

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 481**

51 Int. Cl.:
C07F 9/6581 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03747145 .5**
96 Fecha de presentación: **17.04.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1501842**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.02.2005**

54 Título: **Soportes sólidos funcionalizados para dendrímeros fosforados, procedimiento para su preparación y sus aplicaciones**

30 Prioridad:
23.04.2002 FR 0205049

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.09.2012

73 Titular/es:
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
3, AVENUE MICHEL ANGE
75016 PARIS, FR;
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE y
INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES
APPLIQUEES DE TOULOUSE**

72 Inventor/es:
**TREVISIOL, Emmanuelle;
LECLAIRE, Julien;
PRATVIEL, Geneviève;
CAMINADE, Anne-Marie;
FRANCOIS, Jean;
MAJORAL, Jean-Pierre y
MEUNIER, Bernard**

74 Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

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).

ES 2 387 481 T3

DESCRIPCIÓN

Soportes sólidos funcionalizados para dendrímeros fosforados, procedimiento para su preparación y sus aplicaciones

5

La presente invención se refiere a soportes sólidos funcionalizados por dendrímeros fosforados, a su procedimiento de preparación, a su utilización para la preparación de biochips y a las aplicaciones de estos biochips, en particular para la inmovilización de macromoléculas, especialmente macromoléculas biológicas tales como ácidos nucleicos, lípidos, proteínas (péptidos, enzimas, anticuerpos, etc.) o sus pares moleculares.

10

El desarrollo exponencial de la genómica y de la farmacogenómica relacionado no solamente con la secuenciación del genoma humano, sino también con el de los animales, bacterias, virus, plantas, etc. ha llevado a los laboratorios de investigación académicos o industriales a la utilización masiva de biochips fiables y fáciles de fabricar.

15 Sin embargo, en este caso particular, es primordial poder disponer de soportes sólidos funcionalizados que presenten un cierto número de características.

En particular, estos soportes deben permitir la inmovilización reproducible de moléculas de interés, en la medida en que una inmovilización reproducible es imperativa para una detección también reproducible.

20

Asimismo estos soportes deben permitir la inmovilización de moléculas de interés de manera sensible. La sensibilidad de un soporte sólido funcionalizado depende del grado de inmovilización y del procedimiento de detección de una señal, pero también y sobre todo del nivel de ruido de fondo (señal no específica). Una disminución del ruido de fondo mejora la relación señal/ruido. De hecho, en el dispositivo en el que se detecta la presencia de especies biológicas en las proximidades de la superficie, el ruido de fondo proviene esencialmente de la adsorción no específica de moléculas, incluso moléculas biológicas de interés marcadas y que en consecuencia conviene limitar. Lo ideal por tanto es obtener un soporte que tenga un ruido de fondo muy bajo y una elevada intensidad de detección de la señal.

30 Por otra parte, y especialmente en el caso particular de las reacciones de hibridación que utilizan ácidos nucleicos, el acoplamiento de las sondas a la superficie de un soporte sólido debe garantizar la integridad de la secuencia y la estabilidad del depósito. Después de la etapa de hibridación, los resultados deben ser reproducibles de un soporte a otro. Para este propósito, las sondas deben estar separadas de la superficie del soporte sólido con el fin de no perturbar la hibridación con los ácidos nucleicos diana. Esto permite una aproximación a las condiciones de hibridación en disolución simulando una hibridación en tres dimensiones en lugar de las dos dimensiones obtenidas convencionalmente mediante la técnica del portaobjetos de vidrio. Para evitar los impedimentos estéricos entre el ADN y la superficie del soporte es necesario un espaciador de al menos unos 40 átomos (4 – 5 nm).

40 Por otra parte, es importante poder disponer de soportes sólidos funcionalizados reutilizables. La posibilidad de poder disponer de un soporte reutilizable es de un gran interés puesto que permite el análisis de varias muestras biológicas con un único dispositivo, lo que permite llevar a cabo comparaciones cuantitativas. Además, los soportes reutilizables permiten la realización de varias mediciones sobre una misma muestra y así posibilita la mejora de los resultados desde un punto de vista estadístico.

45 Hasta el momento, se han propuesto diferentes tipos de procedimientos de preparación de biochips.

Los biochips, y en particular los biochips de ácidos nucleicos, se pueden fabricar por síntesis *in situ* o por inmovilización de sondas.

50 En el primer caso (síntesis *in situ*), las sondas son oligonucleótidos que se sintetizan directamente sobre el soporte paso a paso y que tienen un tamaño comprendido generalmente entre 20 y 30 bases. Este procedimiento de fabricación permite tener acceso a chips de alta densidad (McGall y col., J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 5081 – 5090).

55 En el segundo caso (inmovilización de sondas), las sondas se sintetizan previamente y a continuación se inmovilizan sobre el soporte. Por tanto pueden entrar en juego dos tipos de interacciones con la superficie.

La sonda de ácidos nucleicos se puede mantener sobre la superficie por interacciones electrostáticas entre los grupos fosfato del esqueleto cargados negativamente y la superficie modificada del soporte cargada positivamente.

A modo de ejemplo, este tipo de biochips se pueden obtener recubriendo la superficie con poli-L-lisina o por silanización con un aminosilano (Zammatteo y col., Anal. Biochem., 2000, 280, 143 – 150; Eisen y col., Methods in Enzymol, 1999, 303, 179 – 205). En este tipo de inmovilización, generalmente la sonda está tendida sobre el soporte, lo que puede causar problemas de accesibilidad durante la etapa de hibridación. Además, esta forma de interacciones iónicas no es suficientemente estable para permitir la reutilización del biochip.

La sonda de ácidos nucleicos también puede estar injertada sobre el soporte mediante interacciones covalentes. En general, las uniones entre las sondas y el soporte se establecen a través de uno de los extremos 3' o 5' del ácido nucleico, lo que permite la accesibilidad de la sonda a lo largo de toda su longitud con una mejor calidad de respuesta en términos de hibridación. Se pueden encontrar diversas combinaciones en la funcionalización del soporte y de los ácidos nucleicos. El soporte puede incluir, por ejemplo, grupos funcionales nucleófilos tales como -NH₂ o -SH y el ácido nucleico a injertar incluye por tanto un grupo funcional electrófilo tal como por ejemplo un grupo funcional -CHO, -NCS, -NHS o incluso -COOR, y viceversa. De acuerdo con otra variante, el soporte y el ácido nucleico pueden ser nucleófilos y un espaciador dielectrófilo permitirá el acoplamiento entre las dos entidades. Por último, el soporte y la sonda pueden ser electrófilos y el acoplamiento se llevará a cabo gracias a un espaciador dinucleófilo.

Los biochips fabricados en la actualidad se producen, en su gran mayoría, utilizando vidrio como soporte.

Los más utilizados cuentan con superficies funcionalizadas con un espaciador terminado por un grupo funcional -NH₂. Su eficacia en términos de acoplamiento e hibridación ha sido confirmada, pero no es posible la reutilización de este tipo de portaobjetos ya que las interacciones entre las sondas y el soporte son de tipo iónico.

Se comercializan otros portaobjetos que tienen en su superficie grupos funcionales aldehído. Estos grupos funcionales se introducen mediante la utilización de un silano-aldehído, un espaciador simple, que sólo presenta un único grupo funcional de anclaje por molécula que se encuentra del lado del soporte o del lado de los ácidos nucleicos. Sin embargo se ha demostrado que el anclaje en varios puntos de la superficie es importante (Zhao y col., Nucl. Acids Res., 2001, 29, 955 – 959; solicitud internacional WO 01/51689) puesto que permite asegurar el incremento de los sitios de fijación de las sondas sobre el soporte, que da como resultado una mejor respuesta en términos de hibridación.

Otra forma de obtener una mejor sensibilidad de detección está presente, en particular, en el trabajo de M. Beier y J.D. Hoheisel, Nucl. Acids Res., 1999, 27, 1970 – 1977. Los autores construyeron, sobre un portaobjetos de vidrio, moléculas ramificadas de seis ramas con el objetivo de aumentar la densidad de las sondas. La naturaleza de estos espaciadores ramificados también permite modular la naturaleza hidrófila o hidrófoba de la superficie. Su procedimiento de preparación incluía un total de ocho etapas de síntesis, a partir de un portaobjetos aminado, para obtener el biochip, lo que limita enormemente su desarrollo industrial. Además, las moléculas ramificadas se generan *in situ* de forma no controlada y su estructura no está definida, por lo que no se puede garantizar la homogeneidad de la superficie del biochip obtenido de esta forma. Al ser todos los enlaces covalentes, los autores demostraron que sus biochips se podían reutilizar. Cabe señalar que la reutilización de biochips es habitual en el caso de un soporte de Nylon® y que más recientemente se ha descrito la utilización de plástico (véase solicitud internacional WO 00/55627).

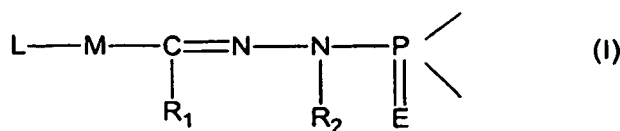
Por último, trabajos recientes (Benters y col., ChemBioChem., 2001, 2, 686 – 694) describe la utilización de dendrímeros aminados "PAMAM® Starburst" para la fabricación de biochips, en siete etapas de síntesis exigentes en términos de condiciones de funcionamiento, y donde algunas de ellas no se pueden controlar puesto que se realizan directamente sobre el vidrio, para la obtención de un soporte que no es estable en el tiempo. En efecto, la utilización de estos biochips incluye una etapa previa de activación de la capa de dendrímeros antes de realizar el acoplamiento con los oligonucleótidos. Esta etapa genera una superficie reactiva que no es estable en el tiempo ya que los autores indican que las sondas se deben injertar inmediatamente después de la activación. Esto limita enormemente la comercialización de este tipo de soporte.

El desarrollo exponencial de la genómica y de la farmacogenómica relacionado no solamente con la secuenciación del genoma humano, sino también con el de los animales, bacterias, virus, plantas, etc. ha llevado a los laboratorios de investigación académicos o industriales a la utilización masiva de biochips fiables y fáciles de fabricar. La reutilización es un criterio adicional que permite validar de manera estadística los ensayos biológicos. Por tanto, con el fin de superar todos estos inconvenientes y ofrecer biochips reutilizables que se puedan fabricar a bajo coste, en pocas etapas, de manera controlada y reproducible y que presenten una excelente estabilidad y una muy buena sensibilidad de detección, los inventores han puesto a punto lo que supone el objeto de la invención.

La presente invención tiene por tanto como primer objeto un soporte sólido caracterizado porque comprende al menos una superficie funcionalizada de manera covalente por dendrímeros fosforados que poseen un núcleo central que contiene al menos dos grupos funcionales y que incluyen en su periferia varios grupos funcionales capaces de permitir la fijación de dichos dendrímeros sobre dicha superficie así como la fijación o síntesis *in situ* de moléculas de interés, dichos dendrímeros que tienen un tamaño comprendido entre 1 y 20 nm, y en donde los dendrímeros se seleccionan entre aquellos constituidos por:

- una capa central en forma de núcleo central P₀, que opcionalmente contiene fósforo, que comprende de 2 a 12 grupos funcionalizados,

- n capas intermedias, iguales o diferentes, cada una de dichas capas intermedias que está compuesta de unidades P₁ que se corresponden con la fórmula (I) siguiente:



15

en la que:

L es un átomo de oxígeno, fósforo, azufre o nitrógeno,

20

M representa uno de los grupos siguientes:

• un grupo aromático no sustituido, di-, tri- o tetra-sustituido con grupos alquilo, grupos alcoxi, grupos insaturados del tipo olefínico C₁-C₁₂, azo, acetilénico, todos ellos que pueden o pueden no incorporar átomos de fósforo, oxígeno, nitrógeno, azufre o halógenos, o

25

• un grupo alquilo o alcoxi que tiene varios sustituyentes como se define para M cuando es un grupo aromático,

R₁ y R₂, que pueden ser iguales o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o uno de los siguientes grupos: alquilo, alcoxi, arilo, que contienen o no contienen átomos de fósforo, oxígeno, azufre, nitrógeno o halógeno, siendo R₂ lo más habitualmente diferente de R₁,

30

n es un número entero comprendido entre 1 y 11,

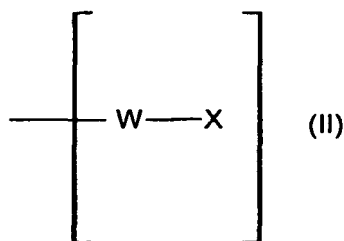
E es un átomo de oxígeno, azufre o nitrógeno, en donde dicho átomo de nitrógeno puede estar unido a un grupo alquilo, alcoxi o arilo, todos ellos que pueden o pueden no incorporar átomos de fósforo, oxígeno, nitrógeno, azufre o halógenos,

35

- una capa externa compuesta de unidades P₂, iguales o diferentes, y

40

que se corresponden con la siguiente fórmula II:



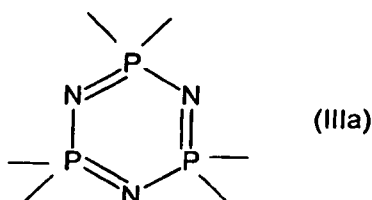
en la que:

W es uno de los siguientes grupos: alquilo, alcoxi, arilo, todos estos grupos que contienen o no contienen átomos de fósforo, oxígeno, nitrógeno, azufre o halógenos,

5 X representa un grupo aldehído, tiol, amina, epóxido, ácido carboxílico, alcohol o fenol.

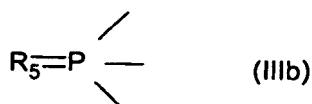
En la siguiente descripción, dichos soportes sólidos funcionalizados por los dendrímeros fosforados se denominan "dendriportas".

- 10 Los dendrímeros son polímeros isomoleculares con una estructura ramificada y definida, formados de un núcleo central (corazón) a partir del cual se generan o se injertan las ramificaciones. Estas ramificaciones son multifuncionales, es decir, que tienen particularmente en la periferia, varios grupos químicos funcionales, iguales o diferentes, seleccionados según las propiedades que se desea conferir al dendrímero. Cada nueva generación se obtiene por introducción de un nuevo nivel de ramificaciones. La totalidad de los puntos de unión de las ramas
- 15 situadas a la misma distancia del corazón corresponde a una generación. En la Figura 1 anexa se proporciona una representación esquemática de un dendrímero de generación 4, obtenido a partir de un corazón trifuncional. De manera preferente, el núcleo central P₀ de estos dendrímeros se selecciona del grupo constituido por el grupo con la fórmula general IIIa:



20

y el grupo con la fórmula general IIIb:

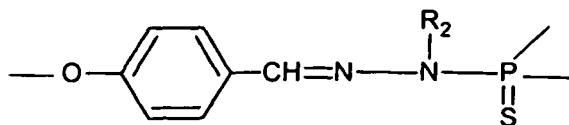


25

en la que R₅ representa un átomo de azufre, oxígeno o nitrógeno.

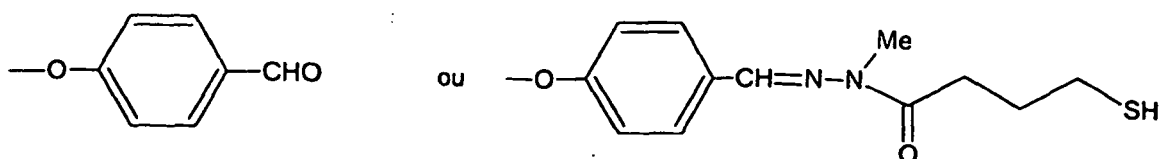
Según una forma de realización ventajosa de la invención, los dendrímeros se seleccionan entre los compuestos en los que el grupo con la fórmula (I) anterior representa el grupo siguiente:

30



en la que R₂ representa un radical alquilo C₁-C₁₂ y más en particular un radical metilo; y el grupo con la fórmula (II) representa uno de los dos grupos siguientes:

35



y en las que el número de generaciones varía preferentemente entre 1 y 6.

- 5 En las Figuras 2 y 3 anexas se proporcionan ejemplos de dichos dendrímeros, que representan respectivamente la estructura de un dendrímero de generación 4 con terminaciones aldehído y la estructura de un dendrímero de generación 3 con terminaciones tiol.

Entre los soportes sólidos que pueden estar funcionalizados de acuerdo con la invención se pueden citar en particular los soportes que contienen al menos una superficie silicificada tales como portaobjetos, perlas y capilares de vidrio, soportes de silicio o de plástico y soportes metálicos tales como láminas de oro.

Los dendrímeros utilizados de acuerdo con la invención se pueden sintetizar de manera continua de una forma conocida por el experto en la materia, por repetición de una misma secuencia de reacción que permite la obtención de una nueva generación al final de cada ciclo de síntesis y, por tanto, de un número creciente de ramas y de funciones periféricas completamente idénticas (Tomalia D.A., Ang. Chem. Int. Ed., 1990, 29, 138; Launay y col., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1994, 33, 1589 y J. Organomet. Chem., 1997, 529, 51).

En particular, estos dendrímeros se pueden construir paso a paso a partir de un núcleo central que tiene al menos dos grupos funcionales tales como, por ejemplo hexaclorociclotrifosfaceno: $N_3P_3Cl_6$, que tiene seis grupos funcionales.

De forma más precisa, estos dendrímeros en general se construyen por la repetición de dos etapas a partir del corazón. La primera etapa es la sustitución de los átomos de cloro en medio básico por un compuesto difuncional que presenta una función alcohol y una función aldehído, por ejemplo, 4-hidroxibenzaldehído. La segunda etapa genera los puntos de ramificación y consiste en una reacción de condensación con un compuesto que presenta dos tipos de grupos funcionales: un grupo NH_2 y al menos un grupo PCl_2 como por ejemplo el compuesto $H_2NNMeP(S)Cl_2$. Las dos primeras etapas del procedimiento de síntesis a partir del corazón hexafuncional están representadas en el esquema de síntesis A mostrado en la Figura 4 anexa.

Una secuencia iterativa de etapas de síntesis permite construir dendrímeros de generación creciente.

La Tabla I siguiente indica el número de grupos funcionales terminales presentes en la periferia de los dendrímeros de diferentes generaciones obtenidos a partir del corazón N_3P_3 , así como su tamaño en Angstroms.

Tabla I

Generación	Número de funciones	Tamaño (Å)
1	12	30
2	24	45
3	48	60
4	96	75
5	192	90
6	384	105
7	768	120

La presente invención también tiene por objeto un procedimiento de preparación de un soporte sólido de acuerdo con la invención (dendriporta), caracterizado porque comprende una etapa de formación de un enlace covalente entre dendrímeros fosforados que tienen un núcleo central que contiene al menos dos grupos funcionales, dichos dendrímeros que comprenden en su periferia varias funciones capaces de permitir su fijación sobre dicha superficie

y la fijación o la síntesis *in situ* de moléculas de interés, y la superficie funcionalizada o no de un soporte sólido para obtener un soporte sólido funcionalizado de forma covalente mediante dichos dendrímeros.

5 Según una primera forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, los dendrímeros comprenden en su periferia grupos funcionales que permiten el acoplamiento directo mediante un enlace covalente de estos últimos sobre la superficie no funcionalizada previamente de dicho soporte sólido. Es el caso, en particular, en el que los dendrímeros contienen en su periferia grupos funcionales tiol y en donde el soporte sólido comprende una superficie de oro.

10 Según una segunda forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, y cuando la superficie del soporte sólido utilizada no contenga grupos funcionales compatibles con las funciones periféricas del dendrímero utilizado, entonces es necesario funcionalizar previamente dicha superficie mediante grupos funcionales capaces de permitir la fijación covalente de dichos dendrímeros.

15 Según esta segunda variante, el procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

a) la funcionalización de al menos una superficie de un soporte sólido por funciones capaces de permitir la fijación de dendrímeros fosforados que poseen un núcleo central que contiene al menos dos grupos funcionales, dichos dendrímeros que comprenden en su periferia varias funciones capaces de permitir su fijación sobre dicha superficie funcionalizada de esta manera, y la fijación o la síntesis *in situ* de moléculas de interés;

20 b) la eventual preactivación de los grupos funcionales del soporte para obtener una superficie funcionalizada activada;

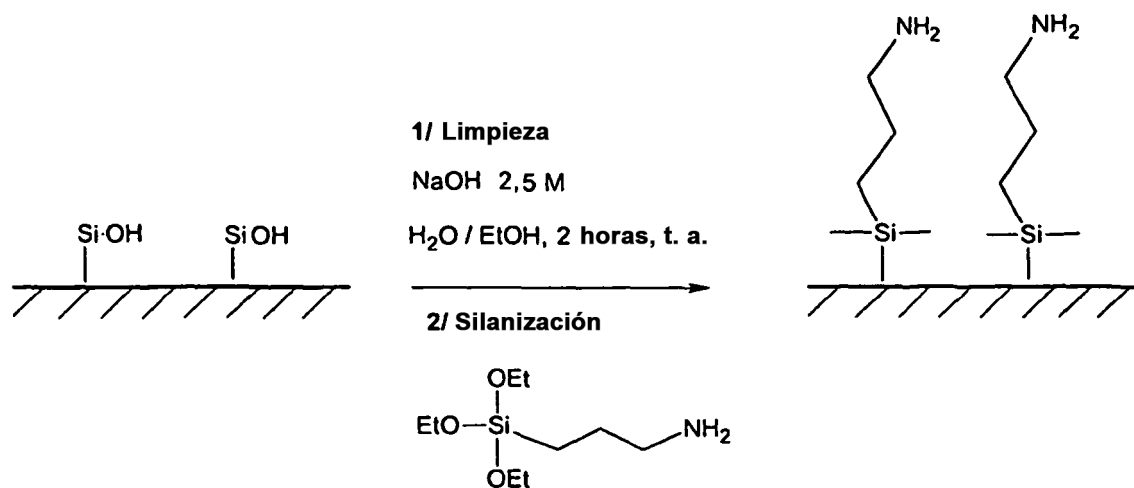
25 c) la formación de un enlace covalente entre dichos dendrímeros y dicha superficie funcionalizada y eventualmente activada, para obtener un soporte sólido funcionalizado de manera covalente por dichos dendrímeros.

30 Según una forma de realización ventajosa de la invención, la etapa a) de funcionalización de la superficie del soporte sólido se lleva a cabo mediante silanización por medio de un reactivo de silanización que comprende funciones capaces de fijar los dendrímeros, tales como por ejemplo grupos amina.

35 A modo de ejemplo, la etapa de silanización se puede llevar a cabo utilizando un reactivo de silanización aminado tal como por ejemplo 3-aminopropiltriétoxilsilano (Sigma), aminopropildietoximetilsilano o incluso el aminopropilmonoetoxidimetilsilano.

40 Según una forma de realización preferida de la invención, la etapa de fijación covalente directa de los dendrímeros (en el caso de la primera variante) y la etapa a) de silanización de la superficie del soporte (en el caso de la segunda variante) están precedidas de una etapa de limpieza de la superficie del soporte en medio básico, ácido y/u oxidante.

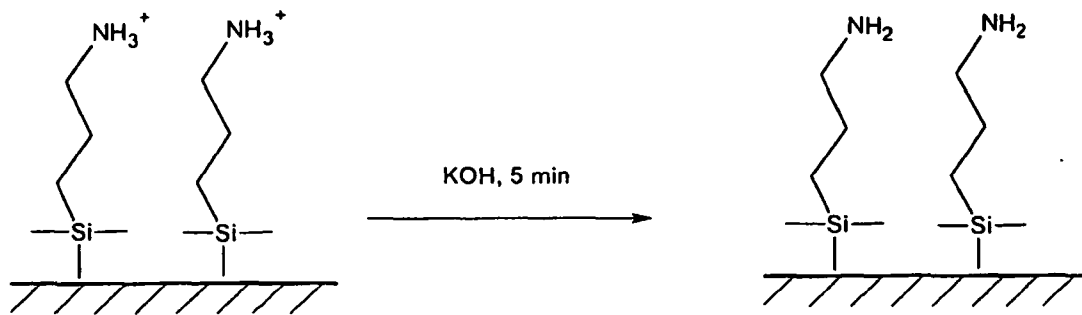
En el caso particular de la segunda variante del procedimiento de acuerdo con la invención, estas dos etapas de lavado y silanización se resumen en el esquema de síntesis B a continuación:

ESQUEMA B

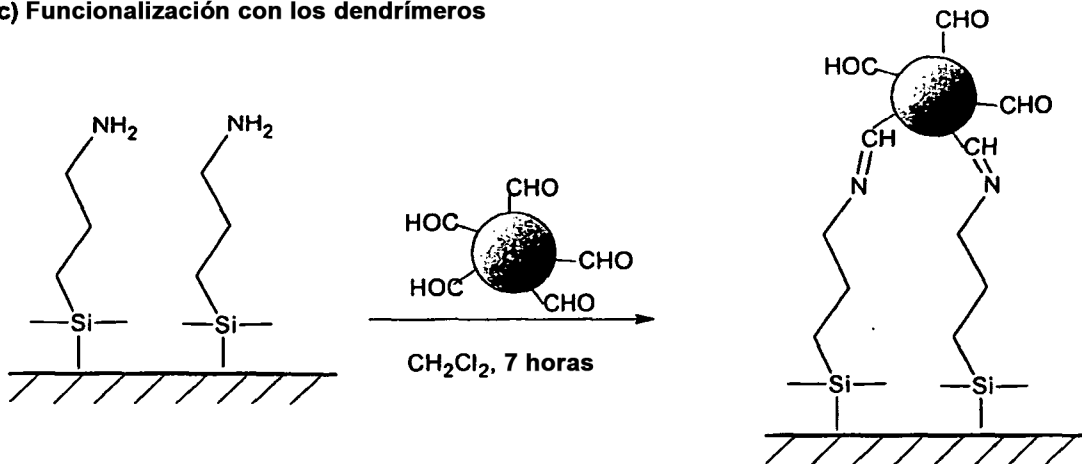
La etapa b) opcional de preactivación sirve para reactivar, si es necesario, las funciones amina fijadas sobre el soporte después de la etapa de silanización. En efecto, el almacenamiento, incluso corto, de los soportes sólidos aminados puede suponer una protonación de los grupos -NH₂. Por tanto, a menudo es preferible reactivar las funciones amina en medio básico antes de hacer reaccionar los dendrímeros. En este caso particular, las etapas b) y c) están representadas en el Esquema C siguiente:

ESQUEMA C

b) Preactivación



c) Funcionalización con los dendrímeros



Según una forma de realización ventajosa del procedimiento de acuerdo con la invención, esta etapa de preactivación se lleva a cabo mediante el tratamiento del soporte con la ayuda de un agente basicante tal como por ejemplo hidróxido de potasio, durante un periodo comprendido entre 2 y 20 minutos aproximadamente.

Según una forma de realización ventajosa de la invención, la etapa de fijación covalente de los dendrímeros, consiste en:

10 - preparar una disolución de dichos dendrímeros en un disolvente, tal como por ejemplo diclorometano o tetrahidrofurano,

- poner en contacto dicha disolución de dendrímeros con la superficie eventualmente funcionalizada y eventualmente activada, durante un periodo comprendido entre 10 minutos y 24 horas aproximadamente, preferentemente entre 2 y

15 8 horas aproximadamente, a una temperatura comprendida preferentemente entre 4 y 50 °C aproximadamente.

Después de la etapa de fijación covalente de los dendrímeros, los soportes de acuerdo con la invención (dendriportas) preferentemente se enjuagan y se secan.

20 La etapa de enjuague se lleva a cabo preferentemente con la ayuda de un disolvente orgánico tal como diclorometano o tetrahidrofurano, y a continuación con la ayuda de un alcohol inferior tal como etanol.

El secado de los dendrímeros se puede llevar a cabo, por ejemplo, con aire comprimido, en una corriente de nitrógeno o incluso por centrifugación.

- 5 Los dendriportas obtenidos de esta forma se pueden almacenar y/o se pueden utilizar directamente para la inmovilización y/o la síntesis *in situ* de moléculas, en particular de moléculas biológicas.

Los dendriportas de acuerdo con la invención se pueden almacenar, en particular, durante al menos dos meses, sin que se produzca ninguna alteración de las funciones encontradas en la periferia de los dendrímeros.

10

La presente invención por tanto también tiene por objeto la utilización de un soporte sólido funcionalizado por los dendrímeros fosforados de acuerdo con la invención (dendriportas), como soporte para la inmovilización y/o la síntesis *in situ* de moléculas de interés tales como por ejemplo moléculas de ácidos nucleicos (oligonucleótidos, productos de la PCR, etc.), lípidos, proteínas (péptidos, enzimas, anticuerpos, etc.) o sus pares moleculares.

15

La invención también tiene por objeto un biochip caracterizado porque está constituido de un soporte sólido que comprende al menos una superficie funcionalizada por dendrímeros fosforados sobre los que se fijan de manera covalente moléculas de interés tales como ácidos nucleicos (oligonucleótidos, productos de la PCR, etc.), lípidos, proteínas (péptidos, enzimas, anticuerpos, etc.) o sus pares moleculares.

20

De acuerdo con la invención, dichos biochips se denominan "dendrichips".

Estos dendrichips presentan un ruido de fondo muy bajo y una intensidad de señal elevada, por ejemplo tras la hibridación de ácidos nucleicos con dianas fluorescentes. Estos "dendrichips" tienen la ventaja de ser reutilizables sin pérdida significativa de la señal, pero sobre todo sin aumentar el ruido de fondo. Esto supone una reducción significativa de los costes del análisis y permite obtener datos estadísticos fiables para un análisis dado. Estos dendrichips además se obtienen en pocos pasos de síntesis (de tres a cinco); que se desarrollan en condiciones operativas no limitantes, de manera controlada y reproducible.

25

- 30 Además, debido a la propia estructura de los dendrímeros, estos dendrichips presentan la ventaja de poseer, por una parte, múltiples puntos de anclaje sobre la superficie y por otra, múltiples puntos de anclaje sobre las moléculas de interés, todo ello que garantiza una excelente estabilidad del conjunto soporte-dendrímeros-moléculas de interés.

Otro objeto de la invención es un procedimiento de preparación de un dendrichip tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque consiste en la puesta en contacto de un soporte sólido que tiene al menos una superficie funcionalizada por dendrímeros fosforados que comprenden en su periferia funciones capaces de permitir la fijación covalente de moléculas de interés con una disolución tampón que contiene moléculas de interés que se han funcionalizado previamente con, o que ya contienen, uno o varios grupos funcionales capaces de formar un enlace covalente con dichas funciones periféricas de los dendrímeros.

40

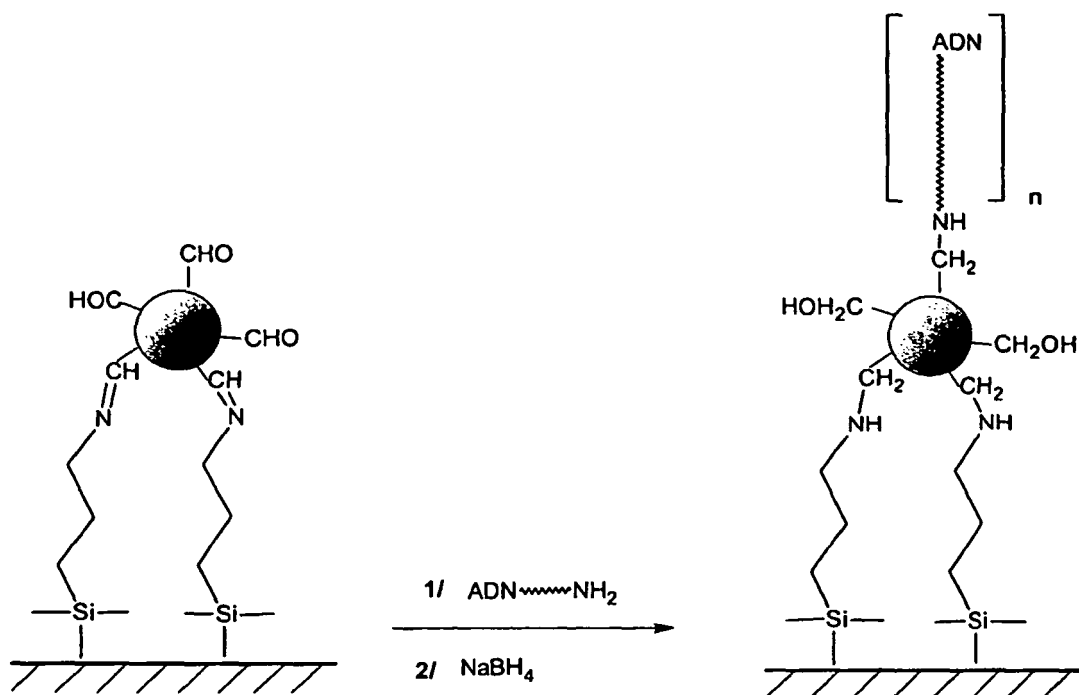
Según una primera forma de realización de este procedimiento, y cuando las funciones periféricas de los dendrímeros utilizadas sean funciones aldehído, entonces las moléculas de interés preferentemente se han funcionalizado previamente con, o ya contienen, una o varias funciones amina, o se han funcionalizado previamente con una o varias funciones oxiamina (-ONH₂) o hidrazina (-NH-NH₂), y de forma más general con cualquier grupo funcional capaz de reaccionar con una función aldehído.

45

Además, en este caso, las moléculas de interés (ácidos nucleicos aminados, oligonucleótidos de longitud variable o productos de la PCR), se depositan sobre los "dendriportas" utilizando, por ejemplo, el tampón fosfato 0,3 M a pH 9. Cuando las moléculas de interés hayan sido previamente funcionalizadas con, o ya contengan, una o varias funciones amina, a esta etapa le sigue una reducción de las funciones imina presentes entre los ácidos nucleicos y los dendrímeros, por una parte, y entre los dendrímeros y el soporte, por otra (véase Esquema D a continuación). Esta etapa de reducción permite asimismo reducir las funciones aldehído residuales a alcoholes, que hace que la superficie se vuelva hidrófila. Además, los alcoholes no pueden generar reacciones no específicas con las dianas marcadas (ausencia de aumento del ruido de fondo).

50

55

ESQUEMA D

Según una segunda forma de realización de este procedimiento, y cuando las funciones periféricas de los dendrímeros utilizados sean funciones tiol, entonces las moléculas de interés preferentemente se habrán
 5 funcionalizado previamente con, o ya contendrán, una o varias funciones tiol (para permitir la creación de un puente disulfuro), o se habrán funcionalizado previamente con una o varias funciones yodoacetamida (-NHCO-CH₂-I), y de forma más general con cualquier grupo funcional capaz de reaccionar con una función tiol. Este tipo de funcionalización está particularmente adaptada a los soportes sólidos que tienen una superficie de tipo silicio o de oro. En el caso de que se establezca un enlace disulfuro entre el soporte y las sondas nucleicas, la superficie se puede regenerar mediante una etapa de reducción. La superficie tiol obtenida de esta forma se puede "recargar" de
 10 nuevo con otras secuencias de oligonucleótidos o con proteínas.

Según una tercera forma de realización de este procedimiento, y cuando las funciones periféricas de los dendrímeros utilizados sean funciones amina, entonces las moléculas de interés preferentemente se habrán
 15 funcionalizado previamente con, o ya contendrán, una o varias funciones aldehído, α -oxoaldehído, -COOR, -NCS, o -NHS, y de forma más general con cualquier grupo funcional capaz de reaccionar con una función amina.

Según una cuarta forma de realización de este procedimiento, y cuando las funciones periféricas de los dendrímeros utilizados sean funciones epóxido, entonces las moléculas de interés preferentemente se habrán funcionalizado
 20 previamente con, o ya contendrán, una o varias funciones amina, y de forma más general con cualquier grupo funcional capaz de reaccionar con una función epóxido.

Según el procedimiento de preparación de los dendrichips de acuerdo con la invención, la reacción de fijación covalente de las moléculas de interés sobre los dendriportos se lleva a cabo preferentemente a una temperatura
 25 comprendida entre 4 y 50 °C aproximadamente, durante un periodo comprendido entre 2 y 24 horas aproximadamente.

Los dendrichips obtenidos de esta forma se pueden utilizar de manera ventajosa como herramienta diagnóstica

miniaturizada, en función de la naturaleza de las moléculas de interés fijadas, tales como chips de ADN, por ejemplo para llevar a cabo reacciones de hibridación con dianas complementarias, como chips de péptidos, de polipéptidos o de proteínas por ejemplo, para la detección de respuestas de tipo antígeno-anticuerpo mediante la utilización de reactivos marcados, fluorescentes, radiactivos, o marcados químicamente.

5

Los dendrichips de acuerdo con la presente invención asimismo se pueden utilizar como chips de polipéptidos para la selección de moléculas y el análisis de las relaciones entre moléculas, de tipo ligando-receptor.

Estos dendrichips presentan la ventaja particular de ser reutilizables.

10

Además de las disposiciones precedentes, la invención comprende además otras disposiciones que surgirán de la descripción siguiente, que se refiere a dos ejemplos de preparación de dendriportas en vidrio funcionalizados con dendrímeros de diferentes generaciones y con aldehído en los extremos, a un ejemplo de preparación de biochips a partir de estos dendriportas, a un ejemplo de inmovilización de moléculas de ácidos nucleicos sobre biochips de acuerdo con la invención, a un ejemplo de síntesis de un dendrímero de generación 3 y con tiol en los extremos y a un ejemplo de preparación de dendriportas con dendrímeros de generación 3 y con tiol en los extremos, así como las Figuras 1 a 7 en las que:

15

- La Figura 1 muestra una representación esquemática de un dendrímero de generación 4, obtenido a partir de un núcleo trifuncional;

20

- La Figura 2 muestra la fórmula de un dendrímero fosforado de generación 4 con funciones periféricas terminales aldehído;

- La Figura 3 muestra la fórmula de un dendrímero fosforado de generación 3 con funciones periféricas terminales tiol;

25

- La Figura 4 es un esquema de síntesis A que representa las dos primeras etapas del procedimiento para la preparación de un dendrímero con el corazón fosforado;

30

- La Figura 5 muestra las imágenes de las señales de fluorescencia obtenidas después de 10 ciclos de hibridación/deshibridación sobre dendrichips de acuerdo con la invención;

- La Figura 6 muestra las imágenes de las señales de fluorescencia obtenidas después de 10 ciclos de hibridación/deshibridación sobre dendrichips de acuerdo con la invención en función de la concentración de oligonucleótidos diana;

35

- La Figura 7 muestra las imágenes de las señales de fluorescencia obtenidas en un estudio sobre la búsqueda de mutaciones en oligonucleótidos.

40

EJEMPLO 1: PREPARACIÓN DE UN SOPORTE SÓLIDO CONSTITUIDO POR UN PORTAOBJETOS DE VIDRIO FUNCIONALIZADO POR LOS DENDRÍMEROS FOSFORADOS CON ALDEHÍDO EN LOS EXTREMOS ("DENDRIPORTAS")

45 1) Primera etapa: Preactivación de los portaobjetos de vidrio

Portaobjetos de vidrio comerciales, funcionalizados con grupos amina (CORNING®-CMT-GAPS Amino-Silane Coated Slides) se sumergieron en una disolución acuosa de hidróxido de potasio (8 %) durante 20 minutos en agitación con la ayuda de un agitador orbital que gira a una velocidad de 30 rpm (Heidolph Instruments Polymax 50 1040). A continuación los portaobjetos se enjuagaron abundantemente con agua milliQ (3 lavados de 5 minutos cada uno) y por último se secaron en una corriente de nitrógeno.

2) Segunda etapa: Preparación de "dendriportas"

55 En este ejemplo, se utilizaron tres tipos de dendrímeros diferentes:

- Dendrímeros G3: Dendrímeros de tercera generación que tienen un núcleo de fósforo de fórmula (IIIa) como se ha descrito anteriormente y que tienen en su periferia 48 funciones aldehído;

- Dendrímeros G4: Dendrímeros de cuarta generación que tienen un núcleo de fósforo de fórmula (IIIa) como se ha descrito anteriormente y que tienen en su periferia 96 funciones aldehído;

- Dendrímeros G5: Dendrímeros de quinta generación que tienen un núcleo de fósforo de fórmula (IIIa) como se ha descrito anteriormente y que tienen en su periferia 192 funciones aldehído;

Los portaobjetos preactivados se sumergieron en una disolución de dendrímeros G3, G4 o G5 al 0,1 % en diclorometano. Se agitó durante 6 horas a temperatura ambiente (30 rpm). A continuación se lavaron con diclorometano (2 lavados de 5 minutos cada uno) y después con etanol (1 lavado de 5 minutos) y por último se secaron en una corriente de nitrógeno.

Así se obtienen portaobjetos de vidrio cuya superficie está funcionalizada por los dendrímeros G3, G4 o G5 (dendriportas: DL-A-G3; DL-A-G4 y DL-A-G5). Estos dendriportas se pueden utilizar para la inmovilización de moléculas de interés.

EJEMPLO 2: PREPARACIÓN DE UN SOPORTE SÓLIDO CONSTITUIDO POR UN PORTAOBJETOS DE VIDRIO FUNCIONALIZADO POR LOS DENDRÍMEROS FOSFORADOS CON ALDEHÍDO EN LOS EXTREMOS ("DENDRIPORTAS")

1) Primera etapa: Limpieza de los portaobjetos de vidrio

Se colocaron portaobjetos de vidrio comerciales (Gold-Seal-Microslides®, Polylabo) en una rejilla y ésta se sumergió en una disolución alcalina de lavado formada por 50 g de hidróxido sódico en 200 ml de agua milliQ y 300 ml de etanol al 95 % . Los portaobjetos se agitaron durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se lavaron abundantemente con agua milliQ (3 lavados de 5 minutos cada uno) y se secaron en una corriente de nitrógeno o por centrifugación.

2) Segunda etapa: Silanización

Los portaobjetos de vidrio limpiados de esta forma se sumergieron en una disolución de 3-aminopropiltrióxido de silano (GAPS, Aldrich) al 10 % en etanol al 95 % y se pusieron en agitación durante toda la noche a temperatura ambiente. A continuación se dejaron durante 30 minutos al aire, se enjuagaron con etanol al 95 % (2 lavados de 5 minutos cada uno) y después con agua milliQ (1 lavado de 5 minutos y 1 lavado de 2 minutos con sonicación) antes de secarse en una corriente de nitrógeno. A continuación se pusieron durante 3 horas a una temperatura de 120 °C.

3) Tercera etapa: Preactivación

Los portaobjetos silanizados se pusieron en una disolución acuosa de hidróxido potásico (8 %) durante 5 minutos, con agitación a temperatura ambiente. A continuación se enjuagaron con agua milliQ (3 lavados de 5 minutos cada uno) antes de secarse en una corriente de nitrógeno.

4) Cuarta etapa: Funcionalización con los dendrímeros

Los portaobjetos preactivados se pusieron en una disolución de dendrímeros G4 como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1 (0,1 % en diclorometano) durante 7 horas con agitación a temperatura ambiente. A continuación se lavaron con diclorometano (2 lavados de 5 minutos cada uno) y con etanol (1 lavado de 5 minutos) antes de secarse en una corriente de nitrógeno.

Se obtiene así un soporte sólido funcionalizado por los dendrímeros fosforados con funciones aldehído (dendriporta: DL-B-G4). Este dendriporta se puede utilizar para la inmovilización de moléculas de interés.

EJEMPLO 3: PREPARACIÓN DE BIOCHIPS A PARTIR DE DENDRIPORTAS PREPARADOS EN LOS EJEMPLOS 1 Y 2: "DENDRICHIPS"

1) Depósito de oligonucleótidos

a) Oligonucleótidos utilizados

Oligonucleótido ON1: 35-mero de amina que tiene la secuencia SEQ ID N°1 siguiente: 5'-GTG-ATC-GTT-GTA-TCG-

AGG-AAT-ACT-CCG-ATA-CCATT-3', modificada en posición 5' por un grupo $-\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-$.

Este oligonucleótido, que está modificado en su extremo 5' por un brazo de 6 carbonos terminados por una función amina (Eurogentec, Bélgica), permite la reacción con las funciones aldehído presentes en el dendriporta como se ha descrito anteriormente en los Ejemplos 1 y 2.

Oligonucleótido ON2: 35-mero de oxiamina que tiene la secuencia SEQ ID N° 1 descrita anteriormente y modificado en 5' con un $-\text{H}_2\text{NO}-(\text{CH}_2)_6-$.

10 La secuencia SEQ ID NO: 1 de los oligonucleótidos ON1 y la ON2 corresponde a una parte del gen GPH1 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Los depósitos de oligonucleótidos se realizaron utilizando el robot Eurogridder® (Eurogentec, Seraing, Bélgica) y están separados por 200 μm .

15

b) Depósitos sobre los dendriportas

Se utilizan los dendriportas DL-A-G3, DL-A-G4, DL-A-G5 y DL-B-G4 preparados anteriormente en los Ejemplos 1 y 2.

20

Sobre los dendriportas DL-A-G3, DL-A-G4, DL-A-G5 preparados en el Ejemplo 1, se depositan los oligonucleótidos ON1 en tampón fosfato 0,3 M (pH 9) que contiene cantidades crecientes de dimetilsulfóxido (DMSO) (0, 10, 20, 30, 40 o 50 % , v/v), utilizando el robot Eurogridder® (Eurogentec, Bélgica). Los volúmenes depositados son de 2 nl y las concentraciones varían entre 1 μM y 10 μM (1, 2, 5 y 10 μM). Después realizar el depósito, los portaobjetos se dejaron durante toda la noche a temperatura ambiente. A continuación se sumergieron en una disolución acuosa de borohidruro sódico (NaBH_4 , 3,5 mg/ml) (etapa de reducción de las funciones imina) y se agitaron durante 3 horas a temperatura ambiente. Se enjuagaron con agua milliQ (3 lavados de 5 minutos cada uno) y se secaron en una corriente de nitrógeno o por centrifugación. Se obtienen los dendrichips (DP) siguientes DP1-A-G3; DP1-A-G4 y DP1-A-G5.

30

Sobre los dendriportas DL-B-G4 preparados en el Ejemplo 2 se depositan los oligonucleótidos ON1 en tampón fosfato 0,3 M (pH 9) utilizando el robot de deposición. Los volúmenes depositados son de 2 nl y la concentración es de 10 μM . Después realizar el depósito, los portaobjetos se dejaron durante toda la noche a temperatura ambiente. A continuación se sumergieron en una disolución acuosa de borohidruro sódico (NaBH_4 , 3,5 mg/ml) (etapa de reducción de las funciones imina) y se agitaron durante 3 horas a temperatura ambiente. Se enjuagaron con agua milliQ (3 lavados de 5 minutos cada uno) y se secaron en una corriente de nitrógeno o por centrifugación. Se obtienen los dendrichips DP1-B-G4.

35

Los oligonucleótidos ON2 también fueron depositados sobre los dendriportas preparados en el Ejemplo 2.

40

Para ello, los oligonucleótidos ON2 se depositaron en agua milliQ. Los volúmenes depositados son de 0,2 μl y las concentraciones varían entre 1 μM y 10 μM (1 μM , 5 μM y 10 μM). Los oligonucleótidos ON1 se depositaron sobre el mismo portaobjetos en el tampón fosfato 0,3 M bajo las mismas condiciones de volumen y concentración. Los portaobjetos se dejaron durante 7 horas a temperatura ambiente. A continuación se sumergieron en una solución acuosa de borohidruro sódico (NaBH_4 , 3,5 mg/ml) y se agitaron durante 3 horas a temperatura ambiente. Se enjuagaron con agua milliQ (1 lavado durante 5 minutos), con una solución acuosa de dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,2 % (1 lavado durante 5 minutos) y de nuevo con agua (5 minutos). Por último se secaron en una corriente de nitrógeno. Se obtienen los dendrichips DP2-B-G4.

45

50 Así se obtienen diferentes tipos de biochips correspondientes a los dendriportas sobre los que se han fijado los oligonucleótidos ("dendrichips"). Estos dendrichips se pueden utilizar en reacciones de hibridación.

EJEMPLO 4: HIBRIDACIÓN

55 **1) Materiales y procedimientos**

1-a) Tampones utilizados

A continuación se exponen los diferentes tampones utilizados en las etapas de hibridación; se prepararon a partir de

las diferentes disoluciones comerciales siguientes:

- 20x SSC (citrato sódico 0,3 M, NaCl 3 M, pH 7 aproximadamente, Sigma)
- 20x SSPE (tampón fosfato 0,2 M, NaCl 2,98 M, EDTA 0,02 M, pH 7,4 aproximadamente, Sigma),
- 5 - Disolución de Denhardt 50 x (Sigma),
- ADN de salmón (9,9 mg/ml, Sigma).

Tampón de hibridación: SSPE 2x, SDS al 0,1 % [ON diana] = 200 nM, pH 7,4; y como oligonucleótidos diana:

- 10 ON-Cy5: 5' - Cy5 - AAT GGT ATC GGA GTA - 3'
ON-Cy3: 5' - Cy3 - AAT GGT ATC GGA GTA - 3'

La secuencia de estos oligonucleótidos diana corresponde a la secuencia SEQ ID NO: 2.

- 15 Tampón de lavado: SSPE 2x, SDS al 0,1 % , pH 7,4:
Tampón de deshibridación: Na₂HPO₄ 2,5 mM, SDS al 0,1 % .

1-b) Etapa de hibridación

- 20 Las hibridaciones se llevan a cabo ajustando el volumen necesario de dianas marcadas (de 2 µl a 40 µl según la superficie a cubrir) sobre la zona de depósito de cada dendrichip.

Se prepararon y se utilizaron diferentes concentraciones de dianas a detectar, 200 nM, 100 nM, 20 nM, 10 nM, 2 nM y 1 nM durante las etapas de hibridación con el fin de evaluar la sensibilidad de detección de los dendrichips de acuerdo con la invención.

30 A continuación la gota se recubre con un cubreobjetos y el dispositivo se coloca en una cámara de hibridación («CMT-Hybridization Chamber» comercializado por la empresa Coming). Los portaobjetos se dejan durante 15 minutos a temperatura ambiente y a continuación se lavan utilizando el tampón de lavado durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último se secan en una corriente de nitrógeno.

1-c) Lectura de los portaobjetos

35 La lectura de los portaobjetos se lleva a cabo utilizando un escáner Axon equipado con dos láseres que permiten la lectura a una longitud de onda de excitación de 532 nm y de 635 nm (Cy3 y Cy5, respectivamente). La fluorescencia emitida por los fluorocromos después de la excitación se detecta en un tubo fotomultiplicador (PMT). Habitualmente, el PMT tiene un valor comprendido entre 450 y 600. El resultado se obtiene en forma de un archivo de imagen con una resolución de 10 µm/píxel. El análisis informático de los archivos de imágenes y la cuantificación de la intensidad de fluorescencia se realizaron utilizando el *software* Genepix®.

40

1-d) Etapa de deshibridación

Cuando se completa la lectura de los portaobjetos, se procede con la deshibridación de los portaobjetos.

45 Para ello, los dendrichips se colocan en un tubo Falcon de 50 ml relleno con el tampón de deshibridación descrito anteriormente. Todo esto se pone durante 5 minutos a 95 °C. A continuación el portaobjetos se enjuaga tres veces con agua milliQ y se seca por centrifugación o en corriente de nitrógeno. El portaobjetos se escanea con el fin de asegurarse de que la deshibridación ha tenido lugar correctamente. Así está listo para utilizarse de nuevo en otra hibridación.

50

1-e) Estudio de mutaciones

Depósitos

55 El oligonucleótido ON1 como se ha descrito anteriormente (10 µM, 2 nl) se deposita sobre los dendriportos DL-A-G3, DL-A-G4 o DL-A-G5 preparados según el Ejemplo 1. Los depósitos se llevan a cabo en cuatro puntos diferentes dentro del mismo dendriporta. Las hibridaciones se realizan utilizando cuatro oligonucleótidos de 15 bases funcionalizados en sus extremos 5' por un fluoróforo Cy5 y que contiene en medio de la secuencia las cuatro posibles bases T, A, G o C (Eurogentec). Las secuencias de estos oligonucleótidos son las siguientes:

- "15-mero Cy5 T" (complementario): 5'-Cy5-AAT GGT ATC GGA GTA3' (SEQ ID N° 2)
- "15-mero Cy5 A": 5' - Cy5-AAT GGT AAC GGA GTA 3' (SEQ ID N° 3)
- "15-mero Cy5 G": 5' - Cy5-AAT GGT AGC GGA GTA 3' (SEQ ID N° 4)
- 5 - "15-mero Cy5 C": 5' - Cy5-AAT GGT ACC GGA GTA 3' (SEQ ID N° 5)

Hibridaciones

- Tampón de hibridación: SSC 6x, SDS al 0,2 % , disolución de Denhardt 5x, 10 µg de ADN de salmón, pH 7, que contiene el oligonucleótido 15-mero Cy5 T, A, G, o C a una concentración de 200 nM.

- Tampón de lavado: Lavado 1: SSC 2x, SDS al 0,1 % , pH 7. Lavado 2: SSC 0,2x.

Se depositan 5 µl de cada una de las disoluciones de hibridación sobre cada zona de depósito constituida por el oligonucleótido ON1. Cada zona se recubre con un cubreobjetos (sin que los cubreobjetos se toquen). El portaobjetos se coloca en una cámara de hibridación (Corning) que se sumerge en un baño a 42 °C durante una hora. Los portaobjetos se lavan con el tampón de lavado 1 durante 5 minutos a temperatura ambiente o a 50 °C y a continuación con el tampón de lavado 2 durante 5 minutos a 50 °C. Por último se secan en una corriente de nitrógeno.

2) Resultados

2-a) Reutilización de los dendrichips y sensibilidad de la detección en función de la naturaleza del tampón de depósito, de la concentración en ON y de la naturaleza de los dendrímeros

Sobre los dendrichips DP1-A-G3, DP1-A-G4 y DP1-A-G5, y para cada concentración testada de dianas a detectar, las etapas de hibridación, de lectura de los portaobjetos, y de deshibridación se llevaron a cabo 7 veces con el ON 15-mero Cy5 (200 nM), a fin de demostrar el carácter reutilizable de los dendrichips de acuerdo con la invención, así como la sensibilidad y la reproducibilidad de los resultados obtenidos. Los valores de intensidad de fluorescencia se resumen en las Tablas II a IV a continuación; el PMT tiene un valor de 600 y los depósitos se llevaron a cabo por triplicado para cada tampón:

Tabla II

DP1-A-G3: Después de la primera hibridación					
Concentración de ON1: 5 µM			Concentración de ON1: 10 µM		
Concentración de DMSO (%)	Diámetro de los depósitos (µm)	Señal/Ruido	Concentración de DMSO (%)	Diámetro de los depósitos (µm)	Señal/Ruido
0	90	65000/200	0	100	65000/200
10	110	65000/200	10	110	65000/200
20	110	65000/200	20	140	65000/200
30	140	65000/200	30	140	65000/200
40	140	65000/200	40	150	65000/200
50	160	42000/200	50	160	50000/200

Después de siete hibridaciones					
Concentración de ON1: 5 µM			Concentración de ON1: 10 µM		
Concentración de DMSO (%)	Diámetro de los depósitos (µm)	Señal/Ruido	Concentración de DMSO (%)	Diámetro de los depósitos (µm)	Señal/Ruido
0	90	65000/300	0	100	65000/350
10	110	65000/300	10	110	65000/350
20	110	65000/300	20	140	65000/350
30	140	65000/300	30	140	65000/350
40	140	65000/300	40	150	65000/350
50	160	50000/300	50	160	50000/350

Tabla III

DP1-A-G4: Después de la primera hibridación

Concentración de ON1: 5 µM			Concentración de ON1: 10 µM		
Concentración de DMSO (%)	Diámetro de los depósitos (µm)	Señal/Ruido	Concentración de DMSO (%)	Diámetro de los depósitos (µm)	Señal/Ruido
0	90	65000/300	0	100	65000/300
10	120	65000/300	10	110	65000/300
20	120	53000/300	20	110	65000/300
30	140	65000/300	30	170	65000/300
40	160	65000/300	40	190	65000/300
50	170	53000/200	50	180	65000/200

Después de siete hibridaciones

Concentración de ON1: 5 µM			Concentración de ON1: 10 µM		
Concentración de DMSO (%)	Diámetro de los depósitos (µm)	Señal/Ruido	Concentración de DMSO (%)	Diámetro de los depósitos (µm)	Señal/Ruido
0	90	65000/300	0	100	65000/350
10	110	65000/300	10	110	65000/350
20	110	56000/300	20	140	45000/350
30	140	52000/300	30	140	65000/350
40	140	65000/300	40	150	65000/350
50	160	48000/300	50	160	51000/350

Tabla IV

DP1-A-G5: Después de la primera hibridación

Concentración de ON1: 5 µM			Concentración de ON1: 10 µM		
Concentración de DMSO (%)	Diámetro de los depósitos (µm)	Señal/Ruido	Concentración de DMSO (%)	Diámetro de los depósitos (µm)	Señal/Ruido
0	100	65000/200	0	90	65000/200
10	110	65000/200	10	100	65000/200
20	130	65000/200	20	120	45000/200
30	160	38000/200	30	170	65000/200
40	170	65000/200	40	180	65000/200
50	180	47000/200	50	170	48000/200

Después de siete hibridaciones

Concentración de ON1: 5 µM			Concentración de ON1: 10 µM		
Concentración de DMSO (%)	Diámetro de los depósitos (µm)	Señal/Ruido	Concentración de DMSO (%)	Diámetro de los depósitos (µm)	Señal/Ruido
0	90	65000/500	0	100	65000/500
10	110	65000/500	10	110	65000/500
20	110	56000/500	20	140	45000/500
30	140	52000/500	30	140	65000/500
40	140	60000/500	40	150	62000/500
50	160	42000/500	50	160	60000/500

Estos resultados muestran que las relaciones señal/ruido son prácticamente constantes entre la primera y la séptima hibridación. Estos resultados demuestran que los dendrichips de acuerdo con la invención se pueden reutilizar sin que se produzca una disminución en la relación señal/ruido.

Además, estos resultados muestran que las relaciones señal/ruido obtenidas con las diferentes concentraciones de

tampón son muy próximas y por tanto indicativas de la reproducibilidad y la sensibilidad de las mediciones.

De la misma manera, se llevaron a cabo 10 ciclos de hibridación y deshibridación sobre los dendrichips DP1-B-G4 como se han preparado anteriormente en el Ejemplo 2.

5

Los resultados obtenidos, en forma de imágenes de las señales de fluorescencia, están representados en la Figura 5.

Estos resultados muestran que la relación señal/ruido después de la primera hibridación (65.000/200) es la misma tras la décima hibridación y por tanto indicativa del carácter reutilizable de los dendrichips de acuerdo con la presente invención.

10

2-b) Reutilización de los dendrichips y sensibilidad de la detección en función de la concentración de ON diana y de la naturaleza de los dendrímeros

15 El oligonucleótido ON1 se depositó en cinco puntos diferentes sobre los dendrichips DP1-A-G3, DP1-A-G4 y DP1-A-G5 como se han preparado en el Ejemplo 3 anterior.

Las disoluciones de hibridación siguientes que contienen concentraciones decrecientes de ON-Cy5 diana se utilizaron con el fin de evaluar la sensibilidad de los dendrichips de acuerdo con la invención:

20

- SSPE 2x, SDS al 0,1 % , [ON-Cy5] = 200 nM

- SSPE 2x, SDS al 0,1 % , [ON-Cy5] = 100 nM

- SSPE 2x, SDS al 0,1 % , [ON-Cy5] = 20 nM

- SSPE 2x, SDS al 0,1 % , [ON-Cy5] = 10 nM

25

- SSPE 2x, SDS al 0,1 % , [ON-Cy5] = 2 nM

- SSPE 2x, SDS al 0,1 % , [ON-Cy5] = 1 nM

A continuación se depositaron 2 µl de cada una de las disoluciones de hibridación sobre los dendrichips y se dejaron incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los dendrichips se lavaron con el tampón SSPE 2x, SDS al 0,1 % durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de secarse en corriente de nitrógeno o por centrifugación. Así se realizaron 10 ciclos de hibridación/deshibridación.

30

Las imágenes obtenidas están representadas en la Figura 6.

35 Estos resultados muestran que para una concentración en ON-Cy5 diana que varía entre 200 nM y 10 nM, e incluso después de 10 ciclos de hibridación/deshibridación, se obtiene una relación de señal/ruido constante de 65.000/200. Para una concentración en ON-Cy5 diana inferior, es decir de 2 nM o de 1 nM, se obtienen unas señales de señal/ruido de 50.000/200 y de 40.000/200, respectivamente, indicativas de la muy buena sensibilidad de detección de los dendrichips de acuerdo con la invención y de la reproducibilidad de los resultados que se pueden obtener cuando se reutilizan varias veces.

40

2-b) Detección de mutaciones

Los resultados obtenidos están representados en la Figura 7 anexa en la que se puede ver que solamente el oligonucleótido perfectamente complementario da lugar a la obtención de una señal de fluorescencia, mientras que no se obtiene ninguna señal de fluorescencia con los oligonucleótidos que contienen una mutación en medio de la cadena. Los dendrichips de acuerdo con la invención permiten por tanto detectar mutaciones.

45

EJEMPLO 5: SÍNTESIS DE UN DENDRÍMERO DE GENERACIÓN 3 CON LOS EXTREMOS TIOL

50

1) Primera etapa: Síntesis de un dendrímero de generación 3 con los extremos NH(Me)

A una disolución de dendrímero de generación 3 (corazón de N₃P₃, Launay y col., citado anteriormente) con los extremos aldehído (650 mg) en diclorometano se le añadió, mediante una jeringuilla, un ligero exceso de monometil hidracina (224 µl). Después de cuatro horas de agitación a temperatura ambiente, el medio de reacción se concentró a presión reducida y el dendrímero de generación 3 con extremos NH(Me) se precipitó utilizando dietiléter (3 × 15 ml). El polvo blanco resultante se lavó varias veces con este disolvente antes de secarse a presión reducida.

55

2) Segunda etapa: Síntesis de un dendrímero de generación 3 con los extremos tiol

El dendrímico de generación 3 con los extremos NH(Me) obtenido en la etapa 1) anterior (1 g) se disolvió en 2,5 ml de γ -tiobutirrolactona en un tubo de Schlenk. La mezcla se mantuvo en agitación durante 3 días a 50 – 55 °C bajo presión autógena. Después de enfriar, la mezcla de reacción en bruto se lava con 3 x 50 ml de dietiléter para dar un dendrímico de generación 3 que contiene 48 funciones tiol en su periferia.

Este dendrímico, que está representado en la Figura 3 anexa, se puede utilizar para la fabricación de dendriportas de acuerdo con la invención. Nótese: este procedimiento es general y permite obtener dendrímeros con extremos tiol de todas las generaciones (Schmid y col., J. Chem., 2000, 6, 1693).

10

EJEMPLO 6: PREPARACIÓN DE "DENDRIPORTAS" FUNCIONALIZADOS POR DENDRÍMEROS CON EXTREMOS TIOL

Portaobjetos de SiO₂, SiO₂ silanizados o SiN_x sobre los que se fijan láminas de oro (10 μ m² a 500 μ m²) se lavaron previamente con etanol al 95 % y se secaron con aire comprimido. A continuación se sumergieron durante periodos variables (15 minutos, 1 hora, 2 horas, y 12 horas) en una disolución constituida por 100 μ g de dendrímeros de generación 3 con los extremos tiol como se han preparado anteriormente en el Ejemplo 5 disueltos en 5 ml de THF destilado. Los portaobjetos se lavaron con THF destilado (\pm ultrasonido) y a continuación con etanol antes de secarse con aire comprimido. El resultado del injerto (no representado) se observa mediante un microscopio de fuerza atómica (AFM). En el caso de las láminas de oro sobre el soporte de SiO₂, el injerto de los dendrímeros G3 terminados en tiol no es selectivo (fijación a la vez sobre el oro y sobre el soporte de SiO₂). En el caso de soportes de SiO₂ silanizados o de SiN_x, el injerto de los dendrímeros G3 terminados en tiol se lleva a cabo de manera selectiva sobre las láminas de oro. Se obtienen así portaobjetos de silicio/oro cuya superficie está funcionalizada por los dendrímeros terminados en tiol de generación 3 (dendriportas: DL-C-G3'). Estos dendriportas se pueden utilizar para la inmovilización de moléculas de interés.

LISTADO DE SECUENCIAS

< 110 > CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE LA
 30 INVESTIGACIÓN AGRÍCOLA
 < 120 > SOPORTES SÓLIDOS FUNCIONALIZADOS POR DENDRÍMEROS FOSFORADOS, PROCEDIMIENTOS
 PARA SU PREPARACIÓN Y UTILIZACIÓN DE LOS MISMOS
 < 130 > SGimF644/73PCT
 < 140 > PCT /FR2003/001231
 35 < 141 > 2003-04-17
 < 150 > FR02/05049
 < 151 > 2002-04-23
 40 < 160 > 5
 < 170 > PatentIn versión 3.1
 < 210 > 1
 < 211 > 35
 < 212 > ADN
 45 < 213 > *Saccharomyces cerevisiae*
 < 400 > 1
 gtgatcgttg tatcgaggaa tactccgata ccatt 35
 < 210 > 2
 < 211 > 15
 50 < 212 > ADN
 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 < 223 > Oligonucleótido
 < 400 > 2
 55 aatggtatcg gagta 15
 < 210 > 3
 < 211 > 15
 < 212 > ADN
 < 213 > Secuencia artificial

< 220 >
< 223 > Oligonucleótido
< 400 > 3
aatggaacg gagta 15
5 < 210 > 4
< 211 > 15
< 212 > ADN
< 213 > Secuencia artificial
< 220 >
10 < 223 > Oligonucleótido
< 400 > 4
aatggtagcg gagta 15
< 210 > 5
< 211 > 15
15 < 212 > ADN
< 213 > Secuencia artificial
< 220 >
< 223 > Oligonucleótido
< 400 > 5
20 aatggtaccg gagta 15

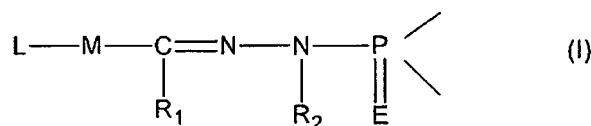
REIVINDICACIONES

1. Un soporte sólido caracterizado porque comprende al menos una superficie funcionalizada de manera covalente por dendrímeros fosforados que poseen un núcleo central que contiene al menos dos grupos funcionales y
5 que incluyen en su periferia varios grupos funcionales capaces de permitir la fijación de dichos dendrímeros sobre dicha superficie, así como la fijación o síntesis *in situ* de moléculas de interés, dichos dendrímeros que tienen un tamaño comprendido entre 1 y 20 nm, y caracterizado porque los dendrímeros se seleccionan entre aquellos constituidos por:

10 - una capa central en forma de núcleo central P₀, que opcionalmente contiene fósforo, que comprende de 2 a 12 grupos funcionalizados,

- n capas intermedias, iguales o diferentes, cada una de dichas capas intermedias que está compuesta de unidades P₁ que se corresponden con la fórmula (I) siguiente:

15



en la que:

20 L es un átomo de oxígeno, fósforo, azufre o nitrógeno,

M representa uno de los grupos siguientes:

25 un grupo aromático no sustituido, di-, tri- o tetra-sustituido con grupos alquilo, grupos alcoxi, grupos insaturados del tipo olefínico C₁-C₁₂, azo, acetilénico, todos ellos que pueden o pueden no incorporar átomos de fósforo, oxígeno, nitrógeno, azufre o halógenos, o

un grupo alquilo o alcoxi que tiene varios sustituyentes como se define para M cuando es un grupo aromático,

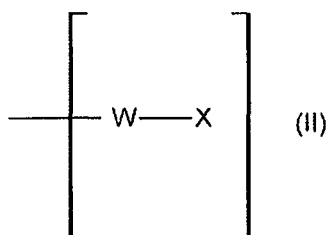
30 R₁ y R₂, que pueden ser iguales o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o uno de los siguientes grupos: alquilo, alcoxi, arilo, que contienen o no contienen átomos de fósforo, oxígeno, azufre, nitrógeno o halógeno, siendo R₂ lo más habitualmente diferente de R₁,

n es un número entero comprendido entre 1 y 11,

35

E es un átomo de oxígeno, azufre o nitrógeno, en donde dicho átomo de nitrógeno puede estar unido a un grupo alquilo, alcoxi o arilo, todos ellos que pueden o pueden no incorporar átomos de fósforo, oxígeno, nitrógeno, azufre o halógenos,

40 - una capa externa compuesta de unidades P₂, iguales o diferentes, y que se corresponden con la siguiente fórmula II:



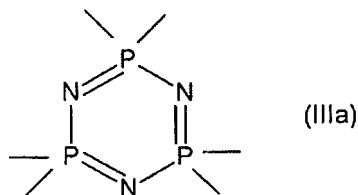
45 en la que:

W es uno de los siguientes grupos: alquilo, alcoxi, arilo, todos estos grupos que contienen o no contienen átomos de fósforo, oxígeno, nitrógeno, azufre o halógenos,

X representa un grupo aldehído, tiol, amina, epóxido, ácido carboxílico, alcohol o fenol.

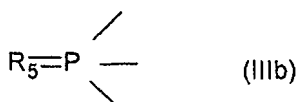
5

2. Soporte sólido de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el núcleo central P₀ se selecciona del grupo constituido por el grupo con la fórmula general IIIa:



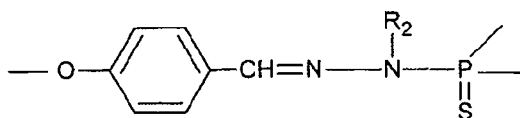
10

y el grupo con la fórmula general IIIb:



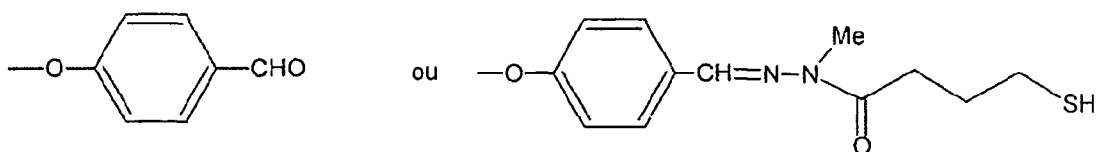
15 en la que R₅ representa un átomo de azufre, oxígeno o nitrógeno.

3. Soporte sólido de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque los dendrímeros se seleccionan entre los compuestos en los que el grupo con la fórmula (I) representa el grupo siguiente:



20

en la que R₂ representa un radical alquilo C₁-C₁₂ y más en particular un radical metilo; y el grupo con la fórmula (II) representa uno de los dos grupos siguientes:



25

y en las que el número de generaciones varía preferentemente entre 1 y 6.

4. Soporte sólido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque se selecciona entre los soportes que contienen al menos una superficie silicificada tales como portaobjetos, perlas y capilares de vidrio, soportes de silicio o de plástico y soportes metálicos.

30

5. Procedimiento de preparación de un soporte sólido como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque comprende una etapa de formación de un enlace covalente entre los dendrímeros fosforados que poseen un núcleo central que contiene al menos dos grupos funcionales, dichos dendrímeros que comprenden en su periferia varias funciones capaces de permitir su fijación sobre dicha superficie y la fijación o la síntesis *in situ* de moléculas de interés, y la superficie funcionalizada o no de un soporte sólido para obtener un soporte sólido funcionalizado de forma covalente mediante dichos dendrímeros.

35

6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque los dendrímeros comprenden en su periferia grupos funcionales que permiten el acoplamiento directo mediante un enlace covalente de estos últimos sobre la superficie no funcionalizada previamente de dicho soporte sólido.
- 5 7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque los dendrímeros comprenden en su periferia grupos funcionales tiol y porque el soporte sólido comprende una superficie de oro.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la superficie del soporte sólido utilizado no comprende funciones compatibles con las funciones periféricas del dendrímero utilizado, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:
- 10 a) la funcionalización de al menos una superficie de un soporte sólido por funciones capaces de permitir la fijación de dendrímeros fosforados que poseen un núcleo central que contiene al menos dos grupos funcionales, dichos dendrímeros que comprenden en su periferia varias funciones capaces de permitir su fijación sobre dicha superficie funcionalizada de esta manera, y la fijación o la síntesis *in situ* de moléculas de interés;
- 15 b) la eventual preactivación de los grupos funcionales del soporte para obtener una superficie funcionalizada activada,
- 20 c) la formación de un enlace covalente entre dichos dendrímeros y dicha superficie funcionalizada y eventualmente activada, para obtener un soporte sólido funcionalizado de manera covalente mediante dichos dendrímeros.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque la etapa a) de funcionalización de la superficie del soporte sólido se lleva a cabo por silanización mediante un reactivo de silanización que comprende funciones capaces de fijar los dendrímeros, tales como por ejemplo grupos funcionales amina.
- 25 10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, caracterizado porque el reactivo de silanización está aminado.
- 30 11. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizado porque la etapa de preactivación se lleva a cabo por tratamiento del soporte con ayuda de un agente basicificante, durante un periodo comprendido entre los 2 y los 20 minutos.
- 35 12. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, caracterizado porque la etapa de fijación covalente de los dendrímeros, consiste en:
- preparar una disolución de dichos dendrímeros en un disolvente,
- 40 - poner en contacto dicha disolución de dendrímeros con la superficie eventualmente funcionalizada y eventualmente activada, durante un periodo comprendido entre 10 minutos y 24 horas.
13. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, caracterizado porque tras la finalización de la etapa de fijación covalente de los dendrímeros, los soportes se enjuagan y se secan.
- 45 14. Utilización de un soporte sólido funcionalizado para los dendrímeros fosforados como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, como soporte para la inmovilización y/o la síntesis *in situ* de moléculas de interés.
- 50 15. Utilización de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizado porque las moléculas de interés son moléculas de ácidos nucleicos, lípidos, proteínas o sus pares moleculares.
16. Biochip o dendrichip caracterizado porque está constituido de un soporte sólido que comprende al menos una superficie funcionalizada por los dendrímeros fosforados y como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, sobre los que se fijan, de manera covalente, moléculas de interés.
- 55 17. Biochip de acuerdo con la reivindicación 16, caracterizado porque es reutilizable.
18. Procedimiento de preparación de un biochip como se ha definido en la reivindicación 16 ó 17,

- caracterizado porque consiste en la puesta en contacto de un soporte sólido que tiene al menos una superficie funcionalizada por dendrímeros fosforados y que comprenden en su periferia funciones capaces de permitir la fijación covalente de moléculas de interés con una disolución tampón que contiene las moléculas de interés que se han funcionalizado previamente con, o que ya contienen, uno o varios grupos funcionales capaces de formar un enlace covalente con dichas funciones periféricas de los dendrímeros.
- 5
19. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado porque las funciones periféricas de los dendrímeros utilizados son funciones aldehído, y porque las moléculas de interés se han funcionalizado previamente con, o ya contienen, una o varias funciones amina, o se han funcionalizado previamente con una o varias funciones oxiamina (-ONH₂) o hidrazina (-NH-NH₂).
- 10
20. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, caracterizado porque las moléculas de interés han sido previamente funcionalizadas con, o ya contienen, una o varias funciones amina, y que a la etapa de fijación de las moléculas de interés le sigue una etapa de reducción de las funciones imina.
- 15
21. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado porque las funciones periféricas de los dendrímeros utilizados son funciones tiol, y porque las moléculas de interés se han funcionalizado previamente con, o ya contienen, una o varias funciones tiol o se han funcionalizado previamente con una o varias funciones yodoacetamida (-NHCO-CH₂-I).
- 20
22. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado porque las funciones periféricas de los dendrímeros utilizados son funciones amina, y porque las moléculas de interés se han funcionalizado previamente con, o ya contienen, una o varias funciones aldehído, α -oxoaldehído, -COOR, -NCS, o -NHS.
- 25
23. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado porque las funciones periféricas de los dendrímeros utilizados son funciones epóxido, y porque las moléculas de interés se han funcionalizado previamente con, o ya contienen, una o varias funciones amina.
- 30
24. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23, caracterizado porque la reacción de fijación covalente de las moléculas de interés sobre los dendriportos se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 4 y 50 °C, durante un periodo comprendido entre 2 y 24 horas.
25. Utilización de un dendrichip de acuerdo con la reivindicación 16 o 17 como chips de ADN, de péptidos, de polipéptidos o de proteínas.

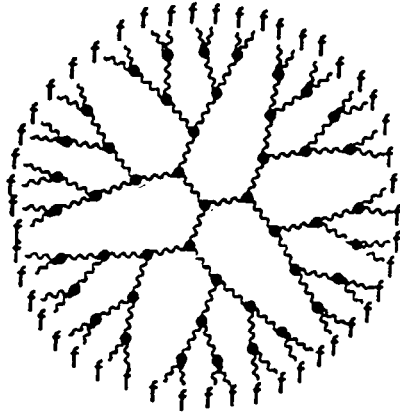


Figura 1

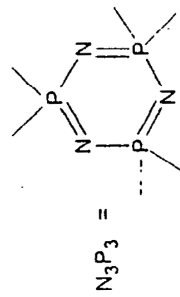
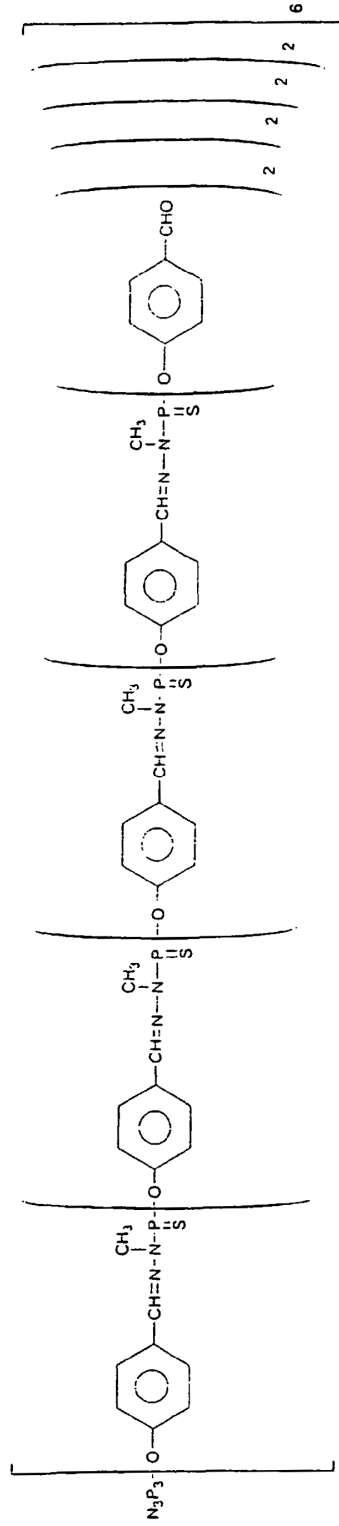


FIGURA 2

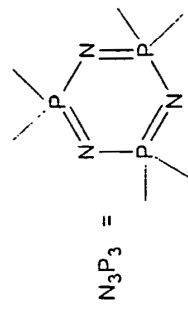
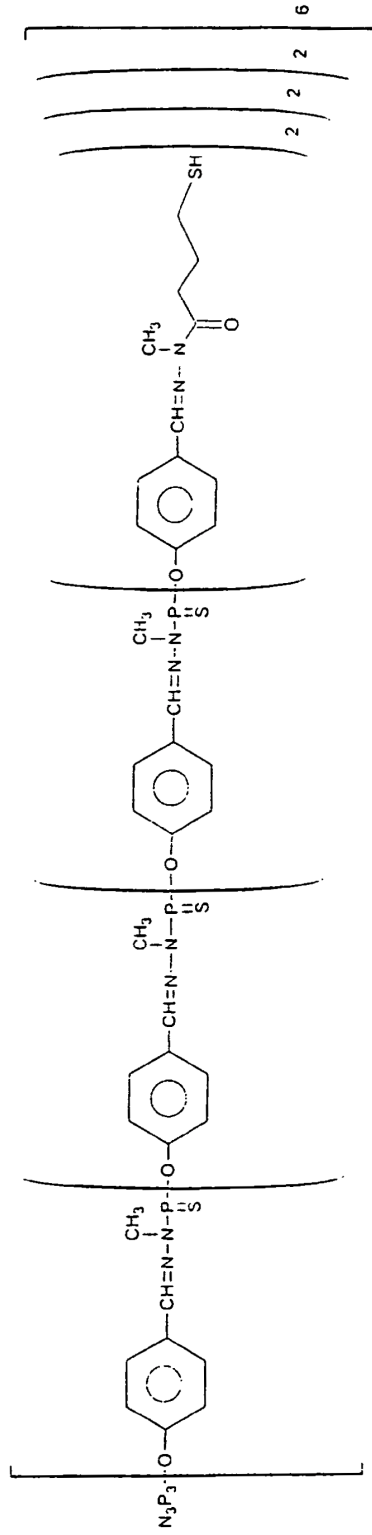


FIGURA 3

ESQUEMA DE SÍNTESIS A

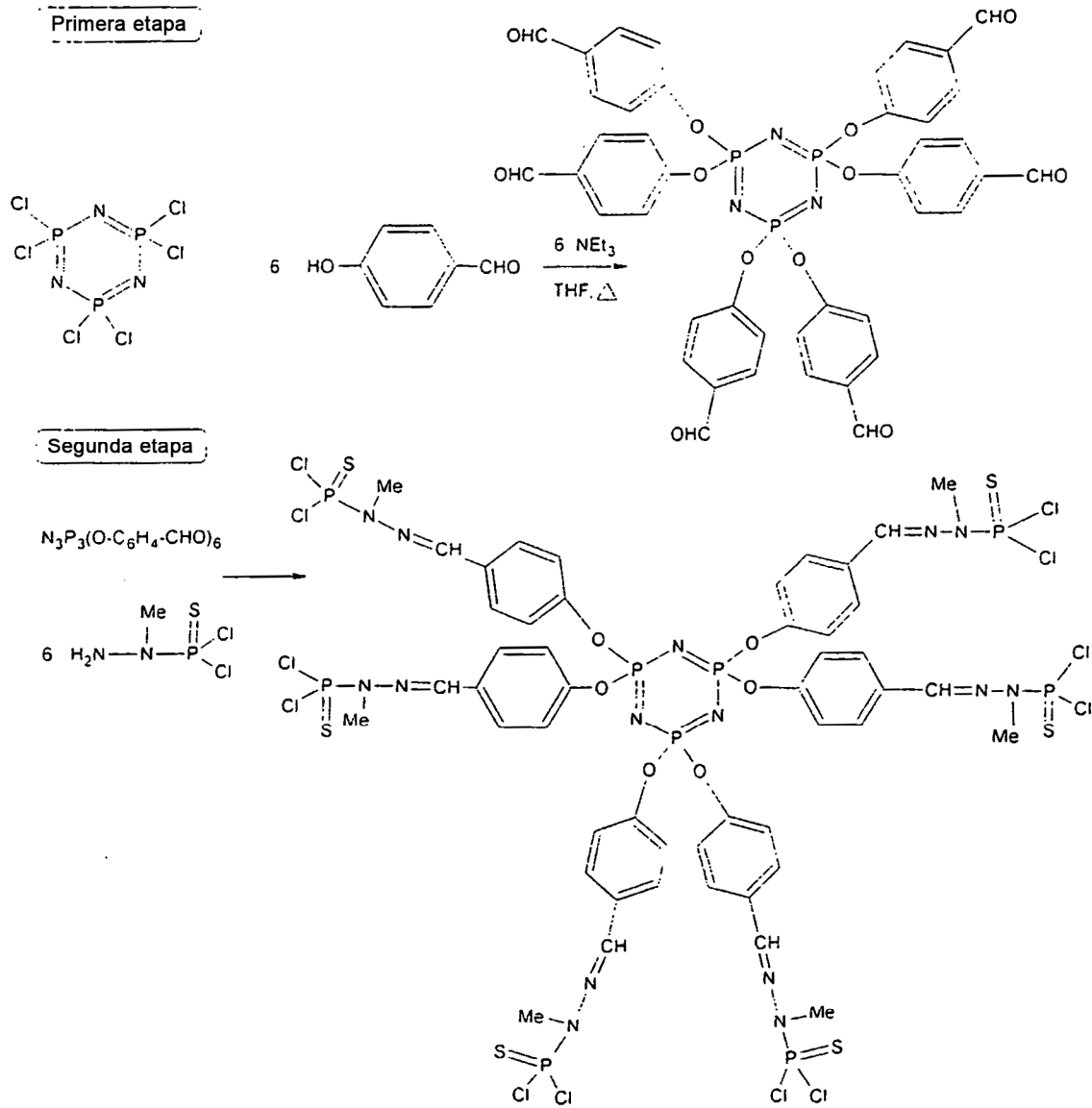


FIGURA 4

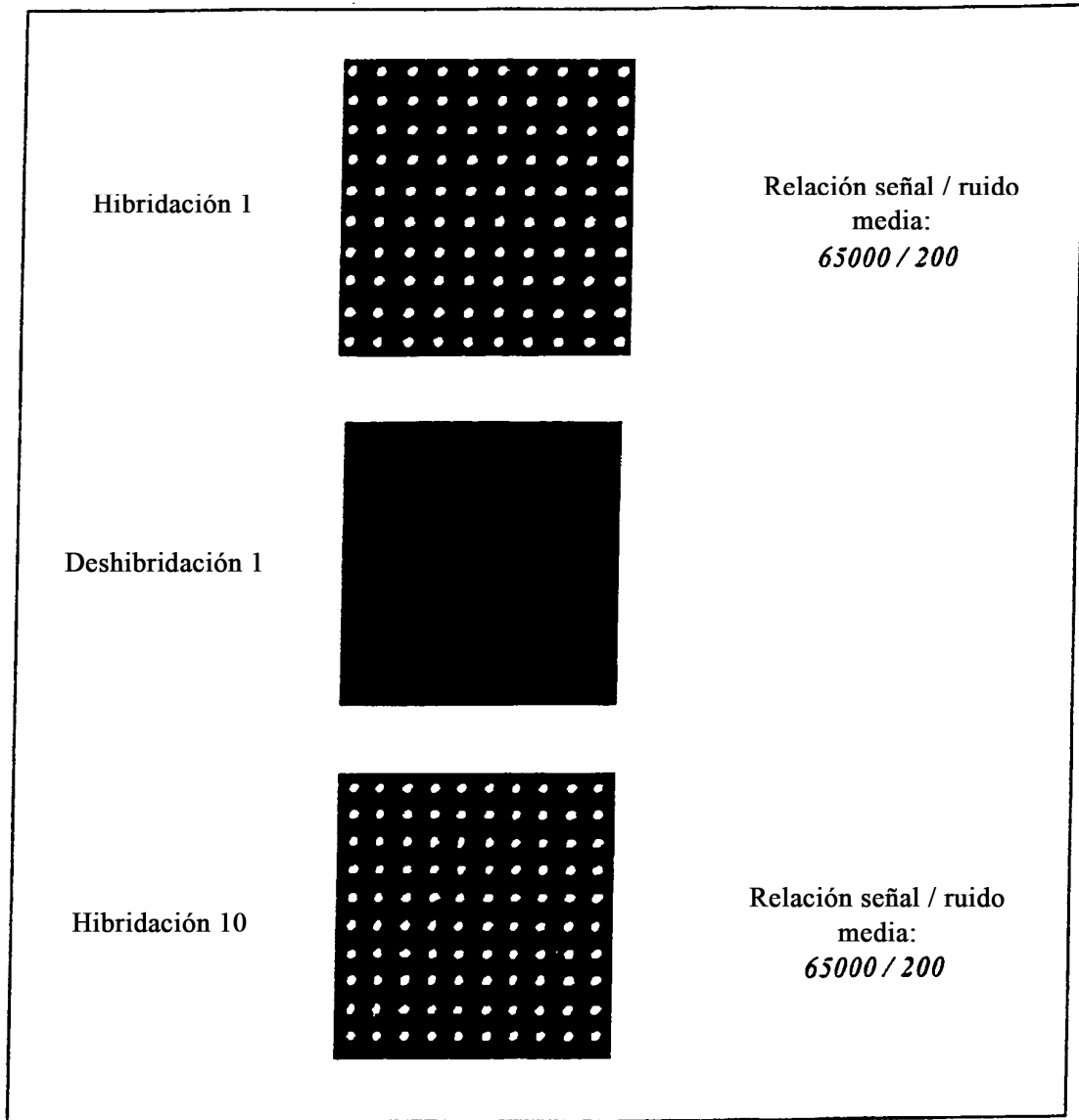


Figura 5

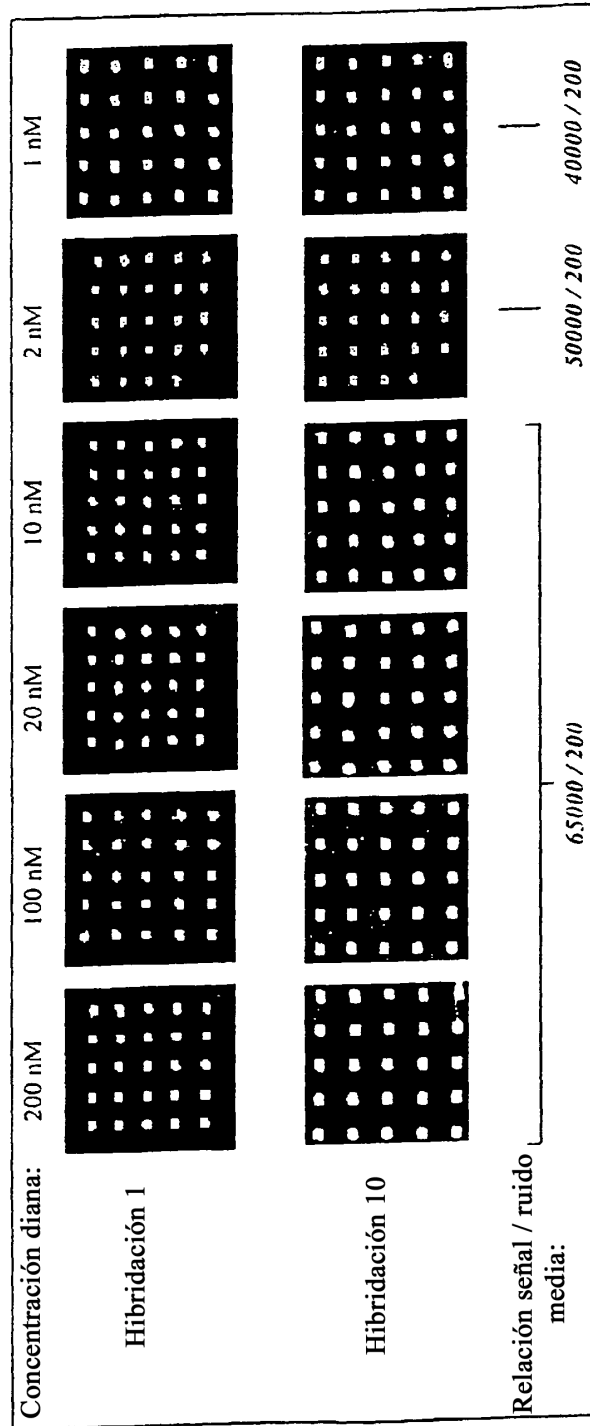


Figura 6

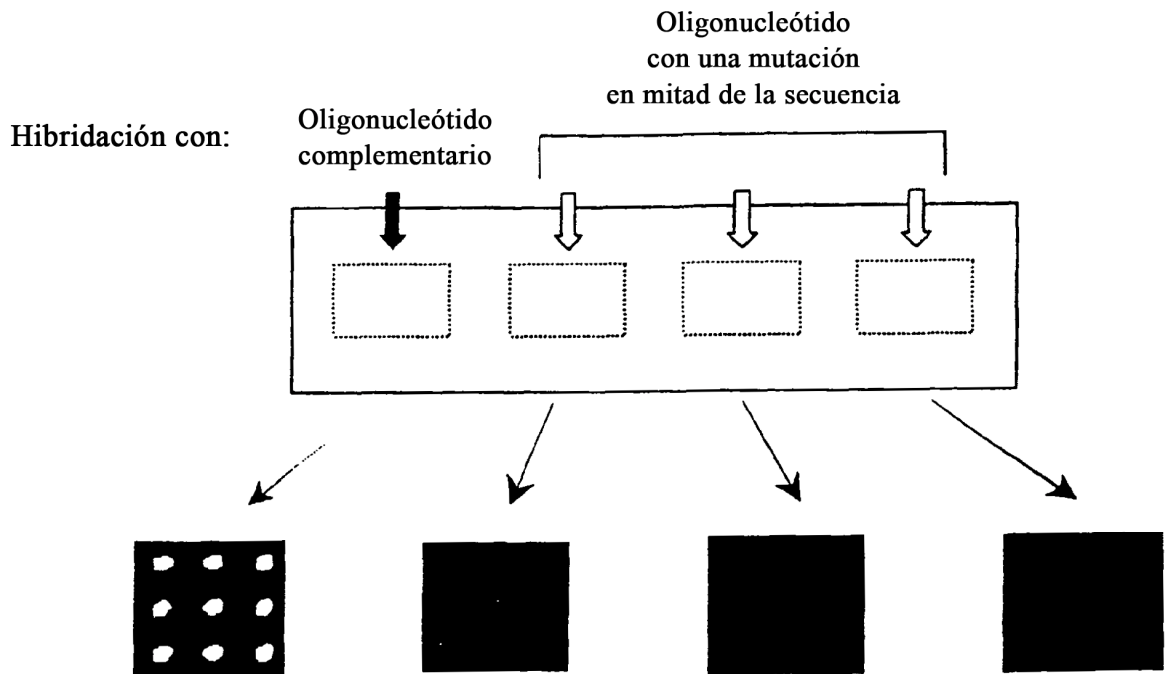


Figura 7