, benzilamino, imino, alquilimino, alquenoilimino, alquinoilimino, arilimino, benzilimino, dibenzilamino, acilo, alquenoilacilo, alquinoilacilo, arilacilo, acilamino, diacilamino, aciloxi, alquilsulfoniloxi, arilsulfeniloxi, heterociclico, heterocicloxi, heterociclamino, haloheterociclico, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, carboalcoxi, alquiltio, benziltio, aciltio, sulfonamido, sulfanilo, grupos que contienen azufre y fósforo, alcoxisililo, sililo, alquilsililo, alquilalcoxisililo, fenoxisililo, alquifenoxisililo, alcoxifenoxisililo, arifenoxisililo, alofanilo, guanidino, hidantoilo, ureido, y ureileno, aunque no se limita a estos. Se considera que un átomo de carbono se ha sustituido si éste tiene un doble enlace con un heteroátomo, tal como el oxígeno, el azufre o el nitrógeno para formar un grupo carbonilo, tiocarbonilo o imino, respectivamente.

En las definiciones anteriores, los términos "arilo" y "heteroarilo" hacen referencia a cualquier sustitutivo que incluye o consiste en uno o más anillos aromáticos o heteroaromáticos, respectivamente, y que está adherido mediante un átomo del anillo. Los anillos pueden ser sistemas mono o policíclicos, aunque se prefieren los anillos de 5 o 6 miembros mono o bicíclicos. Algunos ejemplos de anillos adecuados incluyen pero no se limitan a benceno, bifenilo, terfenilo, cuaterfenilo, naftaleno, tetrahidronaftaleno, 1-bencilnaftaleno, antraceno, dihidroantraceno, benzantraceno, dibenzantraceno, fenantraceno, perileno, piridina, 4-fenilpiridina, 3-fenilpiridina, tiofene, benzotiofene, naftotiofene, tiantrene, furano, benzofurano, pireno, isobenzofurano, cromeno, xanteno, fenoxatino, pirrol, imidazol, pirazol, pirazina, pirimidina, piridacina, indol, indolicina, isoindol, purina, quinolina, isoquinolina, ftalacina, quinoxalina, quinazolina, pteridina, carbazol, carbolina, fenantridina, acridina, fenantrolina, fenacina, isotiazol, isoxazol, fenoxacina y similares, cada uno de los cuales puede sustituirse opcionalmente.

En las definiciones anteriores, el término "alquilo", utilizado tanto sólo como en palabras compuestas tales como "alquenoilalquilo", "alquiltio", "alquilamino" y "dialquilamino", indica alquilos de cadena simple, ramificados o cíclicos, preferiblemente alquilos o cicloalquilos de C₁₋₁₀. Algunos ejemplos de alquilos de cadena simple y ramificada incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, secbutilo, tercbutilo, amilo, isoamilo, sec-amilo, 1,2-dimetilpropilo, 1,1-dimetilpropilo, hexilo, 4-metilpentilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 1,1-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 1,2,2-trimetilpropilo, 1,1,2-trimetilpropilo, heptilo, 5-metoxihexilo, 1-metilhexilo, 2,2-dimetilpentilo, 3,3-dimetilpentilo, 4,4-dimetilpentilo, 1,2-

5 dimetilpentilo, 1,3-dimetilpentilo, 1,4-dimetilpentilo, 1,2,3-trimetilbutilo, 1,1,2-trimetilbutilo, 1,1,3-trimetilbutilo, octilo, 6-metilheptilo, 1-metilheptilo, 1, 1, 3, 3-tetrametilbutilo, nonilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-metil-octilo, 1-, 2-, 3-, 4- o 5-etilheptilo, 1-, 2- o 3-propilhexilo, decilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- y 8-metilnonilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5- o 6-etildecilo, 1-, 2-, 3-, 4- o 5-propildecilo, 1-, 2- o 3-butiloheptilo, 1-pentilhexilo, dodecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9- o 10-metilundecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- o 8-etildecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5- o 6-propilnonilo, 1-, 2-, 3- o 4-butildecilo, 1-2-pentilheptilo y similares. Algunos ejemplos de alquilos cíclicos incluyen los grupos alquilos mono o policíclicos tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclononilo, ciclodecilo y similares.

10 En las definiciones anteriores, el término "alcoxi" indica alcoxi de cadena simple o ramificado, preferiblemente alcoxi de C₁₋₁₀. Algunos ejemplos de alcoxi incluyen metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi y los diferentes isómeros de butoxi.

15 El término "alquenilo" indica grupos formados por alquenos de cadena simple, ramificados o cíclicos que incluyen grupos alquilo o grupos cicloalquilo mono-, di- o poliinsaturados etilénicamente, tal y como se ha definido anteriormente, preferiblemente alquenos de C₂₋₁₀. Algunos ejemplos de alquenilo incluyen vinilo, alilo, 1-metilvinilo, butenilo, isobutenilo, 3-metil-2-butenilo, 1-pentenilo, ciclopentenilo, 1-metilciclopentenilo, 1-hexenilo, 3-hexenilo, ciclohexenilo, 1-heptenilo, 3-heptenilo, 1-octenilo, ciclooctenilo, 1-nonenilo, 2-nonenilo, 3-nonenilo, 1-decenilo, 3-decenilo, 1,3-butadienilo, 1,4-pentadienilo, 1,3-ciclopentadienilo, 1,3-hexadienilo, 1,4-hexadienilo, 1,3-ciclohexadienilo, 1,4-ciclohexadienilo, 1,3-cicloheptadienilo, 1,3,5-cicloheptatrienilo y 1,3,5,7-ciclooctatetraenilo.

20 El término "alquinilo" indica grupos formados por alquinos de cadena simple, ramificados o cíclicos, incluyendo aquellos similares estructuralmente a los grupos alquilos y cicloalquilos definidos previamente, preferiblemente alquinos de C₂₋₁₀. Algunos ejemplos de alquinilo incluyen etinilo, 2-propinilo y 2- o 3-butinilo.

25 El término "acilo", tanto sólo como en palabras compuestas tales como "aciloxi", "aciltio", "acilamino" o "diacilamino", indica carbamoylos, grupos alifáticos acilo y grupos acilo que contienen un anillo aromático, a los cuales se hace referencia como acilos aromáticos, o un anillo heterocíclico, a los cuales se hace referencia como acilos heterocíclicos, preferiblemente acilos de C₁₋₁₀. Algunos ejemplos de acilo incluyen carbamoylos; alcanoylos de cadena simple o ramificados tal como formilo, acetilo, propanoylo, butanoylo, 2-metilpropanoylo, pentanoylo, 2,2-dimetilpropanoylo, hexanoylo, heptanoylo, octanoylo, nonanoylo, decanoylo, undecanoylo, dodecanoylo, tridecanoylo, tetradecanoylo, pentadecanoylo, hexadecanoylo, heptadecanoylo, octadecanoylo, nonadecanoylo y icosanoylo; alcocarbonoylos tales como metoxycarbonoylo, etoxycarbonoylo, t-butoxycarbonoylo, t-pentiloxycarbonoylo y heptiloxycarbonoylo; cicloalquilcarbonoylos tales como ciclopropilcarbonoylo, ciclobutilcarbonoylo, ciclopentilcarbonoylo y ciclohexilcarbonoylo; alquilsulfonoylos tales como metilsulfonoylo y etilsulfonoylo; alcóxidosulfonoylos tales como metóxidosulfonoylo y etóxidosulfonoylo; arooylos tales como benzooylo, toluoylo y naftooylo; aralcanoylos tales como fenilalcanoylo (por ejemplo, fenilacetilo, fenilpropanoylo, fenilbutanoylo, fenilisobutiloylo, fenilpentanoylo y fenilhexanoylo) y naftilalcanoylo (por ejemplo, naftilacetilo, naftilpropanoylo y naftilbutanoylo); aralquenooylos tales como fenilalquenooylo (por ejemplo, fenilpropenooylo, fenilbutenooylo, fenilmetacriloylo, fenilpentenooylo y fenilhexenooylo) y naftilalquenooylo (por ejemplo, naftilpropenooylo, naftilbutenooylo y naftilpentenooylo); aralcoxycarbonoylos tales como fenilalcoxycarbonoylo (por ejemplo, benziloxycarbonoylo); ariloxycarbonoylos tales como fenoxycarbonoylo y naptiloxycarbonoylo; ariloxalcanoylos tales como fenoxiacetilo y fenoxipropionoylo; arilcarbamoylos tales como fenilcarbamoylo; ariltiocarbamoylos tales como feniltiocarbamoylo; arilglioxiloylos tales como fenilglioxiloylo y naftilglioxiloylo; arilsulfonoylos tales como fenilsulfonoylos y naptilsulfonoylos; heterocicloalcanoylos tales como tienilacetilo, tienilpropanoylo, tienilbutanoylo, tienilpentanoylo, tienilhexanoylo, tiazolilacetilo, tiadiazolilacetilo y tetrazolilacetilo; heterocicloalquenooylos tales como heterociclopropenooylo, heterociclobutenooylo, heterociclopropenooylo y heterociclohexenooylo; y heterocicloalquenooylos tales como tiazolilglioxiloylo y tienilglioxiloylo.

50 En realizaciones alternativas, la molécula espaciadora puede tener una estructura ramificada con lo cual se pueden unir múltiples grupos funcionales en los extremos de las ramas.

En general, existen dos maneras por las que el espaciador S puede incorporarse en el sintón:

55 (1) Una molécula espaciadora con el grupo funcional deseado ya adherido al menos a un extremo se acopla químicamente al recubrimiento basal.

(2) Una molécula espaciadora se adhiere al constituyente A. En un paso sintético aparte, la molécula espaciadora se modifica adicionalmente para unir el grupo funcional deseado.

60 En algunas realizaciones, se puede unir una molécula espaciadora, y entonces modificarse ésta con más de un grupo funcional.

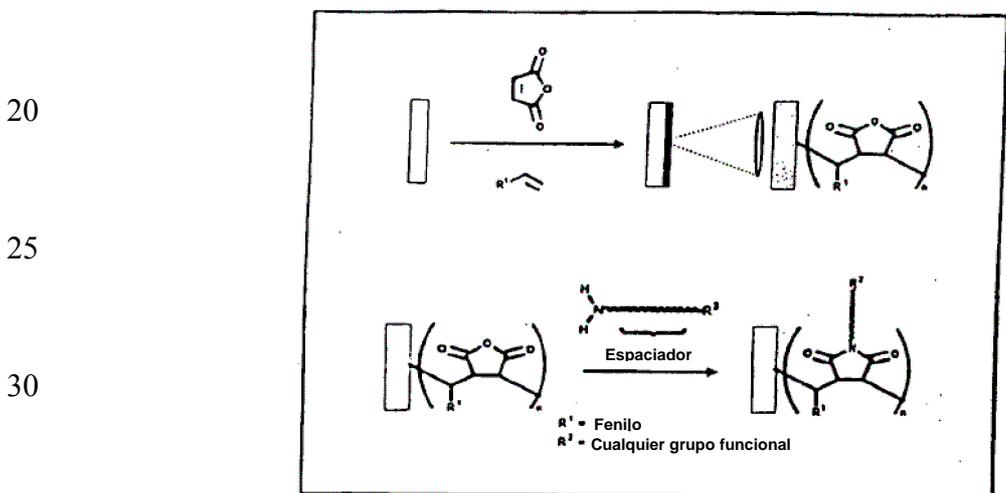
En una realización, la molécula espaciadora es una molécula de cadena simple y se forma un asa funcional mediante la modificación del extremo terminal de la cadena en posición distal al sitio de unión del constituyente A del sintón.

65

5 Mediante la modificación de las propiedades químicas o estructurales de la molécula espaciadora es posible generar
 10 sintones con una gran variedad de propiedades de recubrimiento macroscópico. Por ejemplo, las cadenas de
 oligómeros de glicol proporcionan una estructura lineal relativamente rígida, mientras que los hidrocarburos simples
 adoptan conformaciones más plegadas. Estas diferencias en la geometría del espaciador también pueden variar en
 relación a la longitud de la cadena o la presencia de grupos cargados en la molécula espaciadora. Estas diferencias
 en la geometría proporcionadas por las propiedades de la molécula espaciadora afectan directamente a la
 orientación del grupo funcional en relación al recubrimiento basal y, por consiguiente, afectan al conjunto de
 propiedades macroscópicas del recubrimiento de superficie. La modificación de estas propiedades puede afectar en
 gran medida las interacciones complementarias o antagonistas entre la superficie y una biomolécula, célula u otra
 entidad química inmovilizada sobre ésta.

El esquema 3 a continuación ilustra la formación de un recubrimiento basal sobre un sustrato y la subsiguiente unión
 de un espaciador.

15 Esquema 3



En el esquema 3, el recubrimiento basal se aplica mediante la polimerización del constituyente A, anhídrido maleico,
 y del constituyente P, estireno. La unidad espaciadora presenta una amina en el extremo que forma el enlace
 covalente con el constituyente A, formando así maleimida.

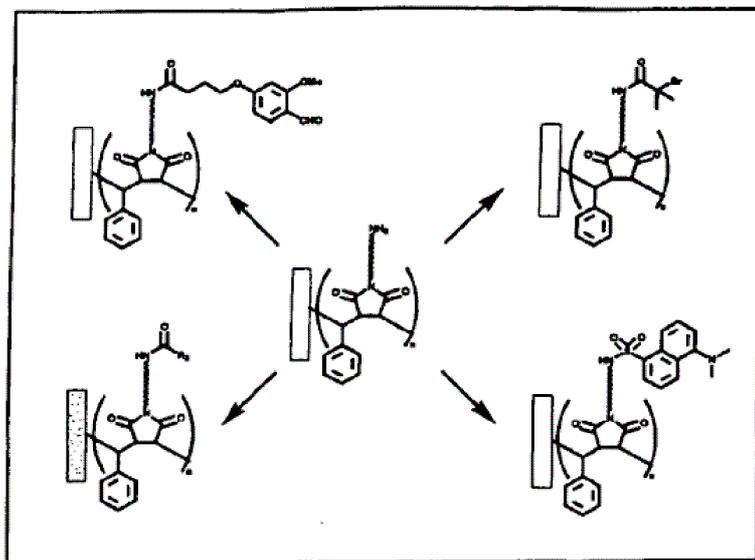
Preferiblemente, la unidad espaciadora es un residuo de una diamina, más preferiblemente una alquildiamina.
 Particularmente, es preferible que la unidad espaciadora S sea un residuo 1,5-diaminopentano o N-(3-aminopropil)-
 1,3-propandiamina.

El grupo funcional

El grupo funcional puede desempeñar diferentes roles en realizaciones distintas. Por ejemplo, el grupo funcional
 puede actuar como punto para modificaciones químicas adicionales de la superficie. En el caso en el que el grupo
 funcional se cubre con un iniciador de la polimerización, existe la posibilidad de añadir otro nivel de diversidad sobre
 le sintón.

En el esquema 4 a continuación, un espaciador con un grupo amina proporciona el punto para la modificación
 química con cuatro grupos funcionales diferentes, resultando consecuentemente en cuatro recubrimientos de
 superficie de sintón diferentes, aunque relacionados.

Esquema 4



5 Preferiblemente, el grupo funcional F es un grupo con la capacidad de unirse o reaccionar químicamente con una molécula o componente biológico. Preferiblemente, el grupo funcional F también incluye un grupo amina primaria o secundaria.

10 Cribado para la optimización de la superficie

En el esquema 4, el grupo funcional en cada uno de los cuatro recubrimientos puede actuar como el punto para una interacción de unión complementaria. Mediante el cribado de los cuatro recubrimientos en un ensayo de unión de fase sólida deseado, se puede determinar qué superficie es óptima. Basándose en el mejor de los cuatro sintones mostrados en el esquema 4, después se pueden generar nuevas bibliotecas de sintones relacionados para optimizar de manera adicional la superficie para la aplicación deseada de manera iterativa. Por ejemplo, en la siguiente repetición puede variar solamente la longitud del espaciador. Por lo tanto, se pueden general sintones con grupos funcionales que exhiben una gran variedad de diversidad molecular con el fin de encontrar una superficie óptima para la unión de una especie molecular complementaria tal como un receptor u otra biomolécula grande. Por ejemplo, se puede crear una biblioteca de sintones que incluye una gran variedad de grupos funcionales con tal de encontrar el recubrimiento de superficie óptimo para la unión del receptor β -adrenérgico en un experimento de resonancia de plasmón superficial.

Ventaja del alto rendimiento

25 Además, el esquema 4 ilustra la ventaja del alto rendimiento proporcionada por algunas realizaciones del método basado en el sintón. Tal y como se menciona en los antecedentes de la invención, la generación de diversidad de superficie sobre fases sólidas ha estado limitada por la dificultad de desarrollar métodos químicos para el enlace de nuevos recubrimientos sobre los sustratos sólidos. Los métodos previos se concentraron en la utilización de reacciones en solución para generar una biblioteca diversa de compuestos candidatos para recubrir un sustrato. Estos métodos se han encontrado con un cuello de botella en el punto de recubrir los sustratos de fase sólida con los compuestos en fase solución. Este cuello de botella es resultado de la carencia general en relación al desarrollo de ciencias de enlace de materiales sobre sólidos para la formación de recubrimientos.

35 Como se muestra en el esquema 4, la presente invención proporciona una solución de alto rendimiento para la generación de diversidad de superficie evitando este cuello de botella. En cambio, en realizaciones preferibles, las bibliotecas de superficies diversas pueden generarse a partir de un sólo recubrimiento basal aplicado mediante un procedimiento de enlace bien caracterizado. Posteriormente, se puede introducir diversidad a la superficie de fase sólida de forma combinatoria mediante la variación de las estructuras del espaciador y de los grupos funcionales siguiendo rutas sintéticas bien conocidas.

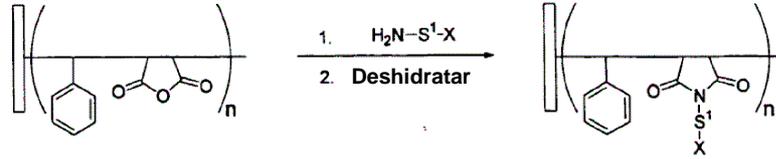
40 La generación de alto rendimiento de diversidad molecular para la detección de interacciones de unión complementarias, así como para las modificaciones químicas adicionales, puede conseguirse mediante la modificación del grupo funcional en una configuración relativamente simple entre el recubrimiento basal y el espaciador del sintón. Como se muestra en los esquemas 5 y 6 a continuación, cuando H_2N-S_1-X es una diamina

simétrica tal como $H_2N-(CH_2)_6-NH_2$, se pueden añadir un gran número de grupos funcionales con una gran variedad de diversidad molecular y funcional.

Esquema 5

5

10



Esquema 6

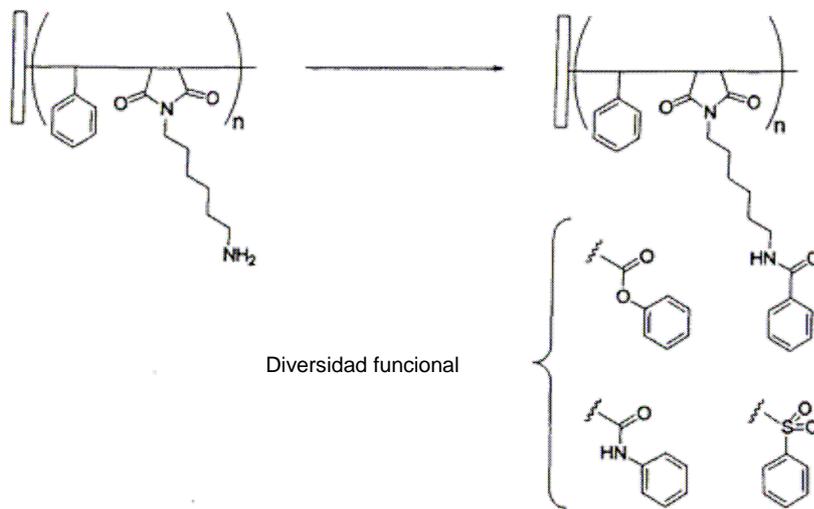
15

20

25

30

35

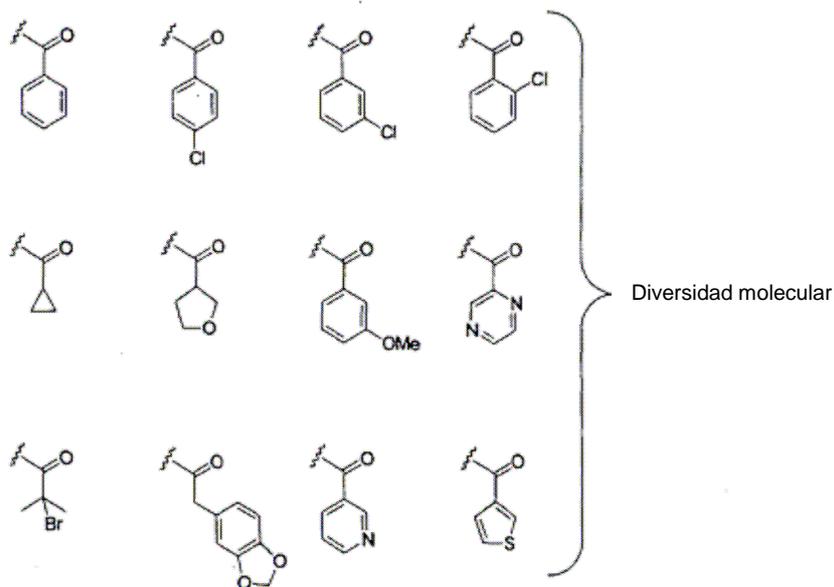


40

45

50

55



60

Incorporación de métodos de enlace y polimerización

65

En una realización preferible, el método basado en el sintón para la generación de recubrimientos de superficie diversos puede llevarse a cabo utilizando la tecnología de polimerización libre de radicales o de construcción fácil conocida. Está realización es particularmente adecuada para la generación de recubrimientos de superficie de sintón sobre sustratos poliméricos tales como poliolefinas. En realizaciones preferibles, el sustrato polimérico, como el

polipropileno, puede estar ya recubierto con sitreneo, (met)acrílico, (met)acrilamidas, u otros recubrimientos de enlace relacionados. La forma en la que se genera este recubrimiento inicial se conoce bien en la materia. Se trata del enlace gamma, en el que el requisito de iniciación para que ocurra la polimerización del enlace es una fuente de cobalto-60, o similar.

5

El sustrato

Las ventajas combinatorias del presente descubrimiento de superficies basado en un sintón son independientes de la naturaleza del material del sustrato basal o de como se aplica el sintón a la superficie. Por lo tanto, puede explorarse la diversidad de superficie a lo largo de un amplio rango de sustratos. Generalmente, el sustrato utilizado de acuerdo con la presente invención es un sólido y proporciona una superficie o numerosas superficies integrales sobre las cuales pueden aplicarse los diferentes recubrimientos de superficie. Preferiblemente, el sustrato se selecciona de entre vidrio, silicona, metales, y polímeros orgánicos, otros materiales sintéticos o naturales, y combinaciones de los mismos.

10

Es sustrato puede proporcionarse en forma de portaobjetos de microscopio, placa de microtitulación, membrana porosa, punta de pipeta, tubo o numerosas cuentas.

Preferiblemente, el sustrato es un polímero orgánico. Algunos polímeros orgánicos adecuados incluyen, aunque no se limitan a, politetrafluoroetileno, poliestireno, polipropileno, polietileno, fluoruro de polivinilideno y polimetilmetacrilato.

Adicionalmente, el sustrato puede ser poroso, no poroso, y/o de cualquier forma geométrica, por ejemplo cuentas o plano. Se describen una variedad de sustratos poliméricos porosos con arquitecturas co-continuas útiles para la presente invención en la patente en curso de EEUU con número de solicitud 10/052.907 y archivada el 17 de enero de 2002, la cual se incorpora por este medio como referencia en este apartado.

En una realización preferible de la invención, el sustrato es un polímero orgánico en forma de numerosas cuentas. Preferiblemente, las cuentas están marcadas de tal manera que un recubrimiento particular puede relacionarse con una cuenta particular o un subgrupo de cuentas. Algunas cuentas poliméricas adecuadas para su utilización como sustrato de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, las cuentas Luminex™.

Aplicaciones en multiplex

Los compuestos y métodos presentes permiten explorar la diversidad de superficie en un modo de alto rendimiento mediante, por ejemplo, la construcción de diferentes sintones en formato de matriz sobre un sustrato único. Pueden utilizarse una variedad de formatos múltiples tales como matrices o cuentas. Por ejemplo, se puede aplicar un único recubrimiento basal de sintón a lo largo de la superficie del sustrato. Entonces se pueden generar variantes con diferentes unidades espaciadoras o grupos funcionales en distintas regiones localizadas del sustrato.

Tal y como se utiliza aquí, una "región" de un sustrato incluye un punto, área u otra localización sobre la superficie del sustrato. Cada superficie diferente que cubre el sustrato ocupa regiones distintas sobre el sustrato.

En una realización preferible, pueden utilizarse métodos fotolitográficos o de microespejos para dirigir espacialmente las modificaciones químicas fotoinducidas de las unidades espaciadoras o de los grupos funcionales dando como resultado la unión en regiones localizadas específicas sobre la superficie del sustrato. Los métodos fotodirigidos de control de la reactividad y de inmovilización de compuestos químicos son conocidos ampliamente en la materia y se describen en las patentes de EE.UU. Nº 4.562.157, 5.143.854, 5.556.961, 5.968.740, y 6.153.744, y en la publicación PCT WO99/42813, cada una de las cuales se incorpora por este medio como referencia en este apartado.

De forma alternativa, la generación plural de sintones localizados sobre un único sustrato puede lograrse mediante la deposición precisa de reactivos químicos. En las patentes de EE.UU. Nº 5.474.796 y 5.807.522 se describen métodos para lograr una alta resolución espacial en la deposición de pequeños volúmenes de un reactivo líquido sobre un sustrato sólido, las cuales se incorporan por este medio como referencia en este apartado.

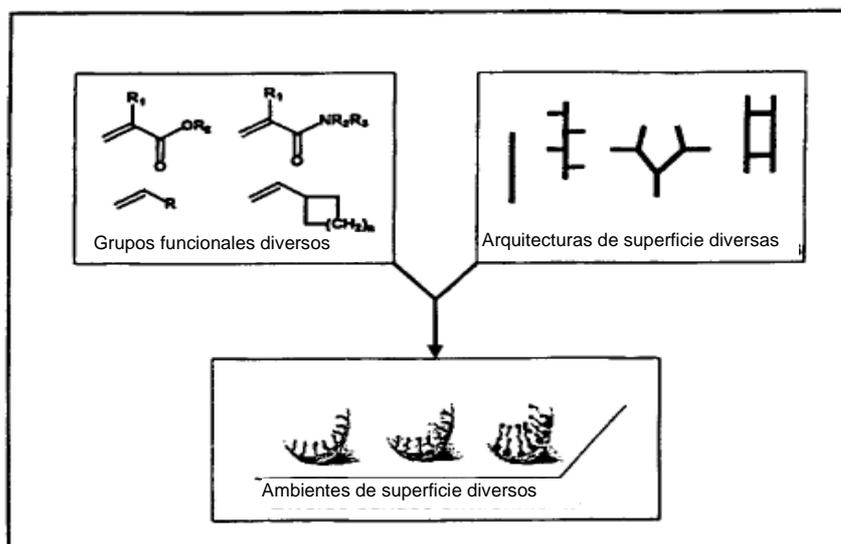
El término "matriz" puede requerir o no de la identificación de cada recubrimiento de superficie diferente en relación con las coordenadas para su localización. Una matriz puede presentar un patrón o bien ser aleatoria y puede contener dos o más recubrimientos, o el mismo recubrimiento en regiones diferentes sobre el mismo sustrato. El sustrato subyacente puede ser uniforme en su capacidad para aceptar un recubrimiento de superficie. O el sustrato puede tener regiones con diferentes capacidades de unión a recubrimientos de superficie específicos, dando como resultado un patrón espacial dependiente del recubrimiento.

Cribado de ambientes de superficie diversos

60

Los recubrimientos de superficie preparados utilizando el método basado en el sintón de la presente invención pueden utilizarse en un amplio rango de aplicaciones de fase sólida. La generación de una selección combinatoria de recubrimientos de superficie proporciona un espectro de propiedades moleculares y macroscópicas de superficie. El método proporciona una diversidad de ambientes de superficie como se muestra en el esquema 7 a continuación:

Esquema 7



Cada una de estas superficies es potencialmente capaz de crear un ambiente óptimo o de tener propiedades óptimas para una aplicación en fase sólida particular. No obstante, un número mayor de superficies diferentes en una biblioteca requiere un cribado superior para cada aplicación particular.

Generalmente, los recubrimientos de superficie de la presente invención pueden seleccionarse para el rendimiento óptimo en una aplicación en fase sólida de interés mediante métodos bien conocidos en la materia. Por ejemplo, tal cribado puede incluir la detección de uniones específicas de células a la superficie y, consecuentemente, puede utilizar la citometría de flujo como, por ejemplo, se describe en Needels *et al.* (1993).

Otros métodos de cribado útiles para la presente invención incluyen cualquiera de entre el gran número de marcajes isotópicos o no isotópicos y métodos de detección conocidos en la materia de los ensayos químicos y bioquímicos. Por ejemplo, se puede cribar una biblioteca de recubrimientos de superficie de la presente invención en relación a la capacidad de unión a péptidos específicos en una configuración activa sobre la superficie. Una configuración activa hace referencia a una orientación de la molécula sobre el recubrimiento de superficie en la que la molécula puede detectarse específicamente con una sonda molecular seleccionada, por ejemplo, un anticuerpo marcado con fluorescencia que se une específicamente a la molécula.

De forma alternativa, pueden utilizarse métodos espectroscópicos conocidos en la materia para determinar directamente si la molécula está unida a un recubrimiento de superficie en una configuración deseada. Los métodos espectroscópicos incluyen, por ejemplo UV-VIS (luz ultravioleta-visible), RMN (resonancia magnética nuclear), RPE (resonancia paramagnética nuclear), IR (infrarrojos), Raman, espectrometría de masas y otros métodos adaptados al análisis de superficie conocidos en la materia.

Algunos ejemplos de compuestos biológicos que pueden cribarse para unirse en la configuración adecuada al recubrimiento de superficie generado mediante el método basado en el sintón de la presente invención incluyen, por ejemplo agonistas y antagonistas de receptores de membrana celular, toxinas, venenos, epítopos virales, hormonas, azúcares, cofactores, péptidos, sustratos enzimáticos, fármacos incluyendo opiáceos y esteroides, proteínas incluyendo anticuerpos, anticuerpos monoclonales, reactivos antisuero con determinantes antigénicos específicos, ácidos nucleicos, lectinas, polisacáridos, membranas celulares y orgánulos.

Además, la presente invención puede emplearse para la generación de recubrimientos de superficie óptimos para la inmovilización de ácidos nucleicos. Estos recubrimientos pueden utilizarse en un gran número de ensayos de hibridación conocidos en los que se inmovilizan ácidos nucleicos sobre la superficie de un sustrato, por ejemplo, genotipificación, detección de polimorfismo, análisis de expresión génica, dactiloscopia, y otros métodos de análisis o diagnóstico basados en DNA o RNA.

Varios aspectos de la presente invención pueden llevarse a cabo de forma automática o semiautomática, habitualmente con la asistencia de métodos de procesamiento conocidos. Pueden utilizarse programas informáticos

y otros métodos de procesamiento de datos conocidos en la materia para almacenar la información, incluyendo por ejemplo bibliotecas de propiedades químicas y macroscópicas de recubrimientos de superficie. Pueden utilizarse métodos de procesamiento conocidos en la materia para interpretar los datos de entrada que cubren las características deseadas.

De forma alternativa o adicional, pueden utilizarse métodos de procesamiento de datos conocidos en la materia para controlar los procesos involucrados en la presente invención, incluyendo por ejemplo la aplicación o la polimerización del recubrimiento basal sobre el sustrato; el control de las reacciones químicas involucradas en la generación posterior del sintón; y/o las reacciones e interacciones que ocurren en, dentro de o entre una población o matriz de recubrimientos de superficie sobre un sustrato.

La invención se describirá a continuación haciendo referencia a ejemplos no limitantes. No obstante debe comprenderse que la particularidad de la descripción de la siguiente invención no pretende suplantar la generalidad de la invención descrita previamente.

Ejemplos

1. Generación de un recubrimiento basal de anhídrido maleico (MAN) y estireno sobre un sustrato sólido polimérico.

Esquema 8

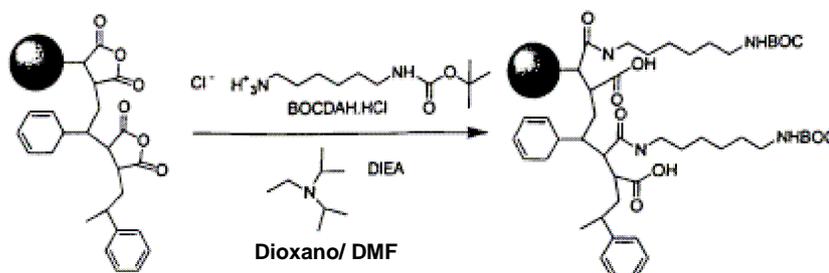


El esquema 8 anterior ilustra la reacción que se produce en la generación del recubrimiento basal. Previamente, se irradiaron cilindros de plástico huecos, de 6 mm de longitud y 3 mm de diámetro, en aire a temperatura ambiente (1,8 KGy/ h, durante 7 horas). Se preparó en tolueno una solución al 40% (v/ v) de estireno y anhídrido maleico, presentes en proporciones molares equivalentes, y luego se añadió a los cilindros de plástico irradiados. La mezcla se purgó después con nitrógeno gaseoso durante 5 minutos a través de un septo y se calentó en agitación a 60° C durante 6 horas. Entonces se aislaron los cilindros de plástico de la solución polimerizada, se lavaron a conciencia para eliminar el polímero no enlazado y se secaron hasta llegar a su peso constante

2. Unión y posterior desprotección de unidades espaciadores de diaminas protegidas con carbamato de terc-butilo (BOC) al recubrimiento basal de MAN-estireno.

Paso 1: Apertura del anillo con aminas (ver el esquema 9 a continuación)

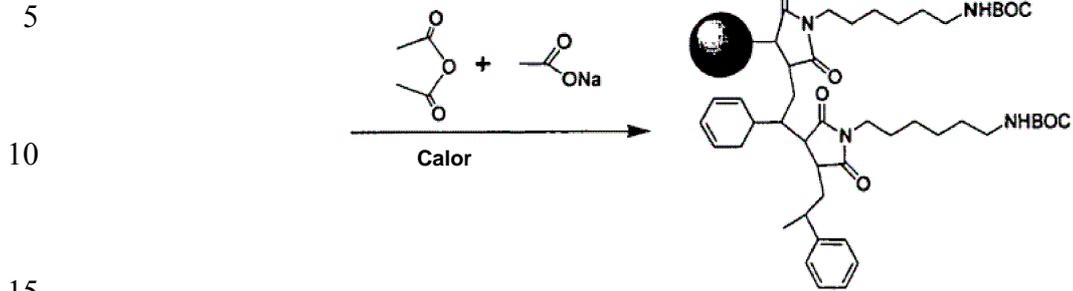
Esquema 9



En los cilindros de plástico preparados en el ejemplo 1 anterior, se preparó una solución 1:1 de DMF/Dioxano que contiene un exceso de equivalentes de la diamina protegida. Se añadió un exceso 6 veces mayor de DIEA a la solución y se dejó que la solución reaccionase a 60° C durante 2 horas, tras las cuales los cilindros de plástico se separaron de la mezcla de la reacción y se lavaron a conciencia. Las pruebas espectroscópicas (RTA (reflectancia total atenuada) y Raman) establecieron la desaparición del anhídrido.

Paso 2: Cierre del anillo para la formación de la imida (ver el esquema 10 a continuación)

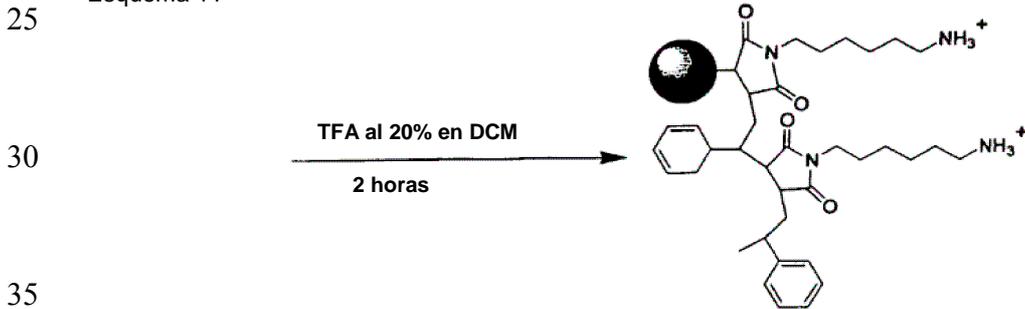
Esquema 10



20 El cierre del anillo del ácido ámico se efectuó mediante el calentamiento del material del paso 1 del ejemplo 2 anterior, a 60° C en DMF en presencia de anhídrido acético y acetato sódico durante 4 horas. Los cilindros de plástico se lavaron extensivamente para producir la imida enlazada de anillo cerrado.

Paso 3: Liberación de la amina (ver el esquema 11 a continuación)

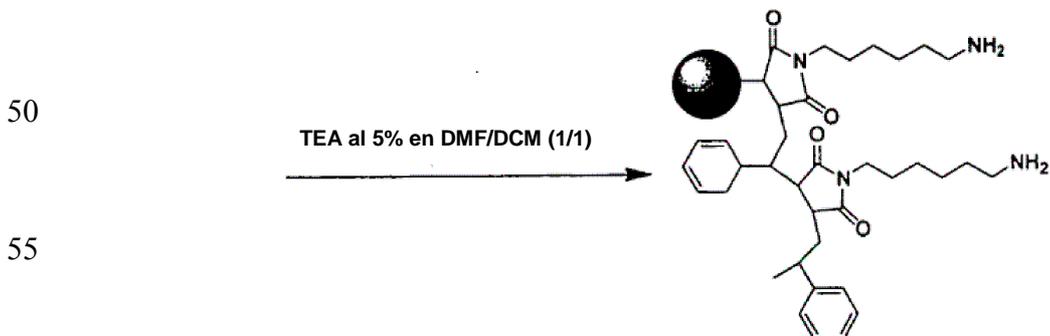
Esquema 11



40 La extracción del grupo protector amina se llevó a cabo bajo condiciones de desprotección ácida estándar mediante la deposición de una muestra de los cilindros de plástico preparados en el paso 2 del ejemplo 2 que fueron situados en ácido trifluoroacético al 20% en diclorometano durante 2 horas. Después, las muestras desprotegidas acidificadas se lavaron extensivamente con diclorometano previamente a la neutralización.

Paso 4: Neutralización de la amina enlazada (ver el esquema 12 a continuación)

Esquema 12



60 Las muestras acidificadas preparadas en el paso 3 del ejemplo 2 se trataron con trietilamina al 5% en dimetilformamida/diclorometano 1/1, durante 20 minutos, y luego se lavaron extensivamente con dimetilformamida y diclorometano, previamente al secado y la determinación de la actividad amina que se describe en el ejemplo 3 a continuación.

65 3. Determinación de la actividad amina

Se trató una muestra del material enlazado preparado en el paso 4 del ejemplo 2 con un exceso de Fmoc- β -Ala-OH en diclorometano, en presencia de diisopropilcarbodiimida. Se escindió el Fmoc del Fmoc- β -Ala-OH combinado con la amina pendiente en el cilindro de plástico mediante la exposición de los cilindros de plástico a una solución al 20% de piperidina en dimetilformamida y se detectó el Fmoc liberado espectrofotométricamente, para lograr una concentración de aminas activas en el enlace de 0,108 micromoles.

4. Recubrimientos de Sintón: ejemplos de discos

I. Biblioteca de Maleimidas

Paso 1. Preparación del copolímero de enlace de anhídrido maleico/estireno sobre discos de PFA. El anhídrido maleico/estireno se unió covalentemente a un disco de copolímero de tetrafluoroetileno-perfluoroalquilo-viniléter (PFA) utilizando la técnica de γ -irradiación. Se sumergieron tres mil discos de PFA (6 mm de diámetro x 0,8 mm de grosor) en 150 mL de anhídrido maleico al 20% en acetato de etilo (peso/ volumen) y 150 mL de estireno al 20% en acetato de etilo (v/ v) que contienen 0.010 M de HCl en dioxano en una botella de vidrio de 500 mL. Se desgasificó la solución burbujeándola con $N_{2(g)}$ durante 10 min. La botella de vidrio se selló con un tapón de rosca de teflón y se γ -irradió con una fuente de ^{60}Co . Se lavaron a conciencia los discos enlazados con DMF y CH_2Cl_2 para eliminar monómeros residuales y copolímeros no enlazados. Luego se secó durante la noche en condiciones de vacío a 30° C. Tras el secado, se pesaron los discos para demostrar un cambio de masa medio de un 0,92% por disco (1,94 mg/mm²).

Paso 2: Reacción del sistema de enlace de anhídrido maleico/estireno con aminas primarias. Se cargaron en un vial de vidrio de 50 mL discos de PFA enlazados con anhídrido maleico/estireno (100 discos) y 20 mL de una amina primaria (1 M, Tabla 3) en DMF, de manera previa al sellado del vial y la agitación durante la noche. Tras 16 h., se sustrajo la solución y se lavaron los discos con DMF y CH_2Cl_2 , de manera previa al secado de estos en condiciones de vacío para proporcionar el sistema mezclado (amida-ácido carboxílico-fenilo).

Tabla 3. Lista de aminas primarias para los discos

Nº	Amina	Nº	Amina
1	2-(aminometil)-18-corona-6	25	CICLOHEXANMETILAMINA
2	4-METOXIFENETILAMINA	26	5-AMINO-1-PENTANOL
3	Bencilamina	27	ISOpentilamina
4	N-acetiletilendiamina	28	1-(3-AMINOPROPIL)IMIDAZOL
5	Undecilamina	29	2-Metoxietilamina
6	1-NAFTALENMETILAMINA	30	Etanolamina
7	1-(2-AMINETIL)PIRROLIDINA	31	3-aminopropionitrilo
8	2-(2-aminetoxi)etanol	32	3-metoxipropilamina
9	Tetrahidrofurfurilamina	33	3-FLUOROBENCILAMINA
10	2-(2CLOROFENIL)ETILAMINA	34	3,4,5-trimetoxibencilamina
11	Propilamina	35	4-metoxibencilamina
12	2-(aminometil)piridina	36	2-amino-1-propen-1,1,3-tricarbonitrilo
13	3,4-DIMETOXIFENETILAMINA	37	p-aminofenil-beta-D-glucopranósido
14	3-FENIL-1-PROPILAMINA	38	Hydrocloruro de D-glucosamina
15	4-CLOROBENCILAMINA	39	p-aminofenil-bea-D-galactopiranósido
16	1-(2-AMINETIL)PIPERIDINA	40	Bis-homotris
17	4-FENILBUTILAMINA	41	3-(dietilamino)propilamina
18	4-AMINO-1-BUTANOL	42	2METOXIBENCILAMINA
19	4-FLUOROBENCILAMINA	43	Isobutilamina
20	6-AMINO-1-HEXANOL	44	BUTILAMINA
21	DECILAMINA	45	4-(TRIFLUOROMETIL)BENCILAMINA
22	NONILAMINA	46	3,5-DIMETOXIBENCILAMINA
23	Octilamina	47	3-FLOOROFENETILAMINA
24	VERATRILAMINA	48	Pentilamina

Paso 3: Ciclado del sistema mezclado para proporcionar copolímeros de enlace de estireno/ maleimida. Los discos mezclados de PFA amida-ácido carboxílico-estireno (50 discos) derivados a partir de aminas primarias se trataron con tolueno (50 mL), anhídrido acético (0,25 M), y acetato sódico (0,025 M) antes de calentarlos a 80° C durante la noche. Tras 16 h., el vial se escurrió de reactivo y los discos de lavaron con tolueno, DMF, y luego CH_2Cl_2 antes del secado bajo condiciones de vacío para lograr la biblioteca de superficies de estireno/ maleimida, generada a partir de una superficie inicial.

En cada etapa del ensamblaje del recubrimiento se realizaron espectroscopias de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) y espectrometrías RTA e indicaron que se había ejecutado cada transformación. Además, la biblioteca

ensamblada de maleimidas sobre discos se cribó con IgG anti-conejo, y se observó una gran variedad de uniones de proteínas, desde muy fuertes a muy débiles.

II. Biblioteca de maleimidas con espaciadores de diamina y grupos protectores

Paso 1. Preparación del copolímero de enlace de anhídrido maleico/ estireno sobre discos de PFA. Se unió covalentemente anhídrido maleico/estireno a un disco de copolímero de tetrafluoroetileno-perfluoroalquilo-viniléter (PFA) utilizando la técnica de γ -irradiación. Se sumergieron tres mil discos de PFA (6 mm de diámetro x 0,8 mm de grosor) en 150 mL de anhídrido maleico al 20% en acetato de etilo (peso/ volumen) y 150 mL de estireno al 20% en acetato de etilo (v/ v) que contienen HCl 0,010 M en dioxano en una botella de vidrio de 500 mL. Se desgasificó la solución burbujeándola con $N_{2(g)}$ durante 10 min. La botella de vidrio se selló con un tapón de rosca de teflón y se γ -irradió con una fuente de ^{60}Co . Se lavaron a conciencia los discos enlazados con DMF y CH_2Cl_2 para eliminar monómeros residuales y copolímeros no enlazados. Luego se secó durante la noche en condiciones de vacío a 30° C. Tras el secado, se pesaron los discos para demostrar un cambio de masa medio de un 0,92% por disco (1,94 mg/ mm^2).

Paso 2: Reacción del sistema de enlace de anhídrido maleico/ estireno con diaminas sobre un disco. 1943 discos de PFA enlazados con anhídrido maleico/estireno procedentes del paso 1 se dividieron en 29 lotes de 67 discos. Cada lote se trató con una diamina diferente (0,5 M en DMF) de la Tabla 4 para dar como resultado, tras el lavado, 29 intermediarios mezclados diferentes (amida-ácido carboxílico-fenilo) que contienen aminas libres.

Tabla 4: Lista de espaciadores de diamina para la biblioteca de maleimida

Nº	Diamina	Nº	Diamina
1	Etilendiamina	16	Penttilenhexamina
2	1,4-diaminobutano	17	1-4-bis(3-aminopropil)piperazina
3	1,12-diaminododecano	18	Dihidrocloruro de 2,2-oxibis(etilamina)
4	1,5-diaminopentano	19	3,3-diamino-N-metildipropilamina
5	1,3-diaminopropano	20	2,2-dimetil-1,3-diaminopropano
6	Diethylentriamina	21	N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3,propandiamina
7	Dipropilentriamina	22	2,2-(etilendioxi)bis(etilamina)
8	Tetraetilenpentamina	2	DAB((PA)4 Generación 1.0
9	Trietilentetramina	24	DAB((PA)4 Generación 2.0
10	1,3-ciclohexanbis(metilamina)	25	p-Xililendiamina
11	1,9-diaminononano	26	O,O'-bis(3-aminopropil)polietilendiamina
12	4,9-dioxa-1,12-dodecandiamina	27	polietilenimida
13	N,N'-bis(3-aminopropil)etilendiamina	28	1-7-diaminheptano
14	Bis(hexametilen)triamina	29	4,7,10-trioxa-1,13-trideandiamina
15	Tris(2-aminetil)amina		

Paso 3: Reacción de los intermediarios de aminas mezcladas (amida-ácido carboxílico-fenilo) con ácidos carboxílicos. Cada lote de diaminas del paso 2 se dividió en 67 discos separados diferentes. Cada disco se trató con un ácido carboxílico diferente de la Tabla 5 en una solución de DMF, 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (0,25 M), y diisopropiltilamina (0,5 M). La reacción se agitó durante la noche antes de lavarse con DMF y cloruro de metileno para eliminar el exceso de reactivo.

Tabla 5: Lista de grupos protectores de ácidos carboxílicos para la biblioteca de maleimida

Nº	Ácido	Nº	Ácido
1	BOC-3-1(1-naftil)-L-analina	35	2-norbornano de ácido acético
2	N(alfa)-BOC-L-lisina (Fmoc)	36	Ácido 2,3,4-trimetoxibenzoico
3	D-tirosina	37	ÁCIDO 2-HIDROXI-1-NAFTOICO
4	O-terbutil-L-serina (Fmoc)	38	ÁCIDO 4-TERBUTILCICLOHEXANCARBOXÍLICO
5	5-bencil éster de Fmoc-L-ácido glutámico	39	Ácido 2-tiofenacético
6	D-fenilalanina (BOC)	40	Ácido 2-bifenilcarboxílico
7	BOC-L-tirosina	41	Ácido 3,4-diaminobenzoico
8	L-tirosina (BOC)	42	ÁCIDO DIETILFOSFONACÉTICO
9	N-benciloxycarbonil-L-tirosina	43	Ácido fluoreámico
10	Fmoc-L-fenilalanina	44	ÁCIDO TRIDECANOICO
11	N-(9-FLUORENILMETOXICARBONIL)-L-PROLINA	45	ÁCIDO (1R,3R,4R,5R)-(-)-QUÍNICO
12	N-alfa-carbobenciloxi-L-triptófano	46	Ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico
13	N-CBZ-L-METIONINA	47	Cloruro de p-tolilo
14	N-Fmoc-(L-ALANINA-OH)-H ₂ O	48	anhídrido propiónico
15	N-carbonciloxi-L-prolina	49	Ácido 3-mercaptopropiónico

Nº	Ácido	Nº	Ácido
16	ÁCIDO 2-(DIFENILFOSFIN)BENZOICO	50	Ácido giberélico
17	Ácido 1-pirenbutírico	51	Z-L-leucil-L-alanina
18	Cloruro (1S)-(-)-Camfánico	52	Monoamida de ácido R(+)-N-(alfa-metilbencil)ftálico
19	Cloruro de 2,3,4,5-tetrafluorobenzoilo	53	Ftalato de (+)-mono-(1S)-mentil
20	Ácido docosanoico	54	Ácido R(-)-2-oxotiazolidina-4-carboxílico
21	Ácido 2,6-difluorofenilacético	55	Ácido 9H-fluoren-9-carboxílico
22	Cloruro piperoniloilo	56	Ácido orótico anhidro
23	ÁCIDO 2,3,4-TRIHIDROXIBENZOICO	57	BOC-L-leucina
24	Cloruro de pentafluorobenzoilo	58	Ácido 15-hidroxipentadecanoico
25	ÁCIDO 4-METOXICICLOHEXANCARBOXÍLICO	59	ACEMETACINA
26	Ácido 3-Iodo-4-metilbenzoico	60	N-T-BOC-S-TRITIL-L-CISTEINA
27	Ácido 4-octiloxibenzoico	61	ÁCIDO URACIL-4-ACÉTICO
28	Ácido cianoacético	62	ÁCIDO (+/-)-4-METILOCTANOICO
29	ÁCIDO 2-METIL-1-CICLOHEXANCARBOXÍLICO	63	N-ALFA-T-BOC-NEPSILON-CBZ-L-LISINA
30	N-TRITULGLICINA	64	Indometacina
31	Ácido 3-fenoxibenzoico	65	N-BENZOIL-BETA-ALANINA
32	Ácido 3-indolbutírico	66	N-ACETIL-L-TRIPTÓFANO
33	3,5-diisopropilsalicílico	67	ÁCIDO MEFENÁMICO
34	Ácido 4-metilvalérico		

Paso 4: Ciclado del sistema mezclado para producir copolímeros de enlace de estireno/ maleimida. Los discos de PFA amida-ácido carboxílico-estireno del paso 3 (50 discos) se trataron con anhídrido acético (0,25 M) y acetato sódico (0,025 M) en tolueno antes de calentarlos a 80° C durante la noche. Tras 16 h., se escurrió el vial de reactivo y se lavaron los discos con tolueno, DMF, y después con CH₂Cl₂, de manera previa al secado bajo condiciones de vacío para proporcionar la biblioteca de superficies de estireno/ maleimida, generada a partir de una superficie inicial.

En cada etapa del ensamblaje del recubrimiento se adquirieron espectroscopias XPS y RTA, e indicaron que cada transformación se había ejecutado. Además, la biblioteca ensamblada de maleimidas sobre espaciadores de diamina y grupos protectores se cribó con IgG anti-conejo, y se observó una gran variedad de uniones de proteínas, desde muy bajas a muy altas.

5. Recubrimiento de sintón: ejemplos con microchips

I. Biblioteca de maleimidas

Paso 1. Preparación del copolímero de enlace de anhídrido maleico/estireno sobre un portaobjetos de microscopio.

Puede llevarse a cabo un procedimiento para la aplicación de un recubrimiento de sintón en un formato de microchip de la siguiente manera: se puede enmascarar un portaobjetos de microscopio con unas dimensiones de 2,5 x 7,5 x 0,1 cm, preparado a partir del moldeo por inyección de copolímero tetrafluoroetileno-perfluoroalquilo-viniléter (PFA), para crear una matriz de puntos circulares de 16 x 250 µm. El tratamiento con plasma de heptanos (5 min., 20 W, 10⁻³ torr) del portaobjetos enmascarado, seguido de la sustracción de la máscara, produce un portaobjetos de PFA consistente en puntos de 16 x 250 µm recubiertos finamente con heptano. La irradiación UV del portaobjetos en presencia de benzofenona (0,05 M) en metanol, seguida de la polimerización simultánea y el enlace de anhídrido maleico (1,75 M) y estireno (1,75 M) en acetato de etilo modifica selectivamente la capa de heptano para producir puntos de matriz densamente funcionalizados con grupos anhídrido.

Paso 2: Reacción del portaobjetos de enlace de anhídrido maleico/estireno con aminas primarias.

Los compuestos que contienen aminas primarias (0,5 M) disueltos en DMF se unen fácilmente a la superficie con impresión robótica de gotitas de nanolitros en cada punto mediante la apertura del anillo del anhídrido. Cada punto de los 3 portaobjetos del paso 1 se trató con una amina primaria diferente (Tabla 6) para proporcionar tres microchips de 16 intermediarios mezclados (amida-ácido carboxílico-fenilo) diferentes. Las matrices se lavaron exhaustivamente con DMF, CH₂Cl₂, y ácido acético al 1% en DMF antes del secado bajo condiciones de vacío.

Tabla 6: Lista de aminas primarias para los microchips

Nº	Amina	Nº	Amina
1	2-(aminometil)-18-corona-6	25	CICLOHEXANMETILAMINA
2	4-METOXIFENETILAMINA	26	5-AMINO-1-PENTANOL
3	Bencilamina	27	ISOpentilamina
4	N-acetiletilendiamina	28	1-(3-AMINOPROPIL)IMIDAZOL

Nº	Amina	Nº	Amina
5	Undecilamina	29	2-Metoxietilamina
6	1-NAFTALENMETILAMINA	30	Etanolamina
7	1-(2-AMINETIL)PIRROLIDINA	31	3-aminopropionitrilo
8	2-(2-aminetoxi)etanol	32	3-metoxipropilamina
9	Tetrahidrofurfurilamina	33	3-FLUOROBENCILAMINA
10	2-(2CLOROFENIL)ETILAMINA	34	3,4,5-trimetoxibencilamina
11	Propilamina	35	4-metoxibencilamina
12	2-(aminometil)piridina	36	2-amino-1-propen-1,1,3-tricarbonitrilo
13	3,4-DIMETOXIFENETILAMINA	37	p-aminofeñil-beta-D-glucopranósido
14	3-FENIL-1-PROPILOAMINA	38	Hidrocloruro de D-glucosamina
15	4-CLOROBENCILAMINA	39	p-aminofeñil-bea-D-galactopiranósido
16	1-(2-AMINETIL)PIPERIDINA	40	Bis-homotris
17	4-FENILBUTILAMINA	41	3-(dietilamino)propilamina
18	4-AMINO-1-BUTANOL	42	2METOXIBENCILAMINA
19	4-FLUOROBENCILAMINA	43	Isobutilamina
20	6-AMINO-1-HEXANOL	44	BUTILAMINA
21	DECILAMINA	45	4-(TRIFLUOROMETIL)BENCILAMINA
22	NONILAMINA	46	3,5-DIMETOXIBENCILAMINA
23	Octilamina	47	3-FLOROFENETILAMINA
24	VERATRILAMINA	48	Pentilamina

Paso 3: Ciclado de sistemas mezclados para proporcionar el copolímero de enlace de estireno/ maleimida.

5 La posterior deshidratación de la matriz entera utilizando anhídrido acético (0,25 M) y acetato sódico (0,025 M) a 80° C en tolueno produce matrices de 16 copolímeros de maleimida/ estireno diferentes unidos a la superficie.

10 En cada etapa del ensamblaje del recubrimiento se adquirieron espectroscopias XPS y RTA, e indicaron que cada transformación se había ejecutado. Además, la biblioteca ensamblada de maleimidadas sobre un portaobjetos se cribó con IgG anti-conejo, y se observó una gran variedad de uniones de proteínas, desde muy débiles a muy fuertes.

10 II. Biblioteca de sistemas mezclados (amida-ácido carboxílico-fenilo) a partir de aminas secundarias sobre un microchip.

15 Paso 1. Preparación del copolímero de enlace de anhídrido maleico/estireno sobre un portaobjetos de microscopio.

15 Puede llevarse a cabo un procedimiento para la aplicación de un recubrimiento de sintón en un formato de microchip de la siguiente manera: se puede enmascarar un portaobjetos de microscopio con unas dimensiones de 2,5 x 7,5 x 0,1 cm, preparado a partir del moldeo por inyección de copolímero tetrafluoroetileno-perfluoroalquilo-viniléter (PFA), para crear una matriz de puntos circulares de 16 x 250 µm. El tratamiento con plasma de heptanos (5 min., 20 W, 10⁻³ torr) del portaobjetos enmascarado, seguido de la sustracción de la máscara, produce un portaobjetos de PFA consistente en puntos de 16 x 250 µm recubiertos finamente con heptano. La irradiación UV del portaobjetos en presencia de benzofenona (0,05 M) en metanol, seguida de la polimerización simultánea y el enlace de anhídrido maleico (1,75 M) y estireno (1,75 M) en acetato de etilo modifica selectivamente la capa de heptano para producir puntos de matriz densamente funcionalizados con grupos anhídrido.

25 Paso 2: Reacción del portaobjetos de enlace de anhídrido maleico/estireno con aminas secundarias.

30 Se elaboró un portaobjetos de PFA enlazado con 16 puntos de anhídrido maleico/estireno con 16 aminas secundarias diferentes (0,5 M, Tabla 7) disueltas en DMF mediante impresión robótica. El lavado del portaobjetos con dimetilformamida seguido de ácido acético al 1% en dimetilformamida proporciona puntos mezclados (amida-ácido carboxílico-estireno) diferentes de 16 x 250 µm sobre un portaobjetos de PFA.

Tabla 7: Lista de aminas secundarias para el microchip

Nº	Amina secundaria	Nº	Amina secundaria
1	Dimetilamina	9	Hidrocloruro de 4-Piperidinona monohidrato
2	3,3-iminodipropionitrilo	10	1-acetilpiperacina
3	Morfolina	11	1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina
4	Bis(2-metoxietil)amina	12	Pirrolidinona
5	Piperidina	13	N-metilpropargilamina
6	Dietilamina	14	N,N,N'-trimetiletildianina
7	N-bencilmetilamina	15	Tiomorfolina
8	1-metilpiperacina	16	Nipicotamida

En cada etapa del ensamblaje del recubrimiento se adquirieron espectroscopias XPS y RTA, e indicaron que cada transformación se había ejecutado. Además, la biblioteca ensamblada de sistemas mezclados (amida-ácido carboxílico-fenilo) a partir de aminas secundarias sobre un portaobjetos se cribó con IgG anti-conejo, y se observó una gran variedad de uniones de proteínas, desde muy débiles a muy fuertes.

III. Biblioteca de sistemas mezclados (amida-amida-fenilo) sobre un portaobjetos de microscopio

Paso 1. Preparación del copolímero de enlace de anhídrido maleico/estireno sobre un portaobjetos de microscopio.

Puede llevarse a cabo un procedimiento para la aplicación de un recubrimiento de sintón en un formato de microchip de la siguiente manera: se puede enmascarar un portaobjetos de microscopio con unas dimensiones de 2,5 x 7,5 x 0,1 cm, preparado a partir del moldeo por inyección de copolímero tetrafluoroetileno-perfluoroalquilo-viniléter (PFA), para crear una matriz de puntos circulares de 16 x 250 μm . El tratamiento con plasma de heptanos (5 min., 20 W, 10⁻³ torr) del portaobjetos enmascarado, seguido de la sustracción de la máscara, produce un portaobjetos de PFA consistente en puntos de 16 x 250 μm recubiertos finamente con heptano. La irradiación UV del portaobjetos en presencia de benzofenona (0,05 M) en metanol, seguida de la polimerización simultánea y el enlace de anhídrido maleico (1,75 M) y estireno (1,75 M) en acetato de etilo modifica selectivamente la capa de heptano para producir puntos de matriz densamente funcionalizados con grupos anhídrido.

Paso 2: Reacción del portaobjetos de enlace de anhídrido maleico/ estireno con aminas secundarias.

Se elaboró un portaobjetos de PFA enlazado con 16 puntos de anhídrido maleico/estireno con 16 aminas secundarias diferentes (0,5 M, Tabla 7 anterior) disueltas en DMF mediante impresión robótica. El lavado del portaobjetos con dimetilformamida seguido de ácido acético al 1% en dimetilformamida proporciona puntos mezclados (amida-ácido carboxílico-estireno) diferentes de 16 x 250 μm sobre un portaobjetos de PFA.

Paso 3: Reacción del sistema mezclado (amida-ácido carboxílico-fenilo) con diaminas.

Se trataron veintinueve copias del portaobjetos del paso 2 con DMAP (10 mol %), 1,3-diisopropilcarbodiimida (0,25 M), y N-hidroxisuccinimida (0,15 M) en DMF. Tras el lavado con DMF, los portaobjetos se separaron y cada uno se trató con una diamina diferente de la Tabla 6 anterior. Tras varias horas, los portaobjetos se lavaron con DMF y se dejaron secar bajo condiciones de vacío para proporcionar microchips de sistemas mezclados (amida 2^a-amida 1^a-fenilo) de amina. Así pues, todos los portaobjetos contienen las mismas 16 aminas secundarias, una por cada punto, pero cada portaobjetos contiene una diamina diferente, en la que todos los puntos de un mismo portaobjetos tienen la misma diamina.

Paso 4: Reacción de los intermediarios mezclados de amina (amida 2^a-amida 1^a-fenilo) con ácidos carboxílicos.

Cada uno de los treinta portaobjetos del paso 3 anterior se trató con una solución de ácido 3-yodo-4-metilbenzoico (0,25 M), 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (0,25 M), y diisopropiletilamina (0,5 M) en DMF. Las mezclas de la reacción se agitaron durante la noche antes de lavarlas con DMF y cloruro de metileno para eliminar el exceso de reactivo.

En cada etapa del ensamblaje del recubrimiento se adquirieron espectroscopias XPS y RTA, e indicaron que cada transformación se había ejecutado. Además, la biblioteca ensamblada de sistemas mezclados (amida-amida-fenilo) sobre un microchip se cribó con IgG anti-conejo, y se observó una gran variedad de uniones de proteínas, desde muy débiles a muy fuertes.

6. Recubrimiento de sintón: ejemplos con cuentas de polímero carboxiladas

Polímero de recubrimiento de sintón

Se mezclaron conjuntamente estireno libre de inhibidor (86,4 mmol), anhídrido maleico (86,4 mmol) e iniciador AIBN (0,1 mmol) en 1,4-dioxano (48 ml) en una ampolla de polimerización y se selló con una membrana de goma. La solución se desgasificó mediante el rociado con nitrógeno y se dejó polimerizar a 60° C en un baño de aceite con control de temperatura. Tras un intervalo de tiempo adecuado, se detuvo la polimerización mediante la precipitación en un exceso diez veces mayor de metanol. El copolímero se recogió mediante filtración y se purificó una vez mediante reprecipitación en metanol a partir de DMF. El copolímero alterno se caracterizó mediante GPC: P_m=270.000.

Se dispersaron 0,5 gramos del polímero producido en 50 ml de agua Millipore y se hidrolizó a 80° C con agitación durante 5 días para producir el polímero de recubrimiento de sintón, que se emplea en las cuentas y la placa de los ejemplos a continuación.

A) Absorción del polímero de recubrimiento de sintón

Paso 1: Una suspensión de 100 μ L de cuentas carboxiladas de 5 micras se lavó una vez con 2 ml de agua Millipore. Se centrifugó la suspensión y el botón de cuentas se resuspendió en 1 ml de una solución de PEI al 1 % del peso (Aldrich, 750K). Se dejó que se absorbiera el PEI durante 30 minutos, con agitación suave ocasional, y después se lavó enérgicamente 3 veces con agua Millipore para luego centrifugarse hasta obtener un botón de cuentas. Las cuentas recubiertas con PEI se resuspendieron en 1 ml del polímero de recubrimiento de sintón 1 hidrolizado al 1% (descrito anteriormente) y se dejó que se absorbiera durante 30 min. con agitación suave ocasional. Entonces se lavaron las cuentas 3 veces en agua Millipore, y en cada paso del lavado se incluyeron 20 min. de agitación suave, y se centrifugaron hasta obtener un botón de cuentas.

Paso 2: para efectuar la siguiente etapa del recubrimiento, se resuspendieron los tapones de cuentas centrifugados que contienen PEI y que han absorbido el polímero de recubrimiento de sintón en 1 ml de una solución acuosa de 5 mg/ml de EDC y, tras 1 min., se añadieron 25 μ L de 1,5-pentildiamina. Las muestras se agitaron brevemente y se dejó que la reacción de acoplamiento tuviese lugar durante 2 h. con agitación suave ocasional. Como las cuentas tendieron a la aglomeración durante este proceso, se dispersaron de nuevo durante un breve periodo en un baño ultrasónico. Las cuentas unidas a diamina se lavaron exhaustivamente 5 veces con agua Millipore y se centrifugaron hasta obtener un botón de cuentas. Estas cuentas modificadas con aminas se resuspendieron en 1 ml de agua y se añadieron 200 μ L de 3-yodo-4-metilbenzoato de sulfo-NHS (<10 mg/ml de DMF). Se dejó que la reacción tuviera lugar durante 2 h y entonces se lavaron exhaustivamente 5 veces con agua Millipore. Nótese que esta modificación puede efectuarse con cualquier número de diaminas (u otro bloque constructor de multiaminas) y ácidos carboxílicos, para permitir la generación de bibliotecas de cuentas codificadas y modificadas a partir de una única cuenta modificada de polímero de recubrimiento de sintón.

En cada etapa del ensamblaje del recubrimiento se adquirieron espectroscopias XPS que indicaron que cada transformación se había ejecutado. Este proceso se llevó a cabo en varios juegos de cuentas procedentes de Bangs Laboratories (L020621N, L020325G y coloreadas: L011009A) y de Luminex (L100-C124-01).

B) Unión covalente del polímero de recubrimiento de sintón

Paso 1: Una suspensión de 100 μ L de cuentas carboxiladas de 5 micras se lavó una vez con 2 ml de agua Millipore. Se centrifugó la suspensión y el botón de cuentas se resuspendió en 1 ml de una solución de PEI al 1 % del peso (Aldrich, 750K). Se dejó que se absorbiera el PEI durante 30 minutos, con agitación suave ocasional, y después se lavó enérgicamente 3 veces con agua Millipore para luego centrifugarse hasta obtener un botón de cuentas. La unión covalente del polímero de recubrimiento de sintón a las cuentas recubiertas con PEI se llevó a cabo resuspendiendo las cuentas recubiertas con PEI en 1 ml del polímero de recubrimiento de sintón al 1% (preparación descrita anteriormente) que se había activado con EDC, y se dejó que la reacción tuviese lugar durante 30 min. con agitación suave ocasional. Entonces se lavaron las cuentas 3 veces en agua Millipore, y en cada paso del lavado se incluyeron 20 min. de agitación suave, y se centrifugaron hasta obtener un botón de cuentas.

Paso 2: para efectuar la siguiente etapa del recubrimiento, se resuspendieron los tapones de cuentas centrifugados que contienen PEI y que han absorbido el polímero de recubrimiento de sintón en 1 ml de una solución acuosa de 5 mg/ml de EDC y, tras 1 min., se añadieron 25 μ L de 1,5-pentildiamina. Las muestras se agitaron brevemente y se dejó que la reacción de acoplamiento tuviese lugar durante 2 h. con agitación suave ocasional. Como las cuentas tendieron a la aglomeración durante este proceso, se redispersaron durante un breve periodo en un baño ultrasónico. Las cuentas unidas a diamina se lavaron exhaustivamente 5 veces con agua Millipore y se centrifugaron hasta obtener un botón de cuentas. Estas cuentas modificadas con aminas se resuspendieron en 1 ml de agua y se añadieron 200 μ L de 3-yodo-4-metilbenzoato de sulfo-NHS (<10mg/ml de DMF). Se dejó que la reacción tuviera lugar durante 2 h. y entonces se lavaron exhaustivamente 5 veces con agua Millipore. Nótese que esta modificación puede efectuarse con cualquier número de diaminas (u otro bloque constructor de multiaminas) y ácidos carboxílicos, para permitir la generación de bibliotecas de cuentas codificadas y modificadas a partir de una única cuenta modificada de polímero de recubrimiento de sintón.

En cada etapa del ensamblaje del recubrimiento se adquirieron espectroscopias XPS e indicaron que cada transformación se había ejecutado. Este proceso se llevó a cabo en varios juegos de cuentas procedentes de Bangs Laboratories (L020621N, L020325G y coloreadas: L011009A) y de Luminex (L100-C124-01).

C) Ensayo multiplex basado en cuentas

Las cuentas codificadas y carboxiladas empleadas en el ensayo se obtuvieron de Luminex, y se trataron con el procedimiento del paso 1 de la Absorción del polímero de recubrimiento de sintón descrito anteriormente. Se transfirieron 5×10^6 microesferas a un tubo de microcentrifugación de 15 mL, se centrifugaron hasta obtener un precipitado y se resuspendieron en 5 mL de 0,1 M de MES, a pH 4,5, asegurándose de centrifugar y sonicar bien las cuentas.

Se añadieron 0,2 nmol de oligosondas de captura (2 mL de 1:10 del stock en dH₂O) a las cuentas, seguido de una alícuota fresca de 10 mg/mL de EDC en dH₂O (2,5 mL). Se dejó que la reacción tuviera lugar durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, de manera previa al lavado y la carga del recipiente con otra solución fresca

de 2,5 mL de EDC. Esta solución también se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, y luego se lavó con 1,0 mL de Tween-20 al 0,02%. La suspensión se centrifugó durante 1 minuto para producir un precipitado y se sustrajo cuidadosamente el sobrenadante. Entonces se lavaron las cuentas con 1,0 mL de SDS al 0,1%, se centrifugaron durante 1 minuto para producir un precipitado y se sustrajo cuidadosamente el sobrenadante. Finalmente, se suspendieron las cuentas en 100 mL de TE, a pH 8,0 y se almacenaron a 2-8° C en completa oscuridad.

Las cuentas acopladas se resuspendieron en un tampón 1,5 x TMAC y se distribuyeron en un pocillo de muestra o de control de la placa de PCR. Entonces se añadió el DNA biotinilado amplificado y se añadió TE, a pH 8,0 para hacer un total de 17 mL. Las soluciones se pipetearon suavemente arriba y abajo para mezclarlas. Las muestras se cubrieron con un sellador de placa y se colocaron en un termociclador en un programa que empieza a 95° C (paso de desnaturalización) durante 5 minutos y que sigue con 52° C (paso de hibridación) durante 15 minutos. La placa se centrifugó luego (2250 x g, 3 minutos) y el sobrenadante se sustrajo cuidadosamente. La placa se colocó de nuevo en la PCR a 52° C. Se añadieron 75 mL de la solución que contiene el marcaje a cada pocillo, se mezcló suavemente y se incubó a 52° C durante 5 minutos, de manera previa al análisis mediante un instrumento de Luminex, para producir una relación señal/ ruido mejorada en relación a las cuentas codificadas carboxiladas no modificadas.

7. Recubrimiento de una placa con múltiples pocillos

A) Placa de microtitulación no reactiva

Paso 1: se añadieron 200 µL de PEI al 1% del peso (Aldrich, 750K) a los pocillos de la placa de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 60 min. Entonces se lavaron los pocillos 5 veces con agua Millipore. Se añadieron 200 µL del polímero de recubrimiento de sintón al 1 % del peso (preparación descrita anteriormente) a los pocillos y se dejó que la interacción tuviera lugar durante 60 min. Entonces se lavaron los pocillos 5 veces con agua Millipore.

Paso 2: se añadieron a los pocillos 200 µL de 1,5-pentildiamina al 1% del volumen en una solución acuosa de 5 mg/ml de y se dejó que el acoplamiento tuviera lugar durante 2 h. Entonces se lavaron los pocillos 5 veces con agua Millipore. Se añadieron a los pocillos 200 µL de una solución de acoplamiento que contiene 5 mg/ml de EDC y 5 mg/ml del ácido 3-yodo-4-metil-benzoico en DMSO y se dejó que proceder durante 2 horas tras las cuales los pocillos se lavaron dos veces con DMSO fresco y luego 5 veces con agua Millipore.

Nótese que esta modificación puede efectuarse con cuantas diaminas (u otro bloque constructor de multiaminas) y ácidos carboxílicos se quiera, para permitir la generación de bibliotecas de pocillos de placas de microtitulación modificadas a partir de una única cuenta modificada de polímero de recubrimiento de sintón.

En cada etapa del ensamblaje del recubrimiento se adquirieron espectroscopias XPS e indicaron que cada transformación se había ejecutado. Las placas modificadas se pudieron emplear entonces en protocolos de inmunoensayo estándar para la técnica ELISA y otros procedimientos diagnósticos.

B) Placa de microtitulación reactiva

Paso 1: se añadieron 200 µL de polímero de recubrimiento de sintón 1% del peso (preparación descrita anteriormente) a los pocillos de la placa activa NHS, de DNA-BIND (Corning) y de la placa ReactiBind (Pierce), y se dejó que la reacción tuviera lugar durante 60 min. Entonces se lavaron los pocillos 5 veces con agua Millipore.

Paso 2: se añadieron a los pocillos 200 µL de 1,5-pentildiamina al 1% del volumen en una solución acuosa de 5 mg/ml de y se dejó que el acoplamiento tuviera lugar durante 2 h. Entonces se lavaron los pocillos 5 veces con agua Millipore. Se añadieron a los pocillos 200 µL de una solución de acoplamiento que contiene 5 mg/ml de EDC y 5 mg/ml de ácido 3-yodo-4-metil-benzoico en DMSO y se dejó que proceder durante 2 horas tras las cuales los pocillos se lavaron dos veces con DMSO fresco y luego 5 veces con agua Millipore.

Nótese que esta modificación puede efectuarse con cuantas diaminas (u otro bloque constructor de multiaminas) y ácidos carboxílicos se quiera, para permitir la generación de bibliotecas de pocillos de placas de microtitulación modificadas a partir de una única cuenta modificada de polímero de recubrimiento de sintón.

En cada etapa del ensamblaje del recubrimiento se adquirieron espectroscopias XPS e indicaron que cada transformación se había ejecutado. Las placas modificadas se pudieron emplear entonces en protocolos de inmunoensayo estándar para la técnica ELISA y otros procedimientos diagnósticos.

8. Recubrimiento de la membrana de PVDF

Paso 1: Activación de la membrana con polímero de sintón enlazado

5 Se colocaron cuatro trozos de 10 x 20 cm de la membrana de PVDF Immobilon-P^{SQ} (Millipore) en un vaso de precipitados de 700 ml. El vaso de precipitados se llenó con una solución de acetato de etilo 1.5 M de estireno y anhídrido maleico en proporción 1:1, se desgasificó mediante purgación con nitrógeno y se selló. Entonces la solución se irradió en una celda gamma durante 100 min. Se sustrajeron las membranas irradiadas de la solución de polimerización y se lavaron con un considerable exceso de acetato de etilo. Una vez el lavado se completó, se secaron las membranas bajo condiciones de fuerte vacío durante la noche y se almacenaron en un armario con poca humedad.

10 Paso 2: Modificación de la membrana

Se preparó una solución estándar de la amina en THF (100 ml, 0,25 M, 0,025 mol) para cada amina utilizada. Las membranas de PVDF enlazadas se cortaron a la medida de 10 x 10 cm, y se colocaron en una placa de Petri. Entonces, se vertió cuidadosamente la solución de amina de 100 ml en la placa de Petri, asegurándose de que la membrana estuviera completamente empapada. Las placas de Petri se sellaron entonces con tapas y se dejaron agitándose (muy lentamente) durante la noche a temperatura ambiente. La solución de reacción se sustrajo de la placa de Petri y se lavaron las membranas con THF, se secaron bajo condiciones de vacío y se almacenaron en un armario con poca humedad.

15 Nótese que esta modificación puede efectuarse con cuantas diaminas (u otro bloque constructor de multiaminas) y ácidos carboxílicos se quiera, para permitir la generación de bibliotecas de membranas de PVDF modificadas a partir de una única membrana modificada de polímero de sintón enlazado.

20 En cada etapa del ensamblaje del recubrimiento se adquirieron espectroscopias XPS y RTA, e indicaron que cada transformación se había ejecutado. Las placas modificadas se pudieron emplear entonces en protocolos de electrotransferencia estándar para las aplicaciones de Western blot, para incrementar la cantidad de proteína capturada disponible para el inmunoensayo.

25 9. Recubrimiento de sintón: determinación del recubrimiento óptimo para una aplicación específica deseada

Paso 1: Preparación de una biblioteca en el formato deseado:

30 Se ensambla una biblioteca de superficies diferentes, pero relacionadas, en el formato deseado para la aplicación (microchip, cuenta, placa, etc), empleando los métodos descritos anteriormente.

Paso 2: Cribado de la biblioteca ensamblada

35 Las bibliotecas ensambladas se criban con la diana deseada para la aplicación deseada, tal como cribados biológicos para quinasas, IgG de conejo, citoquinas o cribados sintéticos para optimizaciones de reacción, o similares. El resultado de este cribado será la identificación de la superficie óptima para dicha aplicación deseada, de forma rápida y rentable.

40 Si no se logra el nivel de señal deseado en el primer cribado de las bibliotecas, entonces se ensambla una segunda biblioteca, más específica, con el conocimiento procedente de la primera, y se repite el cribado hasta que se logre el nivel de señal deseado. Puede que más de una superficie de cada cribado logre el nivel de señal deseado.

45 Paso 3: Generación de un recubrimiento de sintón para una aplicación específica deseada.

Una vez se ha determinado la superficie óptima para la aplicación deseada, se puede ensamblar la superficie identificada mediante cualquier método requerido que produzca la superficie de forma rentable (tanto económicamente como en relación al tiempo). Además, los resultados de varios eventos de cribado se pueden ensamblar sobre una superficie, tal como un microchip, dando como resultado una plataforma multiplex que tiene o que consiste en múltiples elementos o partes para realizar más de un experimento.

50 A lo largo de esta descripción y en las reivindicaciones siguientes, a menos que el contexto dicte lo contrario, la palabra "incluye" y las variaciones como "incluyen" e "incluyendo", implicarán la inclusión de una entidad o paso, o grupo de entidades o pasos definidos, pero no la exclusión de ninguna otra entidad o paso o grupo de entidades o pasos.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para la generación de una biblioteca de diferentes recubrimientos de superficie sobre un sustrato que incluye:
- 10 a) la selección de un sintón de recubrimiento de superficie con la fórmula B-S-F, en el que B es un copolímero de al menos un constituyente monomérico P y al menos un constituyente monomérico A, S es una unidad espaciadora y F es un grupo funcional capaz de actuar como punto para modificaciones químicas adicionales de la superficie, en el que S se adhiere al constituyente monomérico A del copolímero B, y en el que el sintón tiene al menos un punto de diversidad seleccionado de entre P, A, S y F;
- 15 b) la aplicación de el(los) recubrimiento(s) basal(es) del copolímero B seleccionado sobre un sustrato;
- c) la unión de la(s) combinación(es) seleccionada(s) de la unidad espaciadora S y el grupo funcional F al constituyente A del copolímero B de acuerdo con dicho sintón seleccionado;
- 20 en el que los pasos b) y c) se llevan a cabo de tal manera que los recubrimientos de superficie de acuerdo con el sintón se generan en regiones localizadas del sustrato, proporcionando así dicha biblioteca de diferentes recubrimientos de superficie sobre el sustrato.
- 25 **2.** El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sustrato se selecciona de entre un polímero orgánico, vidrio, silicón, metal y combinaciones de los mismos.
- 3.** El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sustrato se presenta en forma de portaobjetos de microscopio, placa de microtitulación, membrana porosa, punta de pipeta, tubo o numerosas cuentas.
- 4.** El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el sustrato es un polímero orgánico.
- 30 **5.** El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el polímero orgánico se selecciona de entre politetrafluoroetileno, poliestireno, polipropileno, polietileno, fluoruro de polivinilideno y polimetilmetacrilato.
- 6.** El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el polímero orgánico se presenta en forma de numerosas cuentas.
- 35 **7.** El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que las cuentas se marcan de tal manera que se puede relacionar un recubrimiento particular con una cuenta particular o un subgrupo de cuentas.
- 8.** El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que las cuentas son cuentas Luminex™.
- 40 **9.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la biblioteca incluye al menos 10 recubrimientos de superficie diferentes.
- 10.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la biblioteca incluye al menos 100 recubrimientos de superficie diferentes.
- 45 **11.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la biblioteca incluye al menos 1.000 recubrimientos de superficie diferentes.
- 12.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la biblioteca incluye al menos 10.000 recubrimientos de superficie diferentes.
- 50 **13.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el constituyente A del copolímero B es un residuo polimerizado de un compuesto seleccionado de entre aquellos que se enumeran en la Tabla 1 de esta descripción.
- 55 **14.** El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el constituyente A del copolímero B es un residuo polimerizado de anhídrido maleico.
- 15.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que el constituyente P del copolímero B es un residuo polimerizado de un compuesto seleccionado de entre aquellos que se enumeran en la Tabla 2 de esta descripción.
- 60 **16.** El método de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el constituyente P del copolímero B es un residuo polimerizado de estireno.
- 65

17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que copolímero B es un copolímero alterno.
- 5 18. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en el que copolímero B es un copolímero en bloque del constituyente A y el constituyente P pasivo.
19. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en el que copolímero B es un copolímero de anhídrido maleico y estireno.
- 10 20. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en el que copolímero B además incluye un agente controlador C.
21. El método de acuerdo con la reivindicación 20, en el que el agente controlador se selecciona de entre un agente controlador RAFT, un agente controlador ARTP y un agente controlador de nitróxido.
- 15 22. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en el que la unidad espaciadora S tiene la estructura:
- 20 X_Q_Y
- en la que X es el residuo de un grupo amino, hidroxilo, tiol, ácido carboxílico, anhídrido, isocianato, cloruro de sulfonilo, anhídrido sulfónico, cloroformato, cetona o aldehído; Y es como se ha definido para X; y Q es un grupo orgánico divalente, y en la que X e Y no son reactivas entre sí o en relación a Q.
- 25 23. El método de acuerdo con la reivindicación 22, en el que Q se selecciona de entre alquilenos de C₁ a C₂₀ opcionalmente sustituidos, alquinilenos de C₂ a C₂₀ opcionalmente sustituidos, alquinilenos de C₂ a C₂₀ opcionalmente sustituidos y arilenos de C₆ a C₂₀ opcionalmente sustituidos, en el que uno o más átomos de carbono pueden sustituirse con un heteroátomo seleccionado de entre O, S o N.
- 30 24. El método de acuerdo con la reivindicación 22 o la reivindicación 23, en el que la unidad espaciadora S es un residuo de una diamina.
25. El método de acuerdo con la reivindicación 24, en el que la unidad espaciadora S es un residuo de una alquilodiamina.
- 35 26. El método de acuerdo con la reivindicación 25, en el que la unidad espaciadora S es un residuo de 1,5-diaminopentano o N-(3-aminopropil)-1,3-propandiamina.
- 40 27. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en el que el grupo funcional F es un grupo con capacidad de unirse o reaccionar químicamente con una molécula o componente biológico.
28. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en el que el grupo funcional F incluye un grupo de amina primaria o secundaria.
- 45 29. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-28, en el que el sintón tiene, entre el constituyente A, el constituyente P, la unidad espaciadora S y el grupo funcional F, un único punto de diversidad en la selección de la unidad espaciadora S.
- 50 30. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-28, en el que el sintón tiene, entre el constituyente A, el constituyente P, la unidad espaciadora S y el grupo funcional F, un único punto de diversidad en la selección del grupo funcional F.
- 55 31. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-28, en el que el sintón tiene, entre el constituyente A, el constituyente P, la unidad espaciadora S y el grupo funcional F, dos puntos de diversidad en la selección de la unidad espaciadora S y el grupo funcional F.
- 60 32. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-31, en el que el(los) recubrimiento(s) basal(es) del copolímero B se aplican sobre el sustrato mediante enlace, u otros métodos de recubrimiento seleccionados de entre el recubrimiento por inmersión, la polimerización por plasma, deposición de vapor, impresión por sellado, irradiación gamma, exposición al haz de electrones, y radiación térmica y fotoquímica.
33. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-32, en el que la(s) combinación(es) de la unidad espaciadora S y el grupo funcional F se adhieren mediante:
- 65 1) la unión de la unidad espaciadora S al copolímero B y entonces, la unión del grupo funcional F al grupo espaciador S adherido; o

- 2) la unión de la unidad espaciadora S al copolímero B, en el que la unidad espaciadora S ya tiene unido el grupo funcional F.
- 5 **34.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-33, en el que el(los) recubrimiento(s) basal(es) del copolímero B seleccionado se aplica(n) sobre regiones localizadas del sustrato.
- 35.** El método de acuerdo con la reivindicación 34, el(los) recubrimiento(s) basal(es) del copolímero B seleccionado se aplica(n) a numerosas cuentas.
- 10 **36.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-33, en el que el(los) recubrimiento(s) basal(es) del copolímero B seleccionado se aplica(n) sobre la superficie del sustrato, y la(s) combinación(es) seleccionadas de la unidad espaciadora S y el grupo funcional F se une(n) al copolímero B en regiones localizadas.
- 15 **37.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-36, en el que los recubrimientos de superficie de acuerdo con el sintón que se han generado en regiones localizadas del sustrato se resuelven espacialmente.
- 38.** Un método para la optimización de una superficie de sustrato para aplicaciones en fase sólida incluyendo la inmovilización de una molécula, que incluye:
- 20 a) la generación de una biblioteca de diferentes recubrimientos de superficie sobre un sustrato mediante un método que incluye:
- 25 1) la selección de un sintón de recubrimiento de superficie con la fórmula B-S-F, en el que B es un copolímero de al menos un constituyente P monomérico y al menos un constituyente A monomérico, S es una unidad espaciadora y F es un grupo funcional con capacidad de actuar como punto para modificaciones químicas adicionales de la superficie, en el que S se une al constituyente A de copolímero B, y en el que el sintón tiene al menos un punto de diversidad seleccionado de entre P, A, S y F;
- 30 2) la aplicación de el(los) recubrimiento(s) basal(es) del copolímero B seleccionado sobre un sustrato;
- 3) la unión de la(s) combinación(es) seleccionada(s) de la unidad espaciadora S y el grupo funcional F al constituyente A del copolímero B de acuerdo con dicho sintón seleccionado;
- 35 en el que los pasos 2) y 3) se llevan a cabo de tal manera que los recubrimientos de superficie de acuerdo con el sintón se generan en regiones localizadas del sustrato, proporcionado así dicha biblioteca de diferentes recubrimientos de superficie sobre el sustrato.
- 40 b) la exposición de al menos dos de los recubrimientos de superficie en la biblioteca a la molécula que se va a inmovilizar; y
- c) la determinación de cual de las al menos dos superficies da como resultado un mejor rendimiento de la molécula inmovilizada en la aplicación en fase sólida.
- 45 **39.** El método de la reivindicación 38 en el que la aplicación en fase sólida incluye la inmovilización de una molécula biológica o un análogo de una molécula biológica seleccionado de entre proteínas, péptidos, ácidos peptidonucleicos, ácidos nucleicos, ácidos nucleicos no naturales, oligonucleótidos e hidratos de carbono.
- 40.** El método de acuerdo con la reivindicación 38, en el que la aplicación en fase sólida incluye la detección de la unión de un ligando a una molécula biológica inmovilizada.
- 50 **41.** Un método para la ejecución de la aplicación en fase sólida que incluye la inmovilización de una molécula sobre una superficie de sustrato optimizado mediante el método de la reivindicación 38.
- 42.** Un método para la adaptación de un recubrimiento de superficie para que reconozca, se una o se asocie con una molécula particular que incluye:
- 55 a) la generación de una biblioteca de diferentes recubrimientos de superficie sobre un sustrato mediante un método que incluye:
- 60 1) la selección de un sintón de recubrimiento de superficie con la fórmula B-S-F, en el que B es un copolímero de al menos un constituyente P monomérico y al menos un constituyente A monomérico, S es una unidad espaciadora y F es un grupo funcional con capacidad de actuar como punto para modificaciones químicas adicionales de la superficie, en el que S se une al constituyente A de copolímero B, y en el que el sintón tiene al menos un punto de diversidad seleccionado de entre P, A, S y F;
- 65 2) la aplicación de el(los) recubrimiento(s) basal(es) del copolímero B seleccionado sobre un sustrato;

3) la unión de la(s) combinación(es) seleccionada(s) de la unidad espaciadora S y el grupo funcional F al constituyente A del copolímero B de acuerdo con dicho sintón seleccionado;

5 en el que los pasos 2) y 3) se llevan a cabo de tal manera que los recubrimientos de superficie de acuerdo con el sintón se generan en regiones localizadas del sustrato, proporcionado así dicha biblioteca de diferentes recubrimientos de superficie sobre el sustrato.

b) la exposición de al menos dos de los recubrimientos de superficie en la biblioteca a la molécula particular; y

10 c) la determinación de cual de las al menos dos superficies reconoce, se une o se asocia con la molécula particular.