

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 529**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

**B01J 19/00** (2006.01)

**C07H 21/00** (2006.01)

**C09D 133/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2014 PCT/US2014/044356**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15002813**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2014 E 14741745 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 3017065**

54 Título: **Funcionalización de superficie sin catalizador e injerto de polímero**

30 Prioridad:

**01.07.2013 US 201361841647 P**  
**27.03.2014 US 201461971381 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.02.2019**

73 Titular/es:

**ILLUMINA, INC. (100.0%)**  
**5200 Illumina Way**  
**San Diego, CA 92122, US**

72 Inventor/es:

**BERTI, LORENZO;**  
**BROWN, ANDREW A. y**  
**GEORGE, WAYNE N.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 700 529 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

Funcionalización de superficie sin catalizador e injerto de polímero

### Campo técnico

5 En general, la presente descripción se refiere a los campos de química, biología y ciencia de los materiales. Más específicamente, la presente solicitud se refiere a un sustrato con una superficie que comprende un silano o derivado de silano que comprende opcionalmente restos insaturados sustituidos seleccionados de cicloalquenos, cicloalquinos, heterocicloalquenos o heterocicloalquinos unidos covalentemente al mismo para conjugación directa con una molécula de interés funcionalizada. También se describen los métodos para preparar una superficie  
10 funcionalizada y el uso en la secuenciación de ADN y otras aplicaciones de diagnóstico.

### Antecedentes

Los sustratos recubiertos de polímero o hidrogel se utilizan en muchas aplicaciones tecnológicas. Por ejemplo, los dispositivos médicos implantables se pueden recubrir con polímeros biológicamente inertes. En otro ejemplo, se utilizan sustratos recubiertos de polímero o hidrogel para la preparación y/o análisis de moléculas biológicas. Los análisis moleculares, tales como ciertos métodos de secuenciación de ácidos nucleicos, se basan en la unión de  
15 cadenas de ácido nucleico a una superficie recubierta de hidrogel o polímero de un sustrato. Las secuencias de las cadenas de ácido nucleico unidas se pueden determinar después por una serie de métodos diferentes que son bien conocidos en la técnica.

En ciertos métodos de secuenciación por síntesis, una o más superficies de una celda de flujo están recubiertas con un polímero o un hidrogel al que se unen los ácidos nucleicos. Las celdas de flujo comerciales actuales utilizan un recubrimiento de gel no unido. El uso de una química de conjugación apropiada puede proporcionar celdas de flujo comercialmente viables que tienen recubrimientos de gel unidos covalentemente. Es importante tener en cuenta consideraciones tales como el coste de materiales, la compatibilidad con procesos de fabricación, la estabilidad durante almacenamiento y envío, y la capacidad de soportar las etapas de procesamiento químico posterior, tales como amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos. Esta descripción proporciona una química particularmente útil que tiene varias ventajas como se hará evidente a partir de la descripción.  
20  
25

### Compendio

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. La presente solicitud describe formas de preparar la superficie de un sustrato para la conjugación directa de un hidrogel, polímero, molécula o biomolécula de interés apropiadamente funcionalizada. La superficie se trata con un silano o un derivado de silano que comprende una primera pluralidad de restos insaturados opcionalmente sustituidos seleccionados de cicloalquenos, cicloalquinos, heterocicloalquenos o heterocicloalquinos unidos covalentemente a los átomos de silicio del silano o derivado de silano, directamente o mediante conectores, tales como norborneno, cicloocteno, ciclooctino, bicicloalquinos o cualquier cicloalqueno, cicloalquino, heterocicloalquino, heterocicloalquino o derivados de ellos en los que esté presente una tensión anular, sin la necesidad de catalizador o agentes de reticulación adicionales. En realizaciones particulares, la implementación de la presente solicitud elimina el uso de compuestos de reticulación adicionales o catalizadores, y proporciona un método único de modificación de la superficie como punto de partida común para obtener una gran variedad de superficies funcionalizadas para uso en secuenciación de ADN y otras aplicaciones diagnósticas. Además, se encontró que las superficies de sustrato preparadas de acuerdo con la presente solicitud tienen mayor estabilidad, lo que dio como resultado una vida útil más larga y una menor contaminación de la superficie durante el almacenamiento. Por último, se encontró que las superficies de sustrato preparadas según la presente solicitud tienen una afinidad de superficie única en comparación con los silanos estándar (tales como APTES o APTMS), lo que dio como resultado una mejor humedecibilidad con componentes de base acuosa y recubrimientos más homogéneos.  
30  
35  
40

La presente solicitud también describe formas de injertar cebadores a la superficie de un sustrato. En una realización, la superficie se trata con silano o un derivado de silano que comprende una primera pluralidad de restos insaturados opcionalmente sustituidos seleccionados de cicloalquenos, cicloalquinos, heterocicloalquenos o heterocicloalquinos unidos covalentemente a los átomos de silicio del silano o derivado de silano directamente o mediante conectores, sin necesidad de catalizador o agentes de reticulación adicionales. Después, el cebador se preconjugua con una molécula funcional con grupos funcionales enlazados covalentemente a oligonucleótidos, donde los oligonucleótidos comprenden una segunda pluralidad de restos insaturados opcionalmente sustituidos seleccionados de cicloalquenos, cicloalquinos, heterocicloalquenos, o heterocicloalquinos, tales como ciclooctino o bicicloalquinos, p. ej. biciclo[6.1.0]non-4-ino. Finalmente, el cebador preconjugado se une covalentemente al silano o derivado de silano haciendo reaccionar los grupos funcionales de la molécula funcionalizada con los restos insaturados del silano o derivado de silano.  
45  
50  
55

Algunas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a un sustrato que comprende una primera superficie que comprende silano o un derivado de silano unido covalentemente a una molécula funcionalizada a través de una primera pluralidad de restos insaturados seleccionados de cicloalquenos, cicloalquinos, heterocicloalquenos, heterocicloalquinos, o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de ellos unidas

covalentemente a átomos de silicio del silano o derivado de silano. En algunas realizaciones, el sustrato comprende además oligonucleótidos unidos covalentemente a la molécula funcionalizada a través de una segunda pluralidad de restos insaturados seleccionados de cicloalquenos, cicloalquinos, heterocicloalquenos, heterocicloalquinos, o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de ellos.

Algunas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a un método para inmovilizar una molécula funcionalizada que comprende grupos funcionales a una primera superficie de un sustrato, comprendiendo el método: aplicar silano o un derivado de silano que comprende una primera pluralidad de restos insaturados seleccionados de cicloalquenos, cicloalquinos, heterocicloalquenos, heterocicloalquinos, o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de ellos unidas covalentemente al mismo sobre la primera superficie del sustrato; y unir covalentemente la molécula funcionalizada al silano o derivado de silano haciendo reaccionar los grupos funcionales de la molécula funcionalizada con la primera pluralidad de restos insaturados para formar una capa de recubrimiento. En algunas realizaciones, el método comprende además proporcionar oligonucleótidos que comprenden una segunda pluralidad de restos insaturados seleccionados de cicloalquenos, cicloalquinos, heterocicloalquenos, heterocicloalquinos, o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de ellos; y hacer reaccionar la segunda pluralidad de restos insaturados de los oligonucleótidos con los grupos funcionales de la molécula funcionalizada para formar un enlace covalente.

Algunas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a un método de injertar cebadores a una primera superficie de un sustrato, comprendiendo el método:

proporcionar un sustrato que comprende una capa de recubrimiento sobre una primera superficie del sustrato, en donde la capa de recubrimiento comprende silano o un derivado de silano unido covalentemente a una molécula funcionalizada a través de una primera pluralidad de restos insaturados del silano o derivado de silano, en donde la molécula funcionalizada comprende grupos funcionales, y en donde la primera pluralidad de restos insaturados se seleccionan de cicloalquenos, cicloalquinos, heterocicloalquenos, heterocicloalquinos, o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de ellos;

poner en contacto oligonucleótidos que comprenden una segunda pluralidad de restos insaturados seleccionados de cicloalquenos, cicloalquinos, heterocicloalquenos, heterocicloalquinos, o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de ellos con la capa de recubrimiento; y

hacer reaccionar la segunda pluralidad de restos insaturados de los oligonucleótidos con los grupos funcionales de la molécula funcionalizada para formar enlaces covalentes. En algunas realizaciones, la capa de recubrimiento se prepara aplicando silano o un derivado de silano que comprende la primera pluralidad de restos insaturados sobre la primera superficie del sustrato, y uniendo covalentemente la molécula funcionalizada al silano o derivado de silano haciendo reaccionar los grupos funcionales de la molécula funcionalizada con la primera pluralidad de restos insaturados.

Algunas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a un método para injertar cebadores en una primera superficie de un sustrato, comprendiendo el método:

proporcionar un sustrato que tiene una primera superficie que comprende silano o un derivado de silano, en donde dicho silano o un derivado de silano comprende una primera pluralidad de restos insaturados seleccionados de cicloalquenos, cicloalquinos, heterocicloalquenos, heterocicloalquinos, o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de ellos unidos covalentemente al mismo sobre la primera superficie del sustrato;

proporcionar cebadores preconjugados que comprenden oligonucleótidos enlazados covalentemente a una molécula funcionalizada, en donde dicha molécula funcionalizada comprende grupos funcionales, y

poner en contacto los cebadores preconjugados con el silano o derivado de silano tal que los cebadores preconjugados se unen covalentemente a la primera superficie del sustrato haciendo reaccionar los grupos funcionales de la molécula funcionalizada con la primera pluralidad de restos insaturados del silano o derivado de silano para formar un enlace covalente.

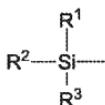
En algunas realizaciones, los cebadores preconjugados se preparan haciendo reaccionar los grupos funcionales de dicha molécula funcionalizada con una segunda pluralidad de restos insaturados de dichos oligonucleótidos para formar enlaces covalentes, en donde dicha segunda pluralidad de restos insaturados de dicho oligonucleótido se selecciona de cicloalquenos, cicloalquinos, heterocicloalquenos, heterocicloalquinos, o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de ellos.

En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, la primera pluralidad de restos insaturados se puede seleccionar de norborneno, heteronorbornenos, derivados de norborneno, trans-cicloocteno, derivados de trans-cicloocteno, ciclooctino, bicicloalquinos, o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de ellos. En algunas otras realizaciones, también se puede utilizar cualquier otro cicloalqueno, cicloalquinos, heterocicloalquenos o heterocicloalquinos que presenten tensión anular. En algunas realizaciones, la primera pluralidad de restos insaturados puede ser norbornenos opcionalmente sustituidos. En algunas realizaciones, la primera pluralidad de restos insaturados puede ser ciclooctino opcionalmente sustituido. En alguna realización, la primera pluralidad de

restos insaturados se puede seleccionar de bicliclononinos opcionalmente sustituidos. En algunas realizaciones, los bicliclononinos opcionalmente sustituidos comprenden biciclo[6.1.0]non-4-ino.

5 En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, la segunda pluralidad de restos insaturados de los oligonucleótidos se puede seleccionar de norborneno, heteronorbornenos, derivados de norborneno, trans-cicloocteno, derivados de trans-cicloocteno, ciclooctino, bicicloalquinos o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de ellos. En algunas otras realizaciones, también se puede utilizar cualquier otro cicloalqueno, cicloalquino, heterocicloalqueno o heterocicloalquino que presenten tensión anular. En algunas realizaciones, la segunda pluralidad de restos insaturados puede ser ciclooctino opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, 10 la segunda pluralidad de restos insaturados pueden ser bicliclononinos opcionalmente sustituidos. En algunas realizaciones adicionales, los bicliclononinos opcionalmente sustituidos comprenden biciclo[6.1.0]non-4-ino.

En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, el silano o derivado de silano puede comprender la siguiente fórmula:



15 donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se puede seleccionar cada uno independientemente de hidrógeno, halógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, ariloxi opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido o heteroariloxi opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, cada R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se puede seleccionar independientemente de alcoxi opcionalmente sustituido. En algunas de tales realizaciones, cada R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> es metoxi.

20 En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, el silano o derivado de silano se puede aplicar sobre la primera superficie por deposición química en fase de vapor. En algunas otras realizaciones, el silano o derivado de silano se puede aplicar sobre la primera superficie mediante el método de la compañía Yield Engineering Systems (YES).

25 En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, el silano o derivado de silano comprende además conectores unidos covalentemente entre átomos de silicio del silano o derivado de silano y la primera pluralidad de restos insaturados. En algunas de tales realizaciones, los conectores se seleccionan de alquilenos opcionalmente sustituidos, heteroalquilenos opcionalmente sustituidos, cicloalquilenos opcionalmente sustituidos, heterociclicilenos opcionalmente sustituidos, arilenos opcionalmente sustituidos, heteroarilenos opcionalmente sustituidos, polietilenglicoles opcionalmente sustituidos, conectores escindibles o combinaciones de ellos. En 30 algunas de tales realizaciones, los conectores son conectores de alquileo opcionalmente sustituidos. En algunas de tales realizaciones adicionales, los conectores son conectores de etileno opcionalmente sustituidos. En algunas otras realizaciones, los conectores son conectores escindibles. En algunas de tales realizaciones, los conectores escindibles se seleccionan de (-S-S-), ésteres, nitrobenzoceno, iminas, péptidos, oligonucleótidos o polinucleótidos.

35 En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, la molécula funcionalizada comprende un polímero, un hidrogel, un aminoácido, un péptido, un nucleósido, un nucleótido, un polinucleótido, una proteína o combinaciones de ellos. En algunas realizaciones, la molécula funcionalizada se selecciona de un polímero, un hidrogel, un aminoácido, un péptido, un nucleósido, un nucleótido, un polinucleótido, una proteína o combinaciones de ellos. En algunas realizaciones adicionales, la molécula funcionalizada es un hidrogel o un polímero que comprende uno o más grupos funcionales seleccionados de azido, amino opcionalmente sustituido, alqueno 40 opcionalmente sustituido, hidrazona opcionalmente sustituida, hidrazina opcionalmente sustituida, carboxilo, hidroxilo, tetrazol opcionalmente sustituido, tetrazina opcionalmente sustituida, óxido de nitrilo, nitrona o tiol. En algunas realizaciones, la molécula funcionalizada comprende un polímero o hidrogel que comprende una unidad recurrente de Fórmula (I) y una unidad recurrente de fórmula (II) como se describe a continuación en la Descripción Detallada de las Realizaciones. En algunas realizaciones, la molécula funcionalizada comprende un polímero que comprende 45 la Fórmula (III) o (III') como se describe a continuación en la Descripción Detallada de las Realizaciones.

En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, la molécula funcionalizada comprende grupos funcionales seleccionados de alqueno opcionalmente sustituido, azido, amino opcionalmente sustituido, carboxilo, hidrazona opcionalmente sustituida, hidrazina opcionalmente sustituida, hidroxilo, tetrazol opcionalmente sustituido, tetrazina opcionalmente sustituida, óxido de nitrilo, nitrona o tiol, siempre que la molécula funcionalizada no sea 50 norborneno o norborneno polimerizado. En algunas de tales realizaciones, la molécula funcionalizada comprende grupos azido. En algunas realizaciones, la molécula funcionalizada es poli(N-(5-azidoacetamidilpentil)acrilamida-co-acrilamida) (PAZAM, por sus siglas en inglés).

55 En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, el sustrato se selecciona de sustrato de vidrio, sustrato de sílice, cuarzo, sustrato de plástico, sustrato de metal, sustrato de óxido de metal, o combinaciones de ellos. En una realización, el sustrato es un sustrato de vidrio.

5 En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, la primera superficie comprende tanto regiones recubiertas de moléculas funcionalizadas como regiones inertes. En algunas realizaciones, las regiones inertes se seleccionan de regiones de vidrio, regiones de metal, regiones de máscara o regiones intersticiales, o combinaciones de ellos. En una realización, las regiones inertes comprenden vidrio.

En cualquiera de las realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, el método puede comprender además una etapa de lavado para retirar el exceso de moléculas funcionalizadas no unidas.

En cualquiera de las realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, el método puede comprender además una etapa de secado.

10 En cualquiera de las realizaciones de los métodos para injertar cebadores como se describe en la presente memoria, el método puede comprender además una etapa de lavado para retirar el exceso de oligonucleótidos no unidos.

### Breve descripción de los dibujos

15 La FIG. 1A muestra un sustrato de vidrio silanizado con un derivado de norborneno-silano [(5-biciclo[2.2.1]hept-2-enil)etil]trimetoxisilano (1a) y posteriormente recubierto y térmicamente reticulado con PAZAM.

La Fig. 1B muestra la gráfica relacionada de la mediana de intensidades Typhoon de la superficie sin patrón silanizada con el derivado de norborneno-silano (1a)/recubierta con PAZAM, injertada, hibridada con una secuencia oligonucleotídica complementaria que contiene colorante TET.

20 La FIG. 2A muestra un sustrato de vidrio con patrón con nanopocillos silanizados con el derivado de norborneno-silano (1a) y posteriormente recubiertos y térmicamente reticulados con PAZAM.

La FIG. 2B muestra la gráfica relacionada de la mediana de intensidades de fluorescencia de la superficie sin patrón silanizada con el derivado de norborneno-silano (1a)/recubierta con PAZAM, injertada, hibridada con una secuencia oligonucleotídica complementaria que contiene colorante TET.

25 La FIG. 3A muestra una imagen de fluorescencia Typhoon de la superficie injertada hibridada con una secuencia oligonucleotídica complementaria que contiene colorante utilizando un sustrato funcionalizado con acrilamida.

La FIG. 3B muestra una imagen de fluorescencia Typhoon de la superficie injertada hibridada con una secuencia oligonucleotídica complementaria que contiene colorante que utiliza un sustrato silanizado con el derivado de norborneno silano (1a) recubierto con PAZAM.

30 La FIG. 3C muestra que una solución acuosa de PAZAM al 0.25% humedece una superficie silanizada con el derivado de norborneno silano (1a).

La FIG. 4 muestra la métrica de secuenciación del cebador injertado a partir del sustrato preparado mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

La FIG. 5A muestra una imagen Typhoon inicial de la superficie injertada de un sustrato utilizando un método de injerto sin cobre con cebadores modificados con BCN.

35 La FIG. 5B es una gráfica de líneas y barras que ilustra los datos de control de calidad TET iniciales después de injertar una superficie tratada con PAZAM con cebadores modificados con BCN y el porcentaje de pérdida de superficie según se mide después de un ensayo de estrés térmico.

La FIG. 6A muestra una imagen Typhoon inicial de la superficie injertada de un sustrato que utiliza un método de injerto sin cobre y diferentes concentraciones de cebadores modificados con BCN.

40 La FIG. 6B es una gráfica de líneas y barras que ilustra los datos de control de calidad TET iniciales después de injertar una superficie tratada con PAZAM con diferentes concentraciones de cebadores modificados con BCN y el porcentaje de pérdida de superficie según se mide después de un ensayo de estrés térmico.

La FIG. 7A muestra una imagen de fluorescencia de agrupaciones que crecen a partir de una superficie injertada con cebador modificado con BCN con baja densidad de agrupaciones.

45 La FIG. 7B muestra una imagen de fluorescencia de agrupaciones que crecen a partir de una superficie injertada con cebador modificado con BCN con alta densidad de agrupaciones.

Las FIG. 8A y 8B muestran una imagen en miniatura de agrupaciones de ambas superficies de un canal recubierto con una mezcla de PAZAM preconjugado obtenido a partir de un sistema HiSeq estándar.

50 La FIG. 9 muestra una imagen en miniatura de agrupaciones de una superficie de un canal recubierto con una mezcla de PAZAM preconjugado obtenido a partir de un sistema MiSeq estándar.

**Descripción detallada de las realizaciones**

Las realizaciones de la descripción se refieren a la conjugación de una molécula funcionalizada a la superficie de un sustrato funcionalizado con silano o con un derivado de silano que tiene restos insaturados opcionalmente sustituidos seleccionados de cicloalquenos, cicloalquinos, heterocicloalquenos o heterocicloalquinos enlazados covalentemente a los átomos de silicio del silano o derivado del silano. En una realización, la molécula funcionalizada es un hidrogel, polímero u otra molécula que se desea unir a un sustrato. En algunas realizaciones, la molécula funcionalizada se conjuga a una superficie a través de un derivado de norborneno, tal como un silano modificado con norborneno, tal como [(5-biciclo [2.2.1]hept-2-enil)etil] trimetoxisilano. En algunas realizaciones, la molécula funcionalizada se conjuga a una superficie a través de un silano modificado con cicloalquino, tal como ciclooctino o un silano modificado con bicliclononino, por ejemplo, silano modificado con biciclo[6.1.0]non-4-ino, o mezclas de ellos.

Algunas realizaciones se refieren a una celda de flujo para realizar reacciones de secuenciación por síntesis que incluye un hidrogel, tal como poli(N-(5-azidoacetamidilpentil)acrilamida-co-acrilamida) ("PAZAM") conjugada a un sustrato de vidrio a través de un enlace de silano modificado con norborneno, un enlace de silano modificado con ciclooctino, o un enlace de silano modificado con bicliclononino.

Algunas realizaciones relacionadas con una celda de flujo para realizar reacciones de secuenciación por síntesis que incluyen oligonucleótidos, tal como un cebador P5 o P7 conjugado a una superficie de sustrato recubierto de hidrogel o polímero a través de un enlace modificado con ciclooctino o bicliclononino tal como el enlace modificado con biciclo[6.1.0]non-4-ino.

**Definiciones**

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que un experto en la técnica entiende comúnmente. Todas las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones a las que se hace referencia en la presente memoria se incorporan por referencia en su totalidad a menos que se indique lo contrario. En el caso de que haya una pluralidad de definiciones para un término en la presente memoria, prevalecen las de esta sección a menos que se indique lo contrario. Tal como se utiliza en la especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se indique lo contrario, se emplean métodos convencionales de espectroscopia de masas, RMN, HPLC, química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología. El uso de "o" o "y" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "que incluye" así como otras formas, tales como "incluyen", "incluye" e "incluido" no es limitante. Tal como se utiliza en esta especificación, ya sea en una frase de transición o en el cuerpo de la reivindicación, los términos "comprenden", "comprende" y "que comprende" se deben interpretar como que tienen un significado abierto. Es decir, los términos se deben interpretar como sinónimos de las frases "que tiene al menos" o "que incluye al menos". Cuando se utiliza en el contexto de un método, el término "que comprende" significa que el método incluye al menos las etapas mencionadas, pero puede incluir etapas adicionales. Cuando se utiliza en el contexto de un compuesto, composición o dispositivo, el término "que comprende" significa que el compuesto, composición o dispositivo incluye al menos las características o componentes mencionados, pero también puede incluir características o componentes adicionales.

Los títulos de sección utilizados en la presente memoria son solo para fines organizativos y no se deben interpretar como limitantes de la materia descrita.

Como se utiliza en la presente memoria, las abreviaturas orgánicas comunes se definen de la siguiente manera:

Ac	Acetil
Ac <sub>2</sub> O	Anhídrido acético
APTS	aminopropilsilano
APTES	(3-aminopropil)trietoxisilano
APTMS	(3-aminopropil)trimetoxisilano
Ac.	Acuoso
Azapa	N(5-azidoacetamidilpentil)acrilamida
BCN	Biciclo[6.1.0]non-4-ino
BHT, por sus siglas en inglés	Butilhidroxitolueno
Bn	Benzilo

## ES 2 700 529 T3

Brapa o BRAPA	N-(5-bromoacetamidilpentil)acrilamida
Bz	Benzoilo
BOC o Boc	tert-Butoxicarbonilo
Bu	n-Butilo
Cat.	Catalítico
Cbz	Carbobenziloxi
CMP, por sus siglas en inglés	Pulido mecanico quimico
CyCl, por sus siglas en inglés	Cloruro cianúrico
CVD, por sus siglas en inglés	Deposición química en fase de vapor
°C	Temperatura en grados centígrados
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Deoxicitidina trifosfato
dGTP	Deoxiguanosina trifosfato
dTTP	Deoxitimidina trifosfato
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCA, por sus siglas en inglés	Acido dicloroacetico
DCE	1,2-dicloroetano
DCM, por sus siglas en inglés	Cloruro de metileno
DIEA	Diisopropiletilamina
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMA	Dimetilacetamida
DME	Dimetoxietano
DMF	N,N'-Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPA, por sus siglas en inglés	Difenilfosforilazida
Et	Etilo
EtOAc, por sus siglas en inglés	Acetato de etilo
g	Gramo/gramos
GPC, por sus siglas en inglés	Cromatografía de permeación en gel
h o hr	Hora/horas
iPr	Isopropilo
KPi	Tampón de fosfato de potasio 10 mM a pH 7,0
KPS	Persufato de potasio
IPA, por sus siglas en inglés	Alcohol isopropílico
LCMS, por sus siglas en inglés	Cromatografía líquida-espectrometría de masas
LDA, por sus siglas en inglés	Diisopropilamida de litio

m o min	Minuto/minutos
mCPBA, por sus siglas en inglés	Ácido meta-cloroperoxibenzoico
MeOH	Metanol
MeCN	Acetonitrilo
mL	Mililitro/mililitros
MTBE	Metil terciario-butil éter
NaN <sub>3</sub>	Azida sódica
NHS	N-hidroxisuccinimida
NHS-AA	Ácido acrílico esterificado con N-hidroxisuccinimida
PAZAM	poli(N-(5-azidoacetamidilpentil) acrilamida-co-acrilamida) con cualquier relación de acrilamida a Azapa
PG, por sus siglas en inglés	Grupo protector
Ph	Fenilo
PMEDTA	N,N,N',N'',N'''-Pentametildietilentriamina
ppt	Precipitado
rt, por sus siglas en inglés	Temperatura ambiente
SBS, por sus siglas en inglés	Secuenciación por síntesis
SFA, por sus siglas en inglés	Acrilamida sin silano como se define en la patente de EE.UU. n° de publicación 2011/0059865
Sulfo-HSAB o SASAB	4-azidobenzoato de N-Hidroxisulfosuccinimidilo
TEA	Trietilamina
TEMPO	(2,2,6,6-Tetrametilpiperidin-1il)oxilo
TCDI	1,1'-Tiocarbonildiimidazol
Tert, t	Terciario
TFA, por sus siglas en inglés	Ácido trifluoracético
THF	Tetrahidrofurano
TEMED	Tetrametiletildiamina
YES	Yield Engineering Systems
µL	Microlitro/microlitros

Como se utiliza en la presente memoria, el término "matriz" se refiere a una población de diferentes sondas moleculares que están unidas a uno o más sustratos, de manera que las diferentes sondas moleculares se pueden diferenciar entre sí según la localización relativa. Una matriz puede incluir diferentes sondas moleculares que están localizadas en una localización directamente asequible diferentes sobre un sustrato. Alternativa o adicionalmente, una matriz puede incluir sustratos separados, cada uno portador de una sonda molecular diferente, en donde las diferentes sondas moleculares se pueden identificar según las localizaciones de los sustratos sobre una superficie a la que se unen los sustratos o según las localizaciones de los sustratos en un líquido. Las matrices ilustrativas en las que se localizan sustratos separados sobre una superficie incluyen, sin limitación, las que incluyen perlas en pocillos, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 6.355.431 B1, en el documento de patente 2002/0102578 y la publicación PCT n° WO 00/63437. Los formatos ilustrativos que se pueden utilizar en la presente solicitud para distinguir perlas en una matriz líquida, por ejemplo, utilizando un dispositivo microfluídico, tal como un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés), se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. n° 6.524.793. Otros ejemplos de matrices que se pueden utilizar en la solicitud incluyen, sin limitación, los descritos en las patentes de EE.UU. n° 5.429.807; 5.436.327; 5.561.071; 5.583.211; 5.658.734; 5.837.858; 5.874.219; 5.919.523; 6.136.269; 6.287.768; 6.287.776; 6.288.220; 6.297.006; 6.291.193; 6.346.413;

6.416.949; 6.482.591; 6.514.751 y 6.610.482; y en los documentos WO 93/17126; WO 95/11995; WO 95/35505; EP 742 287; y EP 799 897.

5 Como se utiliza en la presente memoria, el término "unido covalentemente" o "enlazado covalentemente" se refiere a la formación de un enlace químico que se caracteriza por el intercambio de pares de electrones entre los átomos. Por ejemplo, un recubrimiento de polímeros unido covalentemente se refiere a un recubrimiento de polímeros que forma enlaces químicos con una superficie funcionalizada de un sustrato, en comparación con la unión a la superficie a través de otros medios, por ejemplo, unión o interacción electrostática. Se apreciará que los polímeros que están unidos covalentemente a una superficie también se pueden enlazar por medios además de la unión covalente, por ejemplo, la fisisorción.

10 Como se utiliza en la presente memoria, "aC a bC" o "C<sub>a-b</sub>" en la que "a" y "b" son números enteros se refieren al número de átomos de carbono en el grupo especificado. Es decir, el grupo puede contener de "a" a "b", inclusive, átomos de carbono. Así, por ejemplo, un grupo "alquilo de 1C a 4C" o "alquilo (C<sub>1-4</sub>)" se refiere a todos los grupos alquilo que tienen de 1 a 4 carbonos, es decir, CH<sub>3</sub>-, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)- y (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C-.

15 El término "halógeno" o "halo", como se utiliza en la presente memoria, significa uno cualquiera de los átomos radioestables de la columna 7 de la Tabla Periódica de los Elementos, p. ej., flúor, cloro, bromo o yodo, siendo preferidos flúor y cloro.

20 Como se utiliza en la presente memoria, "alquilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que está completamente saturada (es decir, no contiene enlaces dobles o triples). El grupo alquilo puede tener de 1 a 20 átomos de carbono (cuando aparece en la presente memoria, un intervalo numérico tal como "1 a 20" se refiere a cada número entero en el intervalo dado; p. ej., "1 a 20 átomos de carbono" significa que el grupo alquilo puede consistir en 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc., hasta e incluyendo 20 átomos de carbono, aunque la presente definición también cubre la aparición del término "alquilo" donde no se designa un intervalo numérico). El grupo alquilo también puede ser un alquilo de tamaño medio que tiene de 1 a 9 átomos de carbono. El grupo alquilo también podría ser un alquilo inferior que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. El grupo alquilo se puede designar como "alquilo (C<sub>1-4</sub>)" o designaciones similares. Solo a modo de ejemplo, "alquilo (C<sub>1-4</sub>)" indica que hay de uno a cuatro átomos de carbono en la cadena de alquilo, es decir, la cadena de alquilo se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo y t-butilo. Los grupos alquilo típicos incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, butilo terciario, pentilo, hexilo y similares.

30 Como se utiliza en la presente memoria, "alcoxi" se refiere a la fórmula -OR en donde R es un alquilo como se define anteriormente, tal como "alcoxi (C<sub>1-9</sub>)", que incluye, entre otros, metoxi, etoxi, n-propoxi, 1-metiletoxi(isopropoxi), n-butoxi, iso-butoxi, sec-butoxi y terc-butoxi, y similares.

35 Como se utiliza en la presente memoria, "alquiltio" se refiere a la fórmula -SR en donde R es un alquilo como se define anteriormente, tal como "alquiltio (C<sub>1-9</sub>)" y similares, que incluyen, pero no se limitan a, metilmercapto, etilmercapto, n-propilmercapto, 1-metiletilmercapto (isopropilmercapto), n-butilmercapto, iso-butilmercapto, sec-butilmercapto, terc-butilmercapto y similares.

40 Como se utiliza en la presente memoria, "alquenilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que contiene uno o más dobles enlaces. El grupo alquenilo puede tener de 2 a 20 átomos de carbono, aunque la definición actual también cubre la aparición del término "alquenilo" donde no se designa un intervalo numérico. El grupo alquenilo también puede ser un alquenilo de tamaño medio que tiene de 2 a 9 átomos de carbono. El grupo alquenilo se puede designar como "alquenilo (C<sub>2-4</sub>)" o designaciones similares. Solo a modo de ejemplo, "alquenilo (C<sub>2-4</sub>)" indica que hay de dos a cuatro átomos de carbono en la cadena de alquenilo, es decir, la cadena de alquenilo se selecciona del grupo que consiste en etenilo, propen-1-ilo, propen-2-ilo, propen-3-ilo, buten-1-ilo, buten-2-ilo, buten-3-ilo, buten-4-ilo, 1-metil-propen-1-ilo, 2-metil-propen-1-ilo, 1-etil-eten-1-ilo, 2-metil-propen-3-ilo, buta-1,3-dienilo, buta-1,2-dienilo, y buta-1,2-dien-4ilo. Los grupos alquenilo típicos incluyen, pero no están limitados de ninguna manera a, etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo y hexenilo, y similares.

50 Como se utiliza en la presente memoria, "alquinilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que contiene uno o más enlaces triples. El grupo alquinilo puede tener de 2 a 20 átomos de carbono, aunque la presente definición también cubre la aparición del término "alquinilo" donde no se designa un intervalo numérico. El grupo alquinilo también puede ser un alquinilo de tamaño medio que tiene de 2 a 9 átomos de carbono. El grupo alquinilo también podría ser un alquinilo inferior que tiene 2 a 4 átomos de carbono. El grupo alquinilo se puede designar como "alquinilo (C<sub>2-4</sub>)" o designaciones similares. Solo a modo de ejemplo, "alquinilo (C<sub>2-4</sub>)" indica que hay de dos a cuatro átomos de carbono en la cadena de alquinilo, es decir, la cadena de alquinilo se selecciona del grupo que consiste en etinilo, propin-1-ilo, propin-2-ilo, butin-1-ilo, butin-3-ilo, butin-4-ilo y 2-butinilo. Los grupos alquinilo típicos incluyen, pero no están limitados de ninguna manera a, etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo y hexinilo, y similares.

55 Como se utiliza en la presente memoria, "heteroalquilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada

que contiene uno o más heteroátomos, es decir, un elemento distinto del carbono, que incluye pero no se limita a, nitrógeno, oxígeno y azufre, en la cadena principal. El grupo heteroalquilo puede tener de 1 a 20 átomos de carbono, aunque la presente definición también cubre la aparición del término "heteroalquilo" donde no se designa un intervalo numérico. El grupo heteroalquilo también puede ser un heteroalquilo de tamaño medio que tiene de 1 a 9 átomos de carbono. El grupo heteroalquilo también podría ser un heteroalquilo más pequeño con 1 a 4 átomos de carbono. El grupo heteroalquilo se puede designar como "heteroalquilo (C<sub>1-4</sub>)" o denominaciones similares. El grupo heteroalquilo puede contener uno o más heteroátomos. Solo a modo de ejemplo, "heteroalquilo (C<sub>1-4</sub>)" indica que hay de uno a cuatro átomos de carbono en la cadena de heteroalquilo y, además, uno o más heteroátomos en la cadena principal.

Como se utiliza en la presente memoria, "alquilenos" significa un grupo químico di-radical completamente saturado de cadena ramificada o lineal que contiene solo carbono e hidrógeno que está unido al resto de la molécula a través de dos puntos de unión (es decir, un alcanodiilo). El grupo alquilenos puede tener de 1 a 20.000 átomos de carbono, aunque la presente definición también cubre la aparición del término alquilenos donde no se designa un intervalo numérico. El grupo alquilenos también puede ser un alquilenos de tamaño medio que tiene de 1 a 9 átomos de carbono. El grupo alquilenos también podría ser un alquilenos más pequeño que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. El grupo alquilenos se puede designar como "alquilenos (C<sub>1-4</sub>)" o designaciones similares. Solo a modo de ejemplo, "alquilenos (C<sub>1-4</sub>)" indica que hay de uno a cuatro átomos de carbono en la cadena de alquilenos, es decir, la cadena de alquilenos se selecciona del grupo que consiste en metileno, etileno, etan-1,1-diilo, propileno, propan-1,1-diilo, propan-2,2-diilo, 1-metil-etileno, butileno, butan-1,1-diilo, butan-2,2-diilo, 2-metil-propan-1,1-diilo, 1-metil-propileno, 2-metil-propileno, 1,1-dimetil-etileno, 1,2-dimetil-etileno y 1-etil-etileno.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "heteroalquilenos" se refiere a una cadena de alquilenos en la que uno o más átomos del esqueleto del alquilenos se seleccionan de un átomo distinto del carbono, p. ej., oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo o combinaciones de ellos. La cadena de heteroalquilenos puede tener una longitud de 2 a 20.000. Heteroalquilenos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, -OCH<sub>2</sub>-, -OCH(CH<sub>3</sub>)-, -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH(CH<sub>3</sub>)O-, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -SCH<sub>2</sub>-, -SCH(CH<sub>3</sub>)-, -SC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-, -SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -NHCH<sub>2</sub>-, -NHCH(CH<sub>3</sub>)-, -NHC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-, -NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, y similares.

Como se utiliza en la presente memoria, "alquilenos" significa un grupo químico di-radical de cadena lineal o ramificada que contiene solo carbono e hidrógeno y que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono que está unido al resto de la molécula a través de dos puntos de unión. El grupo alquilenos puede tener de 2 a 20.000 átomos de carbono, aunque la presente definición también cubre la aparición del término alquilenos donde no se designa un intervalo numérico. El grupo alquilenos también puede ser un alquilenos de tamaño medio que tiene de 2 a 9 átomos de carbono. El grupo alquilenos también podría ser un alquilenos más pequeño que tiene de 2 a 4 átomos de carbono. El grupo alquilenos se puede designar como "alquilenos (C<sub>2-4</sub>)" o denominaciones similares. Solo a modo de ejemplo, "alquilenos (C<sub>2-4</sub>)" indica que hay de dos a cuatro átomos de carbono en la cadena de alquilenos, es decir, la cadena de alquilenos se selecciona del grupo que consiste en etenileno, eten-1,1-diilo, propenileno, propen-1,1-diilo, prop-2-en-1,1-diilo, 1-metil-etenileno, but-1-enileno, but-2-enileno, but-1,3-dienileno, buten-1,1-diilo, but-1,3-dien-1,1-diilo, but-2-en-1,1-diilo, but-3-en-1,1-diilo, 1-metil-prop-2-en-1,1-diilo, 2-metil-prop-2-en-1,1-diilo, 1-etil-etenileno, 1,2-dimetil-etenileno, 1-metil-propenileno, 2-metil-propenileno, 3-metil-propenileno, 2-metil-propen-1,1-diilo, y 2,2-dimetil-eten-1,1-diilo.

Como se utiliza en la presente memoria, "alquilenos" significa un grupo químico di-radical de cadena lineal o ramificada que contiene solo carbono e hidrógeno y que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono que está unido al resto de la molécula a través de dos puntos de unión.

El término "aromático" se refiere a un anillo o sistema de anillos que tiene un sistema de electrones pi conjugados e incluye grupos aromáticos carbocíclicos (p. ej., fenilo) y grupos aromáticos heterocíclicos (p. ej., piridina). El término incluye grupos monocíclicos o policíclicos de anillo fusionado (es decir, anillos que comparten pares de átomos adyacentes) siempre que todo el sistema de anillos sea aromático.

Como se utiliza en la presente memoria, "arilo" se refiere a un anillo aromático o sistema de anillo (es decir, dos o más anillos fusionados que comparten dos átomos de carbono adyacentes) que contienen solo carbono en el anillo principal. Cuando el arilo es un sistema de anillos, cada anillo en el sistema es aromático. El grupo arilo puede tener de 6 a 18 átomos de carbono, aunque la presente definición también cubre la aparición del término "arilo" donde no se designa un intervalo numérico. En algunas realizaciones, el grupo arilo tiene de 6 a 10 átomos de carbono. El grupo arilo se puede designar como "arilo (C<sub>6-10</sub>)", "arilo de 6C a 10C", o denominaciones similares. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, azuleno y antraceno.

Como se utiliza en la presente memoria, "arileno" se refiere a un anillo aromático o sistema de anillos que contiene solo carbono e hidrógeno que se une al resto de la molécula a través de dos puntos de unión.

Como se utiliza en la presente memoria, "ariloxi" y "arilitio" se refieren a RO- y RS-, en donde R es un arilo como se definió anteriormente, como "ariloxi (C<sub>6-10</sub>)" o "arilitio (C<sub>6-10</sub>)" y similares, que incluye pero no se limita a feniloxi.

Un "aralquilo" o "aralquilo" es un grupo arilo conectado, como sustituyente, a través de un grupo alquilenos, tal como

"aralquilo (C<sub>7-14</sub>)" y similares, que incluye pero no se limita a bencilo, 2-feniletilo, 3-fenilpropilo, y naftilalquilo. En algunos casos, el grupo alquileo es un grupo alquileo más pequeño (es decir, un grupo alquileo (C<sub>1-4</sub>)).

5 Como se utiliza en la presente memoria, "heteroarilo" se refiere a un anillo aromático o un sistema de anillos (es decir, dos o más anillos fusionados que comparten dos átomos adyacentes) que contiene o contienen uno o más heteroátomos, es decir, un elemento distinto de carbono, que incluye pero no se limita a nitrógeno, oxígeno y azufre, en el anillo principal. Cuando el heteroarilo es un sistema de anillos, cada anillo en el sistema es aromático. El grupo heteroarilo puede tener 5-18 miembros en el anillo (es decir, el número de átomos que forman el anillo principal, que incluye los átomos de carbono y los heteroátomos), aunque la presente definición también cubre la aparición del  
10 término "heteroarilo", donde no se designa un intervalo numérico. En algunas realizaciones, el grupo heteroarilo tiene de 5 a 10 miembros en el anillo o de 5 a 7 miembros en el anillo. El grupo heteroarilo se puede designar como "heteroarilo de 5-7 miembros", "heteroarilo de 5-10 miembros" o denominaciones similares. Los ejemplos de anillos de heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, furilo, tienilo, ftalazinilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, pirinidilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, quinolinilo, isoquinilino, bencimidazolilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, indolilo, isoindolilo y benzotienilo.

Como se utiliza en la presente memoria, "heteroarileno" se refiere a un anillo aromático o sistema de anillo que contiene uno o más heteroátomos en el anillo principal que está unido al resto de la molécula a través de dos puntos de unión.

20 Un "heteroaralquilo" o "heteroarilalquilo" es un grupo heteroarilo conectado, como sustituyente, a través de un grupo alquileo. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a 2-tienilmetilo, 3-tienilmetilo, furilmetilo, tieniletilo, pirrolilalquilo, piridilalquilo, isoxazolilalquilo e imidazolilalquilo. En algunos casos, el grupo alquileo es un grupo alquileo inferior (es decir, un grupo alquileo (C<sub>1-4</sub>)).

25 Como se utiliza en la presente memoria, "carbociclilo" significa un anillo cíclico no aromático o sistema de anillos que contiene solo átomos de carbono en la estructura del sistema de anillos. Cuando el carbociclilo es un sistema de anillos, dos o más anillos pueden estar conectados entre sí de forma condensada, con puente o espiro. Los carbociclicos pueden tener cualquier grado de saturación siempre que al menos un anillo en un sistema de anillos no sea aromático. Por lo tanto, los carbociclicos incluyen cicloalquilos, cicloalquenos y cicloalquinos. El grupo carbociclilo puede tener de 3 a 20 átomos de carbono, aunque la definición actual también cubre la aparición del término "carbociclilo", donde no se designa un intervalo numérico. El grupo carbociclilo también puede ser un  
30 carbociclilo de tamaño medio que tiene de 3 a 10 átomos de carbono. El grupo carbociclilo también podría ser un carbociclilo que tiene de 3 a 6 átomos de carbono. El grupo carbociclilo se puede designar como "carbociclilo (C<sub>3-6</sub>)" o designaciones similares. Ejemplos de anillos de carbociclilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, 2,3-dihidro-indeno, biciclo[2.2.2]octanilo, adamantilo y espiro[4.4]nonanilo.

35 Un "(carbociclil)alquilo" es un grupo carbociclilo conectado, como sustituyente, a través de un grupo alquileo, tal como "(carbociclil)alquilo (C<sub>4-10</sub>)" y similares, que incluye, pero no se limita a, ciclopropilmetilo, ciclobutilmetilo, ciclopropiletilo, ciclopropilbutilo, ciclobutiletilo, ciclopropilisopropilo, ciclopentilmetilo, ciclopentiletilo, ciclohexilmetilo, ciclohexiletilo, cicloheptilmetilo y similares. En algunos casos, el grupo alquileo es un grupo alquileo más pequeño.

Como se utiliza en la presente memoria, "cicloalquilo" significa un anillo de carbociclilo completamente saturado o un sistema de anillos. Los ejemplos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

40 Como se utiliza en la presente memoria, "cicloalquileo" significa un anillo de carbociclilo completamente saturado o un sistema de anillos que se une al resto de la molécula a través de dos puntos de unión.

Como se utiliza en la presente memoria, "cicloalqueno" o "cicloalqueno" significa un anillo de carbociclilo o sistema de anillos que tiene al menos un doble enlace, en donde ningún anillo en el sistema de anillos es aromático. Un ejemplo es ciclohexenilo o ciclohexeno. Otro ejemplo es norborneno o norbornenilo.

45 Como se utiliza en la presente memoria, "heterocicloalqueno" o "heterocicloalqueno" significa un anillo de carbociclilo o sistema de anillos con al menos un heteroátomo en el anillo principal, que tiene al menos un doble enlace, en donde ningún anillo en el sistema de anillos es aromático.

50 Como se utiliza en la presente memoria, "cicloalquino" o "cicloalquino" significa un anillo de carbociclilo o sistema de anillos que tiene al menos un triple enlace, en donde ningún anillo en el sistema de anillos es aromático. Un ejemplo es ciclooctino. Otro ejemplo es biciclononino.

Como se utiliza en la presente memoria, "heterocicloalquino" o "heterocicloalquino" significa un anillo de carbociclilo o sistema de anillos con al menos un heteroátomo en el anillo principal, que tiene al menos un enlace triple, en donde ningún anillo en el sistema de anillos es aromático.

55 Como se utiliza en la presente memoria, "heterociclilo" significa un anillo cíclico no aromático o sistema de anillos que contiene al menos un heteroátomo en el anillo principal. Los heterociclicos pueden estar conectados entre sí de manera condensada, con puente o espiro. Los heterociclicos pueden tener cualquier grado de saturación siempre que al menos un anillo en el sistema de anillos no sea aromático. El heteroátomo o heteroátomos pueden estar

5 presentes en un anillo no aromático o aromático en el sistema de anillos. El grupo heterociclilo puede tener de 3 a 20 miembros en el anillo (es decir, el número de átomos que forman el anillo principal, que incluye átomos de carbono y heteroátomos), aunque la presente definición también cubre la aparición del término "heterociclilo" donde no se designa un intervalo numérico. El grupo heterociclilo también puede ser un heterociclilo de tamaño mediano que tiene de 3 a 10 miembros en el anillo. El grupo heterociclilo también podría ser un heterociclilo que tiene de 3 a 6 miembros en el anillo. El grupo heterociclilo se puede designar como "heterociclilo de 3-6 miembros" o designaciones similares. En heterociclicos monocíclicos preferidos de seis miembros, el heteroátomo o los heteroátomos se seleccionan de uno hasta tres de O, N o S, y en los heterociclicos monocíclicos preferidos de cinco miembros, el heteroátomo o los heteroátomos se seleccionan de uno o dos heteroátomos seleccionados de O, N, o S. Los ejemplos de anillos de heterociclilo incluyen, pero no se limitan a, azepinilo, acridinilo, carbazolilo, cinnolinilo, dioxolanilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, morfolinilo, oxiranilo, oxepanilo, tiepanilo, piperidinilo, piperazinilo, dioxopiperazinilo, pirrolidinilo, pirrolidonilo, pirrolidionilo, 4-piperidonilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, 1,3-dioxinilo, 1,3-dioxanilo, 1,4-dioxinilo, 1,4-dioxanilo, 1,3-oxatianoilo, 1,4-oxatiinilo, 1,4-oxatianoilo, 2H-1,2-oxazinilo, trioxanilo, hexahidro-1,3,5-triazinilo, 1,3-dioxolilo, 1,3-dioxolanilo, 1,3-ditiolilo, 1,3-ditioalanilo, isoxazolinilo, isoxazolidinilo, oxazolinilo, oxazolidinilo, oxazolidinonilo, tiazolinilo, tiazolidinilo, 1,3-oxatianoilo, indolinilo, isoindolinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahydro-1,4-tiazinilo, tiamorfolinilo, dihidrobenzofuranilo, bencimidazolidinilo y tetrahydroquinolina.

20 Como se utiliza en la presente memoria, "heterociclieno" significa un anillo cíclico no aromático o sistema de anillos que contiene al menos un heteroátomo que está unido al resto de la molécula a través de dos puntos de unión.

Un "(heterocicli)alquilo" es un grupo heterociclilo conectado, como un sustituyente, a través de un grupo alquileo. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, imidazolinilmetilo e indoliniletilo.

25 Como se utiliza en la presente memoria, "acilo" se refiere a C(=O)R, en donde R es hidrógeno, alquilo(C<sub>1-6</sub>), alquenilo(C<sub>2-6</sub>), alquinilo(C<sub>2-6</sub>), carbociclilo(C<sub>3-7</sub>), arilo(C<sub>6-10</sub>), heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria. Los ejemplos no limitantes incluyen formilo, acetilo, propanoilo, benzoilo y acrilo.

Un grupo "O-carboxi" se refiere a un grupo "-OC(=O)R" en el que R se selecciona de hidrógeno, alquilo(C<sub>1-6</sub>), alquenilo(C<sub>2-6</sub>), alquinilo(C<sub>2-6</sub>), carbociclilo(C<sub>3-7</sub>), arilo(C<sub>6-10</sub>), heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

30 Un grupo "C-carboxi" se refiere a un grupo "-C(=O)OR" en el que R se selecciona entre hidrógeno, alquilo(C<sub>1-6</sub>), alquenilo(C<sub>2-6</sub>), alquinilo(C<sub>2-6</sub>), carbociclilo(C<sub>3-7</sub>), arilo(C<sub>6-10</sub>), heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria. Un ejemplo no limitante incluye carboxilo (es decir, -C(=O)OH).

35 Un grupo "acetal" se refiere a RC(H)(OR')<sub>2</sub>, en el que R y R' se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo(C<sub>1-6</sub>), alquenilo(C<sub>2-6</sub>), alquinilo(C<sub>2-6</sub>), carbociclilo(C<sub>3-7</sub>), arilo(C<sub>6-10</sub>), heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

Un grupo "ciano" se refiere a un grupo "-CN".

Un grupo "cianato" se refiere a un grupo "-OCN".

Un grupo "isocianato" se refiere a un grupo "-NCO".

Un grupo "tiocianato" se refiere a un grupo de "-SCN".

40 Un grupo "isotiocianato" se refiere a un grupo "-NCS".

Un grupo "sulfinilo" se refiere a un grupo "-S(=O)R" en el que R se selecciona de hidrógeno, alquilo(C<sub>1-6</sub>), alquenilo(C<sub>2-6</sub>), alquinilo(C<sub>2-6</sub>), carbociclilo(C<sub>3-7</sub>), arilo(C<sub>6-10</sub>), heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

45 Un grupo "sulfonilo" se refiere a un grupo "-SO<sub>2</sub>R" en el que R se selecciona de hidrógeno, alquilo(C<sub>1-6</sub>), alquenilo(C<sub>2-6</sub>), alquinilo(C<sub>2-6</sub>), carbociclilo(C<sub>3-7</sub>), arilo(C<sub>6-10</sub>), heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

Un grupo "S-sulfonamida" se refiere a un grupo "-SO<sub>2</sub>NR<sub>A</sub>R<sub>B</sub>" en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo(C<sub>1-6</sub>), alquenilo(C<sub>2-6</sub>), alquinilo(C<sub>2-6</sub>), carbociclilo(C<sub>3-7</sub>), arilo(C<sub>6-10</sub>), heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

50 Un grupo "N-sulfonamida" se refiere a un grupo "-N(R<sub>A</sub>)SO<sub>2</sub>R<sub>B</sub>" en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo(C<sub>1-6</sub>), alquenilo(C<sub>2-6</sub>), alquinilo(C<sub>2-6</sub>), carbociclilo(C<sub>3-7</sub>), arilo(C<sub>6-10</sub>), heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

Un "óxido de nitrilo", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un grupo "RC≡N<sup>+</sup>O<sup>-</sup>" en el que R se selecciona de hidrógeno, alquilo(C<sub>1-6</sub>), alquenilo(C<sub>2-6</sub>), alquinilo(C<sub>2-6</sub>), carbociclilo(C<sub>3-7</sub>), arilo(C<sub>6-10</sub>), heteroarilo de 5-

10 miembros o heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria. Los ejemplos no limitantes de preparación de óxido de nitrilo incluyen la generación in situ a partir de aldoximas mediante tratamiento con cloramida-T o mediante la acción de una base sobre cloruros de imidoilo [RC(Cl)=NOH].

5 Una "nitrona", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un grupo "R<sub>A</sub>R<sub>B</sub>C=NRC<sup>+</sup>O<sup>-</sup>" en el que R<sub>A</sub>, R<sub>B</sub> y RC se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo(C<sub>1-6</sub>), alquenilo(C<sub>2-6</sub>), alquinilo(C<sub>2-6</sub>), carbociclilo(C<sub>3-7</sub>), arilo(C<sub>6-10</sub>), heteroarilo de 5-10 miembros, o heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

10 Un grupo "O-carbamilo" se refiere a un grupo "-OC(=O)NR<sub>A</sub>R<sub>B</sub>" en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo(C<sub>1-6</sub>), alquenilo(C<sub>2-6</sub>), alquinilo(C<sub>2-6</sub>), carbociclilo(C<sub>3-7</sub>), arilo(C<sub>6-10</sub>), heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

Un grupo "N-carbamilo" se refiere a un grupo "-N(R<sub>A</sub>)OC(=O)R<sub>B</sub>" en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo(C<sub>1-6</sub>), alquenilo(C<sub>2-6</sub>), alquinilo(C<sub>2-6</sub>), carbociclilo(C<sub>3-7</sub>), arilo(C<sub>6-10</sub>), heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

15 Un grupo "O-tiocarbamilo" se refiere a un grupo "-OC(=S)NR<sub>A</sub>R<sub>B</sub>" en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo(C<sub>1-6</sub>), alquenilo(C<sub>2-6</sub>), alquinilo(C<sub>2-6</sub>), carbociclilo(C<sub>3-7</sub>), arilo(C<sub>6-10</sub>), heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

20 Un grupo "N-tiocarbamilo" se refiere a un grupo "-N(R<sub>A</sub>)OC(=S)R<sub>B</sub>" en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo(C<sub>1-6</sub>), alquenilo(C<sub>2-6</sub>), alquinilo(C<sub>2-6</sub>), carbociclilo(C<sub>3-7</sub>), arilo(C<sub>6-10</sub>), heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

Un grupo "C-amida" se refiere a un grupo "-C(=O)NR<sub>A</sub>R<sub>B</sub>" en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo(C<sub>1-6</sub>), alquenilo(C<sub>2-6</sub>), alquinilo(C<sub>2-6</sub>), carbociclilo(C<sub>3-7</sub>), arilo(C<sub>6-10</sub>), heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

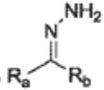
25 Un grupo "N-amida" se refiere a un grupo "-N(R<sub>A</sub>)C(=O)R<sub>B</sub>" en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo(C<sub>1-6</sub>), alquenilo(C<sub>2-6</sub>), alquinilo(C<sub>2-6</sub>), carbociclilo(C<sub>3-7</sub>), arilo(C<sub>6-10</sub>), heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

30 Un grupo "amino" se refiere a un grupo "NR<sub>A</sub>R<sub>B</sub>" en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo(C<sub>1-6</sub>), alquenilo(C<sub>2-6</sub>), alquinilo(C<sub>2-6</sub>), carbociclilo(C<sub>3-7</sub>), arilo(C<sub>6-10</sub>), heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria. Un ejemplo no limitante incluye amino libre (es decir -NH<sub>2</sub>).

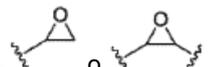
Un grupo "aminoalquilo" se refiere a un grupo amino unido a través de un grupo alquileo.

Un grupo "alcoxilalquilo" se refiere a un grupo alcoxi unido a través de un grupo alquileo, tal como un "alcoxilalquilo (C<sub>2-8</sub>)" y similares.

El término "hidrazina" o "hidrazinilo" como se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo -NHNH<sub>2</sub>.

35 El término "hidrazona" o "hidrazonilo" como se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo .

El término "formilo" como se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo -C(O)H.

El término "epoxi" como se utiliza en la presente memoria se refiere a .

40 El término "éster" como se utiliza en la presente memoria se refiere a R-C(=O)O-R', en donde R y R' pueden ser independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, cicloalquinilo, arilo, heteroarilo, heteroalícicilo, aralquilo, (heteroalícicilo)alquilo, o variantes opcionalmente sustituidas de ellos.

El término "ácido carboxílico" o "carboxilo", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a -C(O)OH.

El término "tiocianato", como se utiliza en la presente memoria, se refiere al grupo -S-C≡N.

45 El término "oxo-amina", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un grupo -O-NH<sub>2</sub>, en donde uno o más hidrógenos del -NH<sub>2</sub> pueden estar opcionalmente sustituidos por un grupo R. R puede ser independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, cicloalquinilo, arilo, heteroarilo, heteroalícicilo, aralquilo o (heteroalícicilo)alquilo.

Como se utiliza en la presente memoria, un "nucleótido" incluye una base heterocíclica que contiene nitrógeno, un

azúcar y uno o más grupos fosfato. Son unidades monoméricas de una secuencia de ácido nucleico. En el ARN, el azúcar es una ribosa y en el ADN una desoxirribosa, es decir, un azúcar que carece de un grupo hidroxilo que está presente en la posición 2' en la ribosa. La base heterocíclica que contiene nitrógeno puede ser base púrica o pirimidínica. Las bases púricas incluyen adenina (A) y guanina (G), y derivados modificados o análogos de ellos. Las bases pirimidínicas incluyen citosina (C), timina (T) y uracilo (U), y derivados modificados o análogos de ellos. El átomo de desoxirribosa C-1 se enlaza a N-1 de una pirimidina o N-9 de una purina.

Como se utiliza en la presente memoria, un "nucleósido" es estructuralmente similar a un nucleótido, pero carece de restos de fosfato en la posición 5'. El término "nucleósido" se utiliza en la presente memoria en su sentido ordinario tal como lo entienden los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, un ribonucleósido que comprende un resto de ribosa y un desoxirribonucleósido que comprende un resto de desoxirribosa. Un resto de pentosa modificada es un resto de pentosa en el que un átomo de oxígeno se ha reemplazado con un carbono y/o un carbono se ha reemplazado con un átomo de azufre u oxígeno. Un "nucleósido" es un monómero que puede tener una base sustituida y/o un resto de azúcar. Además, se puede incorporar un nucleósido en polímeros y oligómeros de ADN y/o ARN más grandes.

Como se utiliza en la presente, el término "polinucleótido" se refiere a los ácidos nucleicos en general, que incluye ADN (p. ej., ADNc de ADN genómico), ARN (p. ej., ARNm), oligonucleótidos sintéticos y análogos de ácidos nucleicos sintéticos. Los polinucleótidos pueden incluir bases naturales o no naturales, o combinaciones de ellos y grupos unidos a la cadena principal naturales o no naturales, p. ej., fosforotioatos, PNA o 2'-O-metil-ARN, o combinaciones de ellos.

Como se utiliza en la presente memoria, un "cebador BCN" o "cebador modificado con BCN" se refiere a un cebador que comprende biciclo[6.1.0]non-4-ino unido covalentemente al extremo 5'. El cebador se define como una molécula de ADN monocatenario (ADNss) con un grupo OH en 3' libre y una modificación en el extremo 5' para permitir las reacciones de acoplamiento. La longitud del cebador puede ser de cualquier número de bases y puede incluir una variedad de nucleótidos no naturales.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "silano" se refiere a un compuesto orgánico o inorgánico que contiene uno o más átomos de silicio. Un ejemplo no limitante de un compuesto de silano inorgánico es  $\text{SiH}_4$ , o  $\text{SiH}_4$  halogenado, donde el hidrógeno se reemplaza por uno o más átomos de halógeno. Un ejemplo no limitante de un compuesto de silano orgánico es  $\text{X-R}^{\text{C}}\text{-Si}(\text{OR}^{\text{D}})_3$ , en donde X es un grupo orgánico no hidrolizable, tal como amino, vinilo, epoxi, metacrilato, azufre, alquilo, alquenilo, alquinilo;  $\text{R}^{\text{C}}$  es un espaciador, por ejemplo  $-(\text{CH}_2)_n-$ , en donde n es de 0 a 1000;  $\text{R}^{\text{D}}$  se selecciona de hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, carbocicilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido, y heterocicilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido, como se define en la presente memoria. Como se define en la presente memoria, el término "silano" puede comprender mezclas de diferentes compuestos de silano.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "tetrazina" o "tetrazinilo" se refiere a un grupo heteroarilo de seis miembros que comprende cuatro átomos de nitrógeno. La tetrazina puede estar opcionalmente sustituida.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "tetrazol" o "tetrazolilo" se refiere a un grupo heterocíclico de cinco miembros que comprende cuatro átomos de nitrógeno. El tetrazol puede estar opcionalmente sustituido.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "resto insaturado" se refiere a un grupo químico que incluye cicloalquenos, cicloalquinos, heterocicloalquenos, heterocicloalquinos, o variantes opcionalmente sustituidas de ellos que comprenden al menos un doble enlace o un triple enlace. Los restos insaturados pueden ser monovalentes o divalentes. Cuando el resto insaturado es monovalente, se utiliza cicloalqueno, cicloalquino, heterocicloalqueno, heterocicloalquino de manera intercambiable con cicloalquenilos, cicloalquinilos, heterocicloalquenilo, heterocicloalquinilo. Cuando el resto insaturado es divalente, se utiliza cicloalqueno, cicloalquino, heterocicloalqueno, heterocicloalquino de manera intercambiable con cicloalquenileno, cicloalquinileno, heterocicloalquenileno, heterocicloalquinileno.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "polímero" se refiere a una molécula compuesta por muchas subunidades repetidas. Los polímeros pueden ser lineales, ramificados o hiperramificados. Los ejemplos no limitantes de polímeros ramificados incluyen polímeros estrella, polímeros peine, polímeros cepillo, polímeros dendronizados, escaleras y dendrímeros. Los polímeros descritos en la presente memoria también pueden estar en forma de nanopartículas poliméricas.

Como se utiliza en la presente memoria, los prefijos "foto" o "foto-" significan relativo a la luz o radiación electromagnética. El término puede abarcar todo o parte del espectro electromagnético que incluye, pero no se limita a, uno o más de los intervalos comúnmente conocidos como partes del espectro de radio, microondas, infrarrojo, visible, ultravioleta, rayos X o rayos gamma. La parte del espectro puede ser una que esté bloqueada por una región metálica de una superficie tal como los metales expuestos en la presente memoria. Alternativa o adicionalmente, la parte del espectro puede ser una que pase a través de una región intersticial de una superficie tal como una región hecha de vidrio, plástico, sílice u otro material expuesto en la presente memoria. En realizaciones particulares, se

puede utilizar radiación que es capaz de pasar a través de un metal. Alternativamente o adicionalmente, se puede utilizar radiación que está enmascarada por vidrio, plástico, sílice u otro material expuesto en la presente memoria.

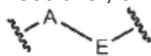
5 Como se utiliza en la presente memoria, el término "sitio reactivo" significa un sitio sobre los recubrimientos de moléculas funcionalizadas descritos en la presente memoria que se puede utilizar para unir una o más moléculas mediante una reacción química o interacción molecular. Tal unión puede ser a través de un enlace covalente o a través de otros enlaces o fuerzas interactivas.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "método YES" se refiere a la herramienta de deposición química en fase de vapor proporcionada por la compañía Yield Engineering Systems ("YES") con un método deposición química en fase de vapor desarrollado por Illumina, Inc.. Incluye tres sistemas diferentes de deposición en fase de vapor. El sistema automático de vapor de silano YES-VertaCoat está diseñado para la producción de volumen con un módulo flexible de manejo de placas que puede acomodar placas de 200 o 300 mm. El sistema de vapor de silano SI-1224P de carga manual está diseñado para una producción de volumen versátil con sus cámaras configurables de gran capacidad. Yes-LabKote es una versión de mesa de bajo coste que es ideal para estudios de viabilidad y para R&D.

15 Como se utiliza en la presente memoria, un grupo sustituido se obtiene a partir del grupo original no sustituido en el que ha habido un intercambio de uno o más átomos de hidrógeno por otro átomo o grupo. A menos que se indique lo contrario, cuando un grupo se considera "sustituido", se entiende que el grupo está sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquenilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquinilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), heteroalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), carbociclilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>) (opcionalmente sustituido con, halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), carbociclilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>) alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), heterociclilo de 5-10 miembros (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), heterociclil-alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), arilo (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), aril alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), heteroarilo de 5-10 miembros (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), heteroarilalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) de 5-10 miembros (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), halo, ciano, hidroxilo, alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)) (es decir, éter), ariloxi, sulfhidrilo (mercapto), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (por ejemplo, -CF<sub>3</sub>), haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (por ejemplo, -OCF<sub>3</sub>), alquilio(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), ariltio, amino, aminoalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), nitro, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, S-sulfonamido, N-sulfonamido, C-carboxi, O-carboxi, acilo, cianato, isocianato, tiocianato, isotiocianato, sulfonilo, sulfonilo y oxo (=O). Siempre que un grupo se describa como "opcionalmente sustituido", ese grupo se puede sustituir con los sustituyentes anteriores.

35 Se debe entender que ciertas convenciones de nomenclatura de radicales pueden incluir un mono-radical o un di-radical, dependiendo del contexto. Por ejemplo, cuando un sustituyente requiere dos puntos de unión al resto de la molécula, se entiende que el sustituyente es un di-radical. Por ejemplo, un sustituyente identificado como alquilo que requiere dos puntos de unión incluye di-radicales tales como -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>- y similares. Otras convenciones de nomenclatura de radicales indican claramente que el radical es un di-radical tal como "alquilenilo" o "alquenileno".

40 Cuando un sustituyente se representa como un di-radical (es decir, tiene dos puntos de unión al resto de la molécula), se debe entender que el sustituyente se puede unir en cualquier configuración direccional, a menos que

se indique lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, un sustituyente representado como -AE- o  incluye el sustituyente que está orientado de manera que la A se une al punto de unión más a la izquierda de la molécula, así como el caso en el que A se une al punto de unión más a la derecha de la molécula.

45 Cuando los compuestos descritos en la presente memoria tienen al menos un estereocentro, pueden existir como enantiómeros y diastereómeros individuales o como mezclas de tales isómeros, incluidos los racematos. La separación de los isómeros individuales o la síntesis selectiva de los isómeros individuales se realiza mediante la aplicación de varios métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica. A menos que se indique lo contrario, todos estos isómeros y mezclas de ellos se incluyen en el alcance de los compuestos descritos en la presente memoria. Además, los compuestos descritos en la presente memoria pueden existir en una o más formas cristalinas o amorfas. A menos que se indique lo contrario, todas estas formas están incluidas en el alcance de los compuestos descritos en la presente memoria, que incluyen cualquier forma polimórfica. Además, algunos de los compuestos descritos en la presente memoria pueden formar solvatos con agua (es decir, hidratos) o disolventes orgánicos comunes. A menos que se indique lo contrario, dichos solvatos se incluyen en el alcance de los compuestos descritos en la presente memoria.

60 Como se utiliza en la presente memoria, el término "porcentaje de superficie restante" se puede referir a la intensidad medida utilizando un control de calidad TET para teñir los cebadores de superficie P5/P7. Los cebadores P5 y P7 se utilizan sobre la superficie de las celdas de flujo comerciales vendidas por Illumina Inc. para la secuenciación en las plataformas HiSeq, MiSeq, Genome Analyzer y NextSeq. Las secuencias de los cebadores se

describen en las patentes de EE.UU. n° de publicación 2011/0059865 A1, que se incorpora en la presente memoria mediante referencia. TET es un oligonucleótido marcado con colorante que tiene una secuencia complementaria a los cebadores P5/P7. TET se puede hibridar a los cebadores P5/P7 sobre una superficie; el exceso de TET se puede lavar, y la concentración de colorante unido se puede medir por detección de fluorescencia utilizando un instrumento de escaneo tal como un escáner Typhoon (General Electric).

El experto en la técnica reconocerá que algunas estructuras descritas en la presente memoria pueden ser formas de resonancia o tautómeros de compuestos que pueden estar bastante representados por otras estructuras químicas; el experto reconoce que tales estructuras solo pueden representar una parte muy pequeña de una muestra de dicho o dichos compuestos. Tales compuestos se consideran dentro del alcance de las estructuras representadas, aunque tales formas de resonancia o tautómeros no se representan en la presente memoria.

Silano o derivados de silano

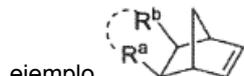
Algunas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a silano o derivados de silano que comprenden una pluralidad de restos insaturados seleccionados de cicloalquenos, cicloalquinos, heterocicloalquenos, heterocicloalquinos o variantes opcionalmente sustituidos o combinaciones de ellos. Como se utiliza en la presente memoria, "cicloalqueno" significa un anillo de carbociclilo o sistema de anillos que tiene al menos un doble enlace, en donde ningún anillo en el sistema de anillos es aromático. Como se utiliza en la presente memoria, "heterocicloalqueno" significa que un anillo de carbociclilo o sistema de anillos contiene al menos un heteroátomo en el anillo principal, que tiene al menos un doble enlace, en donde, ningún anillo en el sistema de anillos es aromático. Como se utiliza en la presente memoria, "cicloalquino" significa un anillo de carbociclilo o sistema de anillos que tiene al menos un triple enlace, en donde ningún anillo en el sistema de anillos es aromático. Como se utiliza en la presente memoria, "heterocicloalquino" significa un anillo de carbociclilo o sistema de anillos que contiene al menos un heteroátomo en el anillo principal, que tiene al menos un triple enlace, en donde ningún anillo en el sistema de anillos es aromático. En algunas realizaciones, el heteroátomo en el heterocicloalqueno se selecciona del grupo que consiste en N, O u S. Tanto el cicloalqueno como el heterocicloalqueno pueden estar opcionalmente sustituidos. Las restos insaturados pueden ser monovalentes o divalentes. Las restos insaturados se pueden unir covalentemente ya sea directamente a los átomos de silicio del silano o derivados de silano, o unidos de forma indirecta a través de conectores. Las restos insaturados se pueden unir adicionalmente a una molécula funcionalizada. En algunas realizaciones, los restos insaturados son cicloalquenos opcionalmente sustituidos, tales como norborneno y derivados del mismo. En algunas realizaciones, los restos insaturados son ciclooctino opcionalmente sustituido o biclicononinos. También se pueden utilizar como restos insaturados otros cicloalquenos, heterocicloalquenos, cicloalquinos, heterocicloalquinos que presentan tensión anular.

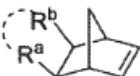
*Norbornenos*

En algunas realizaciones, el cicloalqueno es norborneno o un derivado de norborneno.

En algunas realizaciones, el norborneno puede estar sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alqueno(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquino(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), heteroalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), carbociclilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), carbociclilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)-alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), heterociclilo de 5-10 miembros (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), heterociclil-alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), arilo (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), arilalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), heteroarilo de 5-10 miembros (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), heteroarilalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) de 5-10 miembros (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), halo, ciano, hidroxilo, alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (es decir, éter), ariloxi, sulfhidrido (mercapto), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (p. ej., -CF<sub>3</sub>), haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (p. ej., -OCF<sub>3</sub>), alquiltio(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), ariltio, amino, aminoalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), nitro, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amida, N-amida, S-sulfonamida, N-sulfonamida, C-carboxi, O-carboxi, acilo, cianato, isocianato, tiocianato, isotiocianato, sulfino, sulfonilo, y oxo (=O).

Alternativamente, los dos sustituyentes adyacentes sobre norborneno pueden formar anillos adicionales. Por

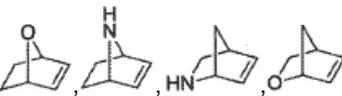


ejemplo,  representa un norborneno disustituido, en donde R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup>, junto con el átomo al que están unidos, se pueden conectar para formar un arilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, un cicloalquilo opcionalmente sustituido o un heterociclilo opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones, el norborneno se puede reemplazar por otros cicloalquenos. Los ejemplos no limitantes incluyen trans-cicloocteno opcionalmente sustituido, trans-ciclopenteno opcionalmente sustituido, trans-ciclohepteno opcionalmente sustituido, trans-ciclononeno opcionalmente sustituido, biciclo[3.3.1]non-1-eno opcionalmente sustituido, biciclo[4.3.1]dec-1(9)-eno opcionalmente sustituido, biciclo[4.2.1]non-1(8)-eno opcionalmente sustituido, y biciclo[4.2.1]-non-1-eno opcionalmente sustituido.

*Hetero(norbornenos)*

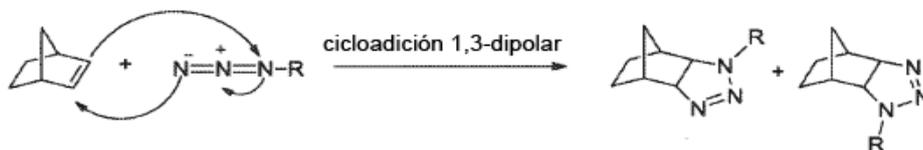
En algunas realizaciones, el heterocicloalqueno utilizado en la presente memoria es un heteronorborneno. Como se utiliza en la presente memoria, (hetero)norborneno significa uno o más átomos de carbono en una molécula de norborneno en sustitución de uno o más heteroátomos. Ejemplos no limitantes de (hetero)norborneno

5 incluyen , o variantes opcionalmente sustituidas de ellos.

*Reacciones de norborneno ilustrativas*

## A. Cicloadición 1,3-dipolar con azidas

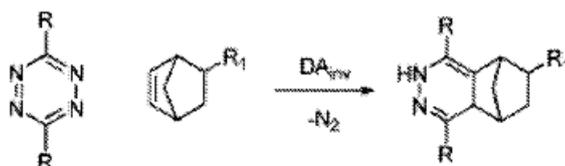
La reacción de las azidas orgánicas y los enlaces olefinicos que llevaron a la formación de 1,2,3-triazolina fue dada a conocer por primera vez por Wolff en 1912. Véase Wolff, Liebigs. Ann., 1912, 394, 23. Este tipo de reacción se denomina como cicloadición 1,3-dipolar. Las adiciones de azida al alquino terminal se reconocieron como un ejemplo de reacción de cicloadición 1,3-dipolar a partir de la investigación de Huisgen. Véase Proceedings of the Chemical Society, 1961, 357-396. Scheiner et al. dieron a conocer la investigación cinética de aril azidas a norborneno (véase Scheiner et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, 87, 306-311). El esquema general de reacción se muestra a continuación:



Además, Shea et al. dieron a conocer estudios de reactividad de dobles enlaces con tensión torsional en cicloadiciones 1,3-dipolares con 2,4,6-trinitrofenil azida. Se probaron una serie de olefinas mono- y bicíclicas que incluyen trans-cicloalquenos y alquenos cabeza de puente. Véase, Shea et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 4846-4855.

## B. Reacción de acoplamiento con tetrazinas

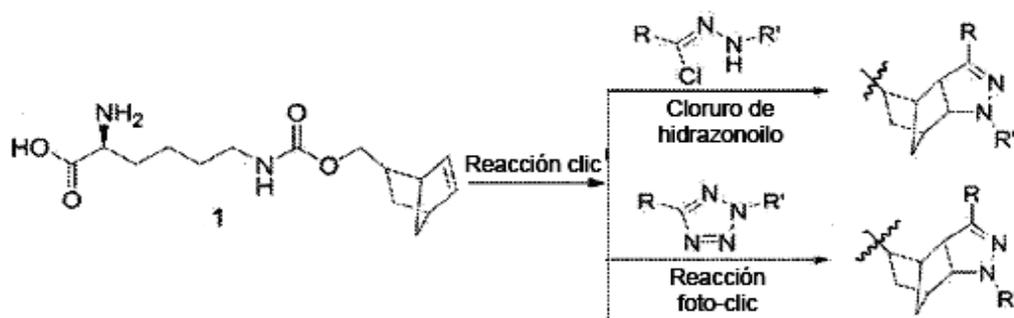
La reacción "clic" sin aditivos para la funcionalización y el acoplamiento del polímero mediante la reacción de Diels-Alder ( $DA_{inv}$ ) de demanda de electrones inversa de tetrazina y norborneno se dio a conocer por Hansell et al. (véase Hansell et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 13828-13831). El esquema general de reacción se muestra a continuación:



Otras reacciones clic sin metal ilustrativas incluyen la reacción (hetero-)Diels-Alder y la reacción de tior-eno basada en radicales, como se da a conocer por Hoyle et al., *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 1355-1387.

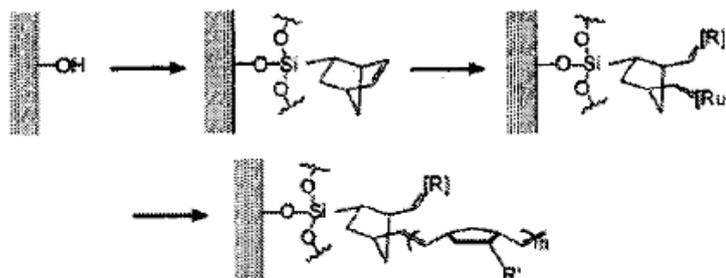
## C. Reacción de acoplamiento con tetrazoles e hidrazonas

30 Kaya et al. dieron a conocer un aminoácido norborneno (1) para la modificación de proteínas en una reacción clic sin cobre. Véase Kaya et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51,4466-4469. En el primer ejemplo, se generó una nitrilo imina mediante eliminación de HCl promovida por base a partir del cloruro de hidrazonilo y después se utilizó en una reacción de cicloadición con el derivado de norborneno (1). En el segundo ejemplo, la nitrilo imina se generó a partir de un tetrazol en una reacción fotoquímica.



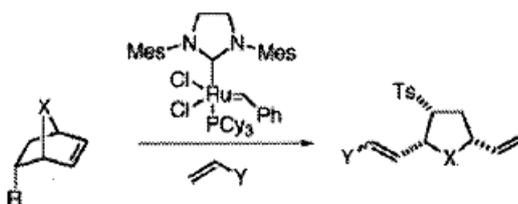
D. Reacciones de apertura de anillo con olefinas

5 Kim et al. dieron a conocer un método para hacer crecer películas delgadas de polímeros a partir de la superficie de una placa de silicio portadora de un óxido natural (Si/SiO<sub>2</sub>) utilizando una polimerización de metátesis de norborneno iniciada en la superficie. El siguiente esquema resume un procedimiento de tres etapas: (i) la formación de una monocapa autoensamblada sobre silicio que comprende grupos norbornenilo; (ii) la unión de un catalizador de rutenio [(C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>Ru=CHPh, Cy=ciclohexilo] a la superficie; y (iii) la polimerización de monómeros añadidos para generar la película. Véase Kim et al, *Macromolecules* 2000, 33, 2793-2795.



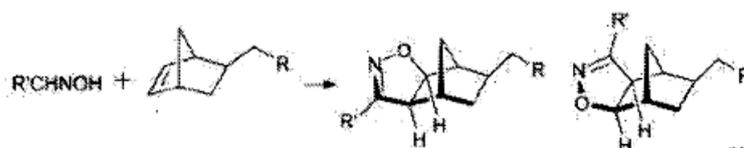
10

Del mismo modo, Liu et al. dieron a conocer las reacciones de apertura de anillo/metátesis cruzada de regiones selectivas de derivados de norborneno con olefinas ricas en electrones, catalizadas por un catalizador de rutenio, como se muestra en el siguiente esquema. Véase Liu et al., *Org. Lett.* 2005, 7, 131-133.



15 Y = sustituyente donante de electrones X = NBoc O

E. Cicloadición con Óxidos de Nitrilo



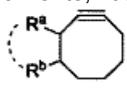
20 Gutsmedl et al. dieron a conocer los primeros ejemplos de cicloadición con óxidos de nitrilo promovida por tensión con un sustrato de ADN modificado con norborneno. El alqueno tensionado es adecuado para la cicloadición con una variedad de óxidos de nitrilo generados in situ a partir de cloruros de hidroxamilo o directamente mediante el tratamiento de la oxima original con *N*-clorosuccinimida. Véase Gutsmedl et al., *Org. Lett.* 2009, 11, 2405-2408.

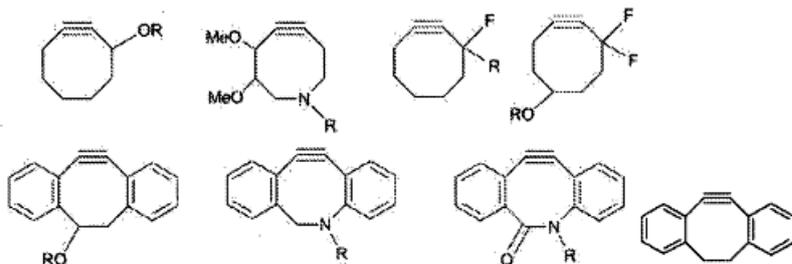
*Ciclooctino*

25 El documento de patente de EE.UU. 2012/0095203 describe compuestos de silano que tienen una cadena de carbono cíclica que incluye una función alquino para funcionalizar sustratos sólidos e inmovilizar moléculas biológicas sobre dichos sustratos.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el cicloalquino puede estar sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de entre alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alqueno(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquino(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), heteroalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), carbociclilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), carbociclilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)-alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), heterociclilo de 5-10 miembros (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), heterociclil-alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) de 5-10 miembros (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), arilo (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), aril alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), heteroarilo de 5-10 miembros (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), heteroarilalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) de 5-10 miembros (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), halo, ciano, hidroxilo, alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (es decir, éter), ariloxi, sulfhidrido (mercapto), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (p. ej., -CF<sub>3</sub>), haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (p. ej., -OCF<sub>3</sub>), alquiltio(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), ariltio, amino, aminoalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), nitro, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amida, N-amida, S-sulfonamida, N-sulfonamida, C-carboxi, O-carboxi, acilo, cianato, isocianato, tiocianato, isotiocianato, sulfinito, sulfonilo y oxo (=O).

Alternativamente, los dos sustituyentes adyacentes sobre el ciclooctino pueden formar anillos adicionales. Por

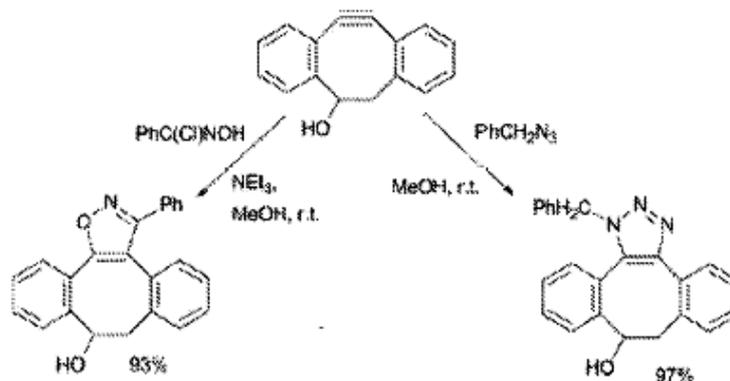
ejemplo,  representa un ciclooctino disustituido, en donde R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup>, junto con el átomo al que están unidos, se pueden unir para formar un arilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, un cicloalquilo opcionalmente sustituido o un heterociclilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, el derivado de ciclooctino puede comprender las siguientes estructuras:



La cicloadición azida-alquino promovida por tensión o la cicloadición óxido de nitrilo-alquino

Las ciclooctinas pueden experimentar una cicloadición 1,3 con azidas. Este tipo de reacción de cicloadición azida-alquino promovida por tensión (SPAAC, por sus siglas en inglés) se ha utilizado en la ligación de ADN sin cobre. Van Geel et al., han dado a conocer que se puede utilizar una variedad de octinos tensionados para etiquetar de manera eficiente las proteínas marcadas con azida. Véase R. van Geel et al., "Preventing Thiol-yne Addition Improves the Specificity of Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition," *Bioconjugate Chem.*, 2012, 23, 392-398. Trabajos similares también se han dado a conocer por Yao et al., quienes han demostrado que se pueden utilizar alquinos tensionados para unir fluoróforos a secuencias de aminoácidos. Véase Tao et al., "Fluorophore targeting to cellular proteins via enzyme-mediated azide ligation and strain-promoted cycloaddition," *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134, 3720-3728.

Estudios recientes sobre la actividad relativa de los óxidos de nitrilo, las nitronas como alternativa a los dipolos de azida en reacción con ciclooctinos, sugirieron reactividades superiores para la cicloadición alquino/óxido de nitrilo promovida por tensión. Véase Sanders et al., *J. Am. Soc. Chem.* 2011, 133, 949-957; Jawalekar et al., *Chem. Commun.* 2011, 47, 3198-3200; y McKay et al., *Chem. Commun.* 2010, 46, 931-933. Se observó que la constante de velocidad para la adición [3+2] de biciclo[6.1.0]nonino (BCN) al óxido de benzonitrilo fue mayor por un factor de 10 que la observada para la reacción correspondiente con la bencilazida. También se observaron resultados similares con la cicloadición entre dibenzocicloactinol (DIBO) y óxido de benzonitrilo (generado in situ a partir de cloruro de hidroxamilo) o bencilazida. El estudio sugiere que la primera reacción fue aproximadamente 60 veces más rápida que la última.

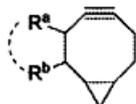


### Biciclononinos

- 5 En algunas realizaciones, los cicloalquinos pueden comprender un sistema de anillos bicíclico, por ejemplo, biciclononinos. En algunas realizaciones, los biciclononinos se pueden seleccionar de biciclo[6.1.0]non-4-ino o derivados de ellos. En algunas otras realizaciones, los biciclononinos también se pueden seleccionar entre biciclo[6.1.0]non-2-ino o biciclo[6.1.0]non-3-ino.

- 10 En algunas realizaciones, los biciclononinos pueden estar sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alqueno(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquino(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), heteroalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), carbociclilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), carbocicli(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)-alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), heterociclilo de 5-10 miembros (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)) y heterocicli(C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub>)-alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), arilo (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), aril alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), heteroarilo de 5-10 miembros (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), heteroarilalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) de 5-10 miembros (opcionalmente sustituido con halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), halo, ciano, hidroxilo, alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (es decir, éter), arilo, sulfhidrido (mercapto), haloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (p. ej., -CF<sub>3</sub>), haloalcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (p. ej., -OCF<sub>3</sub>), alquiltio C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, ariltio, amino, aminoalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), nitro, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amida, N-amida, S-sulfonamida, N-sulfonamida, C-carboxi, O-carboxi, acilo, cianato, isocianato, tiocianato, isotiocianato, sulfinilo, sulfonilo y oxo (=O).

Alternativamente, los dos sustituyentes adyacentes sobre un biciclononino pueden formar anillos adicionales. Por



- 25 ejemplo, representa un biciclo[6.1.0]non-4-ino disustituido, en donde R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup>, junto con el átomo al que están unidos, se pueden unir para formar un arilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, un cicloalquilo opcionalmente sustituido o un heterociclilo opcionalmente sustituido. Los biciclononinos pueden experimentar una cicloadición con alquino similar a SPAAC con azidas u óxidos de nitrilo como se describió anteriormente con respecto a ciclooctino debido a la tensión en el sistema de anillos bicíclicos.

### Hidrogeles

- 30 Algunas realizaciones descritas en la presente memoria incluyen la inmovilización de un hidrogel funcionalizado a una superficie de un sustrato a través de restos insaturados del silano funcionalizado o derivados de silano. En la presente memoria se describen ejemplos no limitantes de hidrogeles que se pueden utilizar.

- 35 El documento WO 00/31148 describe hidrogeles de poli(acrilamida) y matrices basadas en hidrogel de poli(acrilamida) en las que se forma el denominado prepolímero de poli(acrilamida), preferiblemente a partir de acrilamida y un ácido acrílico o un derivado de ácido acrílico que contiene un grupo vinilo. La reticulación del prepolímero puede verse afectada. Los hidrogeles así producidos están soportados sobre un sólido, preferiblemente sobre vidrio. También se puede efectuar la funcionalización del hidrogel soportado sobre un sólido.

- 40 El documento WO 01/01143 describe una tecnología similar al documento WO00/31148, pero difiere en que el hidrogel porta una funcionalidad capaz de participar en una reacción de fotocicloadición [2+2] con una biomolécula para formar matrices inmovilizadas de dichas biomoléculas. La dimetilmaleimida (DM1) es una funcionalidad particularmente preferida. El uso de reacciones de fotocicloadición [2+2], en el contexto de la tecnología de micromatriz basada en poli(acrilamida) también se describe en los documentos WO02/12566 y WO03/014392.

La patente de EE.UU. nº 6.465.178 describe el uso de composiciones de reactivos para proporcionar portaobjetos activados para uso en la preparación de micromatrices de ácidos nucleicos; las composiciones de reactivos incluyen copolímeros de acrilamida. Se afirma que los portaobjetos activados están particularmente bien adaptados para reemplazar los portaobjetos de vidrio convencionales (p. ej., sililados) en la preparación de micromatrices.

El documento WO 00/53812 describe la preparación de matrices de hidrogel de ADN basadas en poliacrilamida y el uso de estas matrices en la réplica de amplificación.

Una vez que se han formado los hidrogeles, las moléculas se pueden unir a ellos para producir matrices moleculares, si se desea. La unión se ha efectuado de diferentes maneras en el estado de la técnica. Por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.372.813 enseña la inmovilización de polinucleótidos portadores de grupos de dimetilmaleimida a los hidrogeles producidos los cuales portan grupos de dimetilmaleimida mediante la realización de una etapa de fotocicloaddición [2+2] entre dos grupos de dimetilmaleimida uno unido al polinucleótido para ser inmovilizado y otro colgando del hidrogel.

Cuando se forma la matriz molecular después de la generación del hidrogel, se han empleado dos estrategias para lograr este fin. En primer lugar, el hidrogel se puede modificar químicamente después de producirse. Los problemas con este enfoque incluyen una baja eficiencia general en la preparación de la matriz y la baja estabilidad relacionada con la química de unión, en particular al exponerse a altas temperaturas, a soluciones iónicas y a múltiples etapas de lavado.

Una alternativa más común es efectuar la polimerización con un comonomero que tiene una funcionalidad cebada o preactivada para reaccionar con las moléculas que se van a disponer en la matriz.

Las alternativas a la formación inicial de hidrogeles seguidas de la posterior disposición de moléculas en la matriz del mismo se han descrito en la técnica anterior, en la que la matriz se forma al mismo tiempo que se produce el hidrogel. Esto se puede efectuar, por ejemplo, mediante copolimerización directa de polinucleótidos modificados con acrilamida. Un ejemplo de este enfoque se describe en el documento WO0 1/62982 en el que los polinucleótidos modificados con acrilamida se mezclan con soluciones de acrilamida y la polimerización se efectúa directamente.

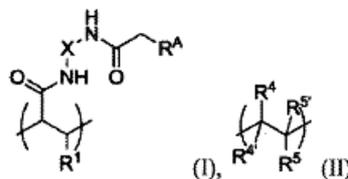
Mosaic Technologies (Boston, Massachusetts, EE. UU.) producen ACRYDITE™ (una acrilamida fosforamida) que se puede hacer reaccionar con polinucleótidos antes de la copolimerización del monómero resultante con acrilamida.

Efimov et al. (Nucleic Acids Research, 1999, 27 (22), 4416-4426) describen un ejemplo adicional de una formación simultánea de hidrogel/matriz en la que se ve afectada la copolimerización de acrilamida, de los derivados de ácido acrílico reactivos y de los polinucleótidos modificados que tienen grupos acrilamida en los extremos 5'- o 3'-.

#### Polímeros

Algunas realizaciones descritas en la presente memoria incluyen la inmovilización de un polímero funcionalizado en una superficie de un sustrato a través de cicloaleno o silano funcionalizado con heterocicloalqueno o derivados de silano. Los ejemplos no limitantes de los polímeros que se pueden utilizar en la presente solicitud se describen en la patente de EE.UU. nº de serie 13/784.368 y la patente de EE.UU. nº de publicación 2011/0059865, que se incorporan en la presente memoria por referencias en su totalidad.

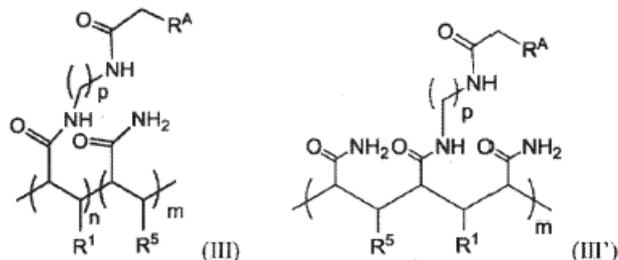
En algunas realizaciones, el polímero utilizado en la presente memoria comprende una unidad recurrente de Fórmula (I) y una unidad recurrente de Fórmula (II):



en donde: R<sup>1</sup> es H o alquilo; R<sup>A</sup> se selecciona del grupo que consiste en azido, amino opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, hidrazona opcionalmente sustituida, hidrazina opcionalmente sustituida, carboxilo, hidroxilo, tetrazol opcionalmente sustituido, tetrazina opcionalmente sustituida y tiol; X es un conector de alqueno opcionalmente sustituido o un conector de heteroalqueno opcionalmente sustituido; R<sup>4</sup>, R<sup>4'</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>5'</sup> se seleccionan cada uno independientemente de H, R<sup>6</sup>, OR<sup>6</sup>, -C(O)OR<sup>6</sup>, -C(O)R<sup>6</sup>, -OC(O)R<sup>6</sup>, -C(O)NR<sup>7</sup>R<sup>8</sup>, o NR<sup>7</sup>R<sup>8</sup>; R<sup>6</sup> se selecciona independientemente de H, OH, alquilo, cicloalquilo, hidroxialquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo o variantes opcionalmente sustituidas de ellos; R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> se seleccionan cada uno independientemente de H o alquilo, o R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> se unen entre sí con el átomo o los átomos a los que están unidos para formar un heterociclo.

En algunas realizaciones, R<sup>A</sup> es azida. En algunas realizaciones, X es un conector de alqueno opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es hidrógeno. En algunas otras realizaciones, R<sup>1</sup> es metilo. En algunas realizaciones, R<sup>4</sup> es hidrógeno y R<sup>4'</sup> es -C(O)NR<sup>7</sup>R<sup>8</sup>. En algunas realizaciones, cada uno de R<sup>5</sup> y R<sup>5'</sup> es hidrógeno. En algunas realizaciones, R<sup>5</sup> es hidrógeno y R<sup>5'</sup> es metilo.

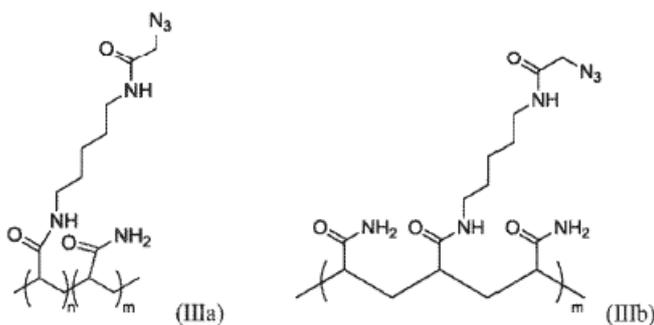
En alguna realización, el polímero utilizado en la presente memoria comprende un polímero de Fórmula (III) o (III'):



5 en donde R<sup>1</sup> se selecciona de H o alquilo opcionalmente sustituido; R<sup>A</sup> se selecciona del grupo que consiste en  
 10 azida, amino opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, hidrazona opcionalmente sustituida,  
 hidrazina opcionalmente sustituida, carboxilo, hidroxilo, tetrazol opcionalmente sustituido, tetrazina opcionalmente  
 sustituida y tiol; cada uno de los -(CH<sub>2</sub>)-p puede estar opcionalmente sustituido; p es un número entero en el  
 intervalo de 1-50; R<sup>5</sup> se selecciona de H o alquilo opcionalmente sustituido; n es un número entero en el intervalo de  
 1 a 50.000; y m es un número entero en el intervalo de 1 a 100.000. En algunas realizaciones, p es 5. En algunas  
 realizaciones, R<sup>A</sup> es azida.

**PAZAM**

En una realización, el polímero de Fórmula (III) o (III') está también representado por la Fórmula (IIIa) o (IIIb):



en donde n es un número entero en el intervalo de 1-20.000, y m es un número entero en el intervalo de 1-100.000.

15 En algunas realizaciones, la molécula funcionalizada utilizada para la conjugación directa es poli(N-(5-  
 azidoacetamidilpentil)acrilamida-coacrilamida) (PAZAM). En algunas realizaciones, PAZAM es un polímero lineal. En  
 algunas otras realizaciones, PAZAM es un polímero ligeramente reticulado. En algunas realizaciones, PAZAM se  
 aplica a la superficie como una solución acuosa. En algunas otras realizaciones, PAZAM se aplica a la superficie  
 20 como una solución acuosa con uno o más aditivos disolventes, tal como el etanol. El método para la preparación de  
 diferentes polímeros PAZAM se discute en detalle en la patente de EE.UU. n° de serie 13/784,368.

**Sustratos**

En algunas realizaciones, los sustratos utilizados en la presente solicitud incluyen sustratos a base de sílice, tales  
 como vidrio, sílice fundida y otros materiales que contienen sílice. En algunas realizaciones, los sustratos a base de  
 sílice también pueden ser silicio, dióxido de silicio, nitruro de silicio, hidruros de silicona. En algunas realizaciones,  
 25 los sustratos utilizados en la presente solicitud incluyen materiales plásticos tales como polietileno, poliestireno,  
 poli(cloruro de vinilo), polipropileno, nylons, poliésteres, policarbonatos y poli(metacrilato de metilo). Los materiales  
 plásticos preferidos son poli(metacrilato de metilo), poliestireno y sustratos poliméricos de olefina cíclica. En algunas  
 realizaciones, el sustrato es un material a base de sílice o material plástico. En una realización, el sustrato tiene al  
 menos una superficie que comprende vidrio.

30 En algunas otras realizaciones, los sustratos pueden ser un metal. En algunas de tales realizaciones, el metal es  
 oro. En algunas realizaciones, el sustrato tiene al menos una superficie que comprende un óxido metálico. En una  
 realización, la superficie comprende un óxido de tantalio.

También se puede utilizar acrilamida, enona o acrilato como material de sustrato. Otros materiales de sustrato  
 pueden incluir, pero no se limitan a arseniuro de galio, fosfuro de indio, aluminio, cerámica, poliamida, cuarzo,  
 35 resinas, polímeros y copolímeros. Las listas anteriores pretenden ser ilustrativas, pero no se limitan a la presente  
 solicitud.

En algunas realizaciones, el sustrato y/o la superficie del sustrato pueden ser cuarzo. En algunas otras  
 realizaciones, el sustrato y/o la superficie del sustrato puede ser semiconductor, es decir, GaAs o ITO.

Los sustratos pueden comprender un solo material o una pluralidad de materiales diferentes. Los sustratos pueden ser materiales compuestos o laminados. El sustrato puede ser plano, redondo, texturizado y con patrón. Los patrones se pueden formar, por ejemplo, mediante almohadillas de metal que forman características sobre superficies no metálicas, por ejemplo, como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 13/661.524. Otra superficie con patrón útil es aquella que tiene características de pocillo formadas sobre una superficie, por ejemplo, como se describe en la Patente de EE.UU. nº de serie 13/787.396, solicitud de patente de EE.UU. nº de publicación 2011/0172118 A1 o la Patente de EE.UU. nº 7.622.294. Para las realizaciones que utilizan un sustrato con patrón, se puede unir un gel selectivamente a las características del patrón (p. ej., el gel se puede unir a las almohadillas de metal o el gel se puede unir al interior de los pocillos) o, alternativamente, el gel se puede unir uniformemente a través de las características del patrón y a las regiones intersticiales.

Las ventajas en el uso de sustratos a base de plástico en la preparación y el uso de matrices moleculares incluyen el coste: la preparación de sustratos a base de plástico apropiados mediante, por ejemplo, moldeo por inyección, es generalmente más barata que la preparación, p. ej., por decapado y unión, de sustratos a base de sílice. Otra ventaja es la variedad casi ilimitada de plásticos que permiten el ajuste fino de las propiedades ópticas del soporte para adaptarse a la aplicación para la cual está destinado o para el que se puede colocar.

Cuando se utilizan metales como sustratos o como almohadillas sobre un sustrato, esto se puede deber a la aplicación deseada: la conductividad de los metales puede permitir la modulación del campo eléctrico en sensores basados en ADN. De esta manera, la discriminación de la falta de coincidencia de ADN se puede mejorar, la orientación de las moléculas de oligonucleótidos inmovilizadas se puede ver afectada, o la cinética de hibridación de ADN se puede acelerar.

Preferiblemente, el sustrato está basado en sílice, pero la forma del sustrato empleado puede variar de acuerdo con la aplicación para la cual se practica la presente solicitud. En general, sin embargo, los portaobjetos de material de soporte, tal como sílice, p. ej. sílice fundida, son de particular utilidad en la preparación y posterior integración de moléculas. De particular utilidad en la práctica de la presente solicitud los portaobjetos de sílice fundida son vendidos bajo el nombre comercial SPECTRASIL™. No obstante, será evidente para el experto en la técnica que la presente aplicación es igualmente aplicable a otras presentaciones de sustrato (que incluye soportes a base de sílice), tales como perlas, varillas y similares.

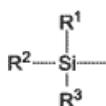
En algunas realizaciones, la superficie del sustrato comprende tanto regiones recubiertas con moléculas funcionales como regiones inertes sin recubrimientos. En algunas de tales realizaciones, los recubrimientos de moléculas funcionalizadas son recubrimientos de hidrogel o polímero. Las regiones recubiertas de moléculas funcionales pueden comprender sitios reactivos y, por lo tanto, se pueden utilizar para unir moléculas a través de enlaces químicos u otras interacciones moleculares. En algunas realizaciones, las regiones recubiertas de moléculas funcionales (p. ej., características reactivas, almohadillas, perlas o pocillos) y las regiones inertes (referidas como regiones intersticiales) se pueden alternar para formar un patrón o una cuadrícula. Tales patrones pueden estar en una o dos dimensiones. En algunas realizaciones, las regiones inertes se pueden seleccionar de regiones de vidrio, regiones metálicas, regiones de máscara o regiones intersticiales. Alternativamente, estos materiales pueden formar regiones reactivas. La inercia o reactividad dependerá de la química y los métodos utilizados, sobre el sustrato. En una realización, la superficie comprende regiones de vidrio. En otra realización, la superficie comprende regiones de metal. En otra realización más, la superficie comprende regiones de máscara. En algunas realizaciones de las composiciones descritas en la presente memoria, el sustrato puede ser una perla. Los materiales de sustrato ilustrativos no limitantes que se pueden recubrir con un polímero de la presente descripción o que se pueden utilizar de otro modo en una composición o método expuesto en la presente memoria se describen en la patente de EE.UU. nº de serie 13/492.661 y 13/661.524.

En algunas realizaciones, un sustrato descrito en la presente memoria forma parte al menos de una celda de flujo o está localizado en una celda de flujo. En algunas de tales realizaciones, las celdas de flujo comprenden además polinucleótidos unidos a la superficie del sustrato a través del recubrimiento de moléculas funcionales, por ejemplo, un recubrimiento de polímeros. En algunas realizaciones, los polinucleótidos están presentes en las celdas de flujo en agrupaciones de polinucleótidos, en donde los polinucleótidos de las agrupaciones de polinucleótidos están unidos a una superficie de la celda de flujo a través del recubrimiento de polímeros. En tales realizaciones, la superficie del cuerpo de la celda de flujo al que están unidos los polinucleótidos se considera el sustrato. En otras realizaciones, un sustrato separado que tiene una superficie recubierta con polímero se inserta en el cuerpo de la celda de flujo. En realizaciones preferidas, la celda de flujo es una cámara de flujo que se divide en una pluralidad de carriles o una pluralidad de sectores, en donde una o más de la pluralidad de carriles o pluralidad de sectores comprende una superficie que está recubierta con un recubrimiento de polímeros unido covalentemente descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones de las celdas de flujo descritas en la presente memoria, los polinucleótidos unidos dentro de una única agrupación de polinucleótidos tienen la misma secuencia de nucleótidos o una similar. En algunas realizaciones de las celdas de flujo descritas en la presente memoria, los polinucleótidos unidos de diferentes agrupaciones de polinucleótidos tienen secuencias de nucleótidos diferentes o no similares. Los ejemplos de celdas de flujo y sustratos para la fabricación de celdas de flujo que se pueden utilizar en el método o la composición expuesta en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a los disponibles comercialmente en Illumina, Inc. (San Diego, CA) o a los descritos en el documento de patente de EE. UU. 2010/0111768 A1 o 2012/0270305.

*Sustrato a base de sílice*

En algunas realizaciones, los sustratos utilizados en la presente aplicación son sustratos a base de sílice. En general, la superficie del sustrato a base de sílice se modifica químicamente de alguna manera para unirse covalentemente a un grupo químicamente reactivo capaz de reaccionar con las moléculas funcionalizadas, por ejemplo, hidrogel, polímero o un hidrogel parcialmente formado (p. ej., un prepolímero (PRP)). El agente activador de la superficie es típicamente un compuesto de organosilano. En una realización, el agente activador de la superficie es el  $\gamma$ -metacriloxipropiltrimetoxisilano, conocido como "Bind Silane" o "Crosslink Silane" y disponible comercialmente en Pharmacia, aunque también se conocen otros agentes activadores de la superficie basados en silicio, tales como monoetoxidimetilsililbutanal, 3-mercaptopropil-trimetoxisilano y 3-aminopropiltrimetoxisilano (todos disponibles en Aldrich). De esta manera, los grupos funcionales colgados tales como grupos amino, grupos aldehído o grupos polimerizables (p. ej., olefinas) se pueden unir a la sílice.

La presente solicitud emplea compuestos de organosilano que comprenden cicloalquenos o heterocicloalquenos unidos covalentemente. En algunas realizaciones, el cicloalqueno es un norborneno opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, la parte silano de los compuestos de organosilano tiene la siguiente estructura:



en donde  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$  se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, halógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, ariloxi opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido o heteroariloxi opcionalmente sustituido. En algunas de tales realizaciones,  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$  son independientemente alcoxi opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones adicionales, cada uno de  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$  es metoxi. En una realización, el compuesto de organosilano es [(5-biciclo[2.2.1]hept-2-enil)etil]trimetoxisilano.

*Conector*

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el conector entre el silano o derivado de silano y el cicloalqueno o heterocicloalqueno se selecciona de un alquileo opcionalmente sustituido, un heteroalquileo opcionalmente sustituido, un cicloalquileo opcionalmente sustituido, un heterociclieno opcionalmente sustituido, un arileno opcionalmente sustituido, un heteroarileno opcionalmente sustituido, un polietilenglicol opcionalmente sustituido, un conector escindible, o combinaciones de ellos.

En algunas realizaciones, el conector descrito en la presente memoria es un conector de alquileo opcionalmente sustituido. En alguna realización, el conector es  $-(\text{CH}_2)_n-$ , en donde  $n$  se selecciona de 1 a 20.000. En una realización,  $n$  es 2. En algunas otras realizaciones, el conector descrito en la presente memoria es un conector de heteroalquileo opcionalmente sustituido. Por ejemplo, el conector es  $-(\text{CH}_2)_n-$ , donde  $n$  se selecciona de 1 a 20.000, y uno o más de los átomos de carbono en el esqueleto se reemplazan por uno o más heteroátomos seleccionados de O, S, N o P.

En algunas realizaciones, el conector descrito en la presente memoria es un conector escindible. En algunas realizaciones, el conector se selecciona entre conectores lábiles ácidos (que incluyen conectores dialcoxibencilo, conectores Sieber, conectores indol, conectores Siber t-butilo), conectores escindibles electrofílicamente, conectores escindibles nucleofílicamente, conectores fotoescindibles, escisión bajo condiciones reductoras, condiciones oxidativas, escisión a través del uso de conectores de seguridad, y escisión por mecanismos de eliminación. En algunas de tales realizaciones,  $\text{L}^A$  se selecciona de un conector disulfuro (-S-S-), éster, nitrobenzono, imina, péptido y polinucleótido escindibles enzimática o químicamente, tal como el ADN.

Los conectores escindibles son conocidos en la técnica, y la química convencional se puede aplicar para unir un conector a una base de nucleótido y una etiqueta. El conector se puede escindir por cualquier método adecuado, que incluye la exposición a ácidos, bases, nucleófilos, electrófilos, radicales, metales, agentes reductores u oxidantes, luz, temperatura, enzimas, etc. El conector como se discute en la presente memoria también se puede escindir con el mismo catalizador utilizado para escindir el enlace del grupo protector-O del extremo 3'. Los conectores adecuados se pueden adaptar a partir de los grupos protectores químicos estándar, como se describe en Greene & Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons., o en Greg T. Hermanson "Bioconjugate Techniques", Academic Press. Otros conectores escindibles adecuados utilizados en la síntesis de fase sólida se describen en Guillier *et al.* (*Chem. Rev.* 100:2092-2157,2000).

El uso del término "conector escindible" no pretende implicar que se requiere que todo el conector se elimine, p. ej., del heterociclo reactivo. Como ejemplo, el sitio de escisión se puede localizar en una posición sobre el conector que asegure que parte del conector permanezca unido al heterociclo después de la escisión.

## A. Conectores escindidos electrofílicamente

Los conectores escindidos electrofílicamente se escinden típicamente por protones e incluyen escisiones sensibles a los ácidos. Los conectores adecuados incluyen los sistemas bencílicos modificados tales como tritilo, ésteres de p-alcoixibencilo y amidas de p-alcoixibencilo. Otros conectores adecuados incluyen grupos de terc-butiloxicarbonilo (Boc) y el sistema acetal.

El uso de metales tiofílicos, tales como níquel, plata o mercurio, en la escisión del tioacetal u otros grupos protectores que contienen azufre también se puede considerar para la preparación de moléculas enlazadoras adecuadas.

## B. Conectores escindidos nucleofílicamente

La escisión nucleofílica también es un método bien reconocido en la preparación de moléculas conectoras. Se pueden utilizar grupos tales como ésteres que son lábiles en agua (es decir, se pueden escindir simplemente a un pH básico) y grupos que son lábiles a nucleófilos no acuosos. Los iones de fluoruro se pueden utilizar para escindir enlaces de silicio-oxígeno en grupos tales como triisopropilsilano (TIPS) o t-butildimetilsilano (TBDMS).

## C. Conectores fotoescindibles

Los conectores fotoescindibles se han utilizado ampliamente en la química de los carbohidratos. Es preferible que la luz requerida para activar la escisión no afecte a los otros componentes de los nucleótidos modificados. Por ejemplo, si se utiliza un fluoróforo como etiqueta, es preferible que absorba la luz de una longitud de onda diferente a la requerida para escindir la molécula conectora. Los conectores adecuados incluyen aquellos basados en compuestos de O-nitrobencilo y compuestos de nitroveratrilo. También se pueden utilizar conectores basados en la química de la benzoína (Lee *et al.*, *J. Org. Chem.* 64:3454-3460, 1999).

## D. Escisión bajo condiciones reductoras

Existen muchos conectores conocidos que son susceptibles de escisión reductora. La hidrogenación catalítica utilizando catalizadores a base de paladio se ha utilizado para escindir los grupos bencilo y benciloxicarbonilo. La reducción de enlaces disulfuro también se conoce en la técnica.

## E. Escisión bajo condiciones oxidativas

Los enfoques basados en la oxidación son bien conocidos en la técnica. Estos incluyen la oxidación de los grupos p-alcoixibencilo y la oxidación de los conectores de azufre y selenio. El uso de yodo acuoso para escindir disulfuros y otros conectores a base de azufre o selenio también está dentro del alcance de la presente solicitud.

## F. Conectores de seguridad

Los conectores de seguridad son aquellos que se escinden en dos etapas. En un sistema preferido, la primera etapa es la generación de un centro nucleofílico reactivo seguido de una segunda etapa que supone una ciclación intramolecular que da como resultado la escisión. Por ejemplo, los enlaces éster levulínicos se pueden tratar con hidrazina o fotoquímica para liberar una amina activa, que después se puede ciclar para escindir un éster en otra parte de la molécula (Burgess *et al.*, *J. Org. Chem.* 62:5165-5168, 1997).

## G. Mecanismos de eliminación por escisión

Las reacciones de eliminación también se pueden utilizar. Por ejemplo, se puede utilizar la eliminación catalizada por bases de grupos tales como Fmoc y cianoetilo, y la eliminación reductora catalizada por paladio de los sistemas alílicos.

En algunas realizaciones, el conector puede comprender una unidad espaciadora. Otros conectores escindibles adecuados ilustrativos se discuten en detalle en el documento de patente EE.UU. nº de publicación 2006-0188901.

## Aplicación de secuenciación

Un método expuesto en la presente memoria puede utilizar cualquiera de una variedad de técnicas de amplificación. Las técnicas ilustrativas que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), amplificación por círculo rodante (RCA, por sus siglas en inglés), amplificación de desplazamiento múltiple (MDA, por sus siglas en inglés) o amplificación aleatoria de cebadores (RPA, por sus siglas en inglés). En realizaciones particulares, uno o más cebadores utilizados para la amplificación se pueden unir a un recubrimiento de polímeros. En realizaciones de PCR, uno o ambos de los cebadores utilizados para la amplificación se pueden unir a un recubrimiento de polímeros. Los formatos que utilizan dos especies de cebadores unidos a menudo se denominan amplificación por puentes porque los amplicones de doble cadena forman una estructura similar a un puente entre los dos cebadores unidos que flanquean la secuencia molde que se ha copiado. Los reactivos ilustrativos y condiciones que se pueden utilizar para la amplificación por puentes se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. nº 5.641.658; Patente de EE.UU. nº de publicación 2002/0055100; Patente de

EE.UU. nº 7.115.400; Patente de EE.UU. nº de publicación 2004/0096853; Patente de EE.UU. nº de publicación 2004/0002090; Patente de EE.UU. nº de publicación 2007/0128624; y la Patentes de EE.UU. nº de publicación 2008/0009420. La amplificación por PCR también se puede llevar a cabo con uno de los cebadores de amplificación unido a un recubrimiento de polímeros y al segundo cebador en solución. Un formato ilustrativo que utiliza una combinación de un cebador unido y un cebador soluble es la PCR en emulsión como se describe, por ejemplo, en Dressman et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA* 100: 8817-8822 (2003), en el documento WO 05/010145, o en la Patente de EE.UU. nº de publicación 2005/0130173 ó 2005/0064460. La PCR en emulsión es ilustrativa del formato y se entenderá que para los fines de los métodos expuestos en la presente memoria, el uso de una emulsión es opcional y, de hecho, para varias realizaciones, no se utiliza una emulsión. Además, los cebadores no necesitan estar unidos directamente al sustrato o soportes sólidos como se expone en las referencias de ePCR y, en cambio, se pueden unir a un recubrimiento de polímeros como se expone en la presente memoria.

Las técnicas de RCA se pueden modificar para uso en un método de la presente descripción. Los componentes ilustrativos que se pueden utilizar en una reacción de RCA y los principios por los cuales la RCA produce amplicones se describen, por ejemplo, en Lizardi et al., *Nat. Gineta.* 19: 225-232 (1998) y en el documento de patente de EE.UU. 2007/0099208 A1. Los cebadores utilizados para la RCA pueden estar en solución o unidos a un recubrimiento de polímeros.

Las técnicas de MDA se pueden modificar para su uso en un método de la presente descripción. Algunos principios básicos y condiciones útiles para la MDA se describen, por ejemplo, en Dean et al., *Proc Natl. Acad Sci. USA* 99: 5261 -66 (2002); Lage et al., *Genome Research* 13: 294-307 (2003); Walker et al., *Molecular Methods for Virus Detection*, Academic Press, Inc., 1995; Walker et al., *Nucl. Acids Res.* 20:1691-96 (1992); en el documento de patente de EE.UU. 5.455.166; en el documento de patente de EE.UU. 5.130.238; y en el documento de patente de EE.UU. 6.214.587. Los cebadores utilizados para la MDA pueden estar en solución o unidos a un recubrimiento de polímeros.

En realizaciones particulares, se puede utilizar una combinación de las técnicas de amplificación ejemplificadas anteriormente. Por ejemplo, RCA y MDA se pueden utilizar en una combinación en donde RCA se utiliza para generar un amplicón concatamérico en solución (p. ej., utilizando cebadores en fase de disolución). El amplicón se puede utilizar después como molde para la MDA utilizando cebadores que se unen a un recubrimiento de polímeros. En este ejemplo, los amplicones producidos después de las etapas combinadas de RCA y MDA se unirán al recubrimiento de polímeros.

En algunas realizaciones, el hidrogel funcionalizado o sustrato recubierto con polímero descrito en la presente memoria se puede utilizar para determinar una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido. En tales realizaciones, el método puede comprender las etapas de (a) poner en contacto una polinucleótido polimerasa con agrupaciones de polinucleótidos unidos a una superficie de un sustrato a través de cualquiera de los recubrimientos de polímero o de hidrogel descritos en la presente memoria; (b) proporcionar nucleótidos a la superficie recubierta con polímero del sustrato de manera que se genere una señal detectable cuando la polinucleótido polimerasa utiliza uno o más nucleótidos; (c) detectar señales en una o más agrupaciones de polinucleótidos; y (d) repetir las etapas (b) y (e), determinando así una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido presente en una o más agrupaciones de polinucleótidos.

La secuenciación de ácidos nucleicos se puede utilizar para determinar una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido mediante diversos métodos conocidos en la técnica. En un método preferido, la secuenciación por síntesis (SBS) se utiliza para determinar una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido unido a una superficie de un sustrato a través de cualquiera de los recubrimientos de polímeros descritos en la presente memoria. En dicho método, se proporcionan uno o más nucleótidos a un polinucleótido molde que está asociado con una polinucleótido polimerasa. La polinucleótido polimerasa incorpora uno o más nucleótidos en una cadena de ácido nucleico recién sintetizada que es complementaria al polinucleótido molde. La síntesis se inicia a partir de un cebador oligonucleotídico que es complementario a una parte del polinucleótido molde o a una parte de un ácido nucleico universal o no variable que está unido covalentemente a un extremo del polinucleótido molde. A medida que se incorporan los nucleótidos contra el polinucleótido molde, se genera una señal detectable que permite determinar qué nucleótido se ha incorporado durante cada etapa del método de secuenciación. De esta manera, se puede generar la secuencia de un ácido nucleico complementario de al menos una parte del polinucleótido molde, permitiendo de este modo la determinación de la secuencia de nucleótidos de al menos una parte del polinucleótido molde. Las celdas de flujo proporcionan un formato conveniente para albergar una matriz que se produce mediante los métodos de la presente descripción y que se somete a una secuenciación por síntesis (SBS) u otra técnica de detección que involucra la liberación repetida de reactivos en ciclos. Por ejemplo, para iniciar un primer ciclo de SBS, uno o más nucleótidos marcados, ADN polimerasa, etc., pueden fluir hacia/a través de una celda de flujo que alberga una matriz de ácido nucleico realizada por los métodos expuestos en la presente memoria. Esos sitios de una matriz donde la extensión del cebador hace que se incorpore un nucleótido marcado se pueden detectar. Opcionalmente, los nucleótidos pueden incluir además una propiedad de terminación reversible que termina una extensión del cebador adicional una vez que se ha añadido un nucleótido a un cebador. Por ejemplo, un análogo de nucleótido que tiene una parte terminadora reversible se puede añadir a un cebador de tal manera que la extensión subsiguiente no pueda ocurrir hasta que se libere un agente de desbloqueo para retirar la parte. Por lo tanto, para las realizaciones que utilizan una terminación reversible, se puede liberar un reactivo de desbloqueo a la celda de

flujo (antes o después de que se produzca la detección). Los lavados se pueden realizar entre las distintas etapas de liberación. El ciclo se puede repetir n veces para extender el cebador mediante n nucleótidos, detectando así una secuencia de longitud n. Los procedimientos SBS, sistemas fluidicos y plataformas de detección ilustrativas que se pueden adaptar fácilmente para uso con una matriz producida por los métodos de la presente descripción se describen, por ejemplo, en Bentley et al., *Nature* 456:53-59 (2008), el documento WO 04/018497; el documento de patente de EE.UU. 7.057.026; el documento WO 91/06678; el documento WO 07/123744; el documento de patente de EE.UU. 7.329.492; el documento de patente de EE.UU. 7.211.414; el documento de patente de EE.UU. 7.315.019; el documento de patente de EE.UU. 7.405.281, y el documento de patente de EE.UU. 2008/0108082.

Se pueden utilizar otros procedimientos de secuenciación que utilizan reacciones cíclicas, tal como la pirosecuenciación. La pirosecuenciación detecta la liberación de pirofosfato inorgánico (PPi) a medida que se incorporan nucleótidos particulares a una cadena de ácido nucleico naciente (Ronaghi, et al., *Analytical Biochemistry* 242(1), 84-9 (1996); Ronaghi, *Genome Res.* 11(1), 3-11 (2001); Ronaghi et al. *Science* 281(5375), 363 (1998); el documento de patente de EE.UU. 6.210.891; el documento de patente de EE.UU. 6.258.568 y el documento de patente de EE.UU. 6.274.320.

En la pirosecuenciación, el PPi liberado se puede detectar convirtiéndose inmediatamente en trifosfato de adenosina (ATP) por la ATP sulfurilasa, y el nivel de ATP generado se puede detectar a través de fotones producidos por la luciferasa. Por lo tanto, la reacción de secuenciación se puede monitorizar a través de un sistema de detección de luminiscencia. Las fuentes de radiación de excitación utilizadas para los sistemas de detección basados en fluorescencia no son necesarias para los procedimientos de pirosecuenciación. Sistemas fluidicos útiles, detectores y procedimientos que se pueden utilizar para la aplicación de pirosecuenciación a matrices de la presente descripción se describen, por ejemplo, en el documento WO 12/058096 A1, en el documento de patente de EE.UU. 2005/0191698 A1, en el documento de patente de EE.UU. 7.595.883 y en el documento de patente de EE.UU. 7.244.559.

Las reacciones de secuenciación por ligación también son útiles, incluidas, por ejemplo, las descritas en Shendure et al. *Science* 309:1728-1732 (2005); en el documento de patente de EE.UU. 5.599.675; y en el documento de patente de EE.UU. 5.750.341, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria mediante referencias en su totalidad. Algunas realizaciones pueden incluir procedimientos de secuenciación por hibridación, como se describe, por ejemplo, en Bains et al, *Journal of Theoretical Biology* 135(3), 303-7 (1988); Drmanac et al., *Nature Biotechnology* 16, 54-58 (1998); Fodor et al., *Science* 251(4995), 767-773 (1995); y el documento WO 1989/10977. Tanto en los procedimientos de secuenciación por ligación como de secuenciación por hibridación, los ácidos nucleicos que están presentes en los sitios de una matriz se someten a ciclos repetidos de liberación y detección de oligonucleótidos. Los sistemas fluidicos para los métodos de SBS como se exponen en la presente memoria o en las referencias citadas en la presente memoria se pueden adaptar fácilmente para la liberación de reactivos para procedimientos de secuenciación por ligación o de secuenciación por hibridación. Típicamente, los oligonucleótidos están marcados de manera fluorescente y se pueden detectar utilizando detectores de fluorescencia similares a los descritos con respecto a los procedimientos de SBS en la presente memoria o en las referencias citadas en la presente memoria.

Algunas realizaciones pueden utilizar métodos que involucran la monitorización en tiempo real de la actividad de la ADN polimerasa. Por ejemplo, las incorporaciones de nucleótidos se pueden detectar a través de las interacciones de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, por sus siglas en inglés) entre una polimerasa portadora de fluoróforos y nucleótidos marcados con fosfato y, o con guía de ondas de modo cero (ZMWs, por sus siglas en inglés). Las técnicas y los reactivos para la secuenciación basada en FRET se describen, por ejemplo, en Levene et al, *Science* 299, 682-686 (2003); Lundquist et al. *Opt. Lett.* 33, 1026-1028 (2008); Korklach et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 1176-1181 (2008).

Algunas realizaciones de SBS incluyen la detección de un protón liberado tras la incorporación de un nucleótido en un producto de extensión. Por ejemplo, la secuenciación basada en la detección de protones liberados puede utilizar un detector eléctrico y las técnicas asociadas que están disponibles comercialmente en Ion Torrent (Guilford, CT, una dependencia de Life Technologies) o los métodos y sistemas de secuenciación descritos en el documento de patente de EE. UU. 2009/0026082 A1; en el documento de patente de EE. UU. 2009/0127589 A1; en el documento de patente de EE. UU. 2010/0137143 A1; o en el documento de patente de EE. UU. 2010/0282617 A1.

Otra aplicación útil para una matriz de la presente descripción, por ejemplo, que se ha producido mediante un método expuesto en la presente memoria, es el análisis de la expresión génica. La expresión génica se puede detectar o cuantificar utilizando técnicas de secuenciación de ARN, tal como las denominadas como secuenciación digital de ARN. Las técnicas de secuenciación de ARN se pueden llevar a cabo utilizando metodologías de secuenciación conocidas en la técnica, tales como las expuestas anteriormente. La expresión génica también se puede detectar o cuantificar utilizando técnicas de hibridación llevadas a cabo por hibridación directa a una matriz o utilizando un ensayo múltiple, cuyos productos se detectan en una matriz. Una matriz de la presente descripción, por ejemplo, que se ha producido mediante un método expuesto en la presente memoria, también se puede utilizar para determinar genotipos para una muestra de ADN genómico de uno o más individuos. Los métodos ilustrativos para el análisis de genotipos y expresiones basadas en matrices que se pueden llevar a cabo sobre una matriz de la presente descripción se describen en los documento de patente de EE.UU. nº 7.582.420; 6.890.741; 6.913.884 ó

6.355.431 o en la patente de EE.UU. nº de publicación 2005/0053980 A1; 2009/0186349 A1 o US 2005/0181440 A1.

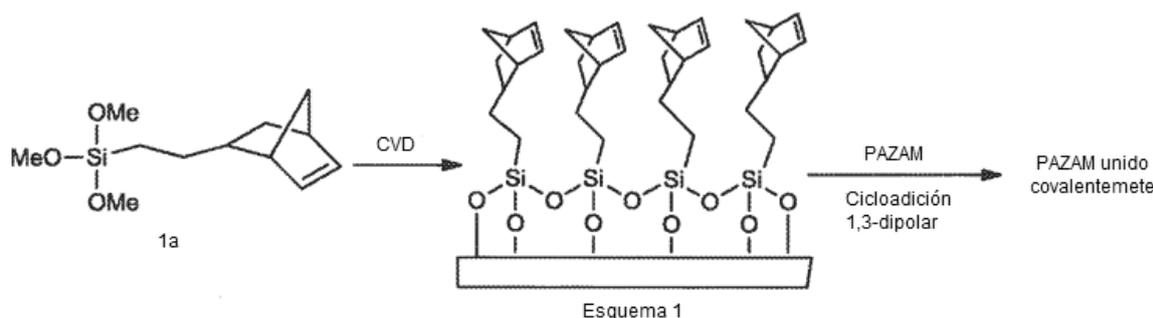
5 En algunas realizaciones del método descrito anteriormente que emplean una celda de flujo, solo un tipo único de nucleótido está presente en la celda de flujo durante una sola etapa de flujo. En tales realizaciones, el nucleótido se puede seleccionar del grupo que consiste en dATP, dCTP, dGTP, dTTP y análogos de ellos. En otras realizaciones del método descrito anteriormente que emplean una celda de flujo, una pluralidad de tipos diferentes de nucleótidos están presentes en la celda de flujo durante una única etapa del flujo. En tales métodos, los nucleótidos se pueden seleccionar entre dATP, dCTP, dG TP, dTTP y análogos de ellos.

10 La determinación del nucleótido o los nucleótidos incorporados durante cada etapa del flujo para uno o más de los polinucleótidos unidos al recubrimiento de polímeros sobre la superficie del sustrato presente en la celda de flujo se logra al detectar una señal producida en o cerca del polinucleótido molde. En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la señal detectable comprende una señal óptica. En otras realizaciones, la señal detectable comprende una señal no óptica. En tales realizaciones, la señal no óptica comprende un cambio en el pH en o cerca de uno o más de los polinucleótidos molde.

## 15 Ejemplos

Realizaciones adicionales se describen con más detalle en los siguientes ejemplos, que de ninguna manera pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo 1 Inmovilización de PAZAM sobre superficie de vidrio silanizado con norborneno 1a



## 20 Silanización de superficie

Método 1 (silanización utilizando un desecador de vacío de vidrio): 200  $\mu$ L-500  $\mu$ L de norborneno silano líquido se depositaron dentro de un vial de vidrio y se colocaron dentro de un desecador de vacío de vidrio. Los sustratos de vidrio se colocaron también dentro del desecador. El desecador se evacuó después a una presión de 2-4 Pa, y se colocó dentro de un horno a una temperatura entre 60-125°C. La silanización se dejó continuar durante 1 h, después de lo cual se retiró el desecador del horno, se enfrió y se ventiló al aire. Los sustratos se utilizaron justo después de esta etapa, o se sometieron a una etapa de curado adicional (1 h a 100°C) y/o una etapa de lavado con disolvente, tal como un enjuague con etanol.

Método 2 (silanización utilizando horno por el método YES CVD): Primero, los sustratos se introdujeron en la cámara del horno por el método CVD y la cámara se evacuó a una presión de 40 Pa. Las muestras se trataron inicialmente con un plasma de oxígeno durante 10 min. Después de la activación del plasma, la cámara se evacuó y se ejecutó un ciclo de rehidratación de 10 minutos inyectando 0,5 ml de agua a una presión base de 66,66 Pa. Después de un ciclo de purga adicional, se ejecutó el programa de silanización. Después de un tiempo de retardo de 15 minutos, la válvula de silano se ajustó para abrir durante 0,15 segundos y para cerrar durante 20 segundos. La silanización se realizó a una presión base de 66,66 Pa y a una temperatura de cámara de 125°C durante 60 min, y seguido de 2 ciclos de purga de nitrógeno, también a una temperatura de 125°C. La cámara se ventiló después durante 3 min. El ciclo de silanización del horno por el método YES fue altamente automatizado y controlado. Durante la etapa de silanización, el recipiente de norborneno silano se mantuvo a una temperatura de 120°C y las líneas de vapor de silano se mantuvieron a una temperatura constante de 125°C. Las líneas de vacío se mantuvieron a una temperatura de 145°C. Una vez que se completó el ciclo, los sustratos se retiraron, se enfriaron fuera del horno durante un breve período y posteriormente se utilizaron sin tratamiento adicional. Estos sustratos fueron viables durante al menos un mes después de la silanización.

## Deposición de PAZAM y reticulación superficial

Se depositaron 500  $\mu$ l de PAZAM acuoso (0.25% + 5% de etanol) sobre un sustrato de vidrio silanizado con norborneno y se extendió por la superficie. Se obtuvo una película delgada de PAZAM mediante recubrimiento por centrifugación con el siguiente procedimiento: Etapa 1 - 600 rpm, 5 segundos, aceleración 1500 rpm/s; Etapa 2 - 1500 rpm, 30 segundos, aceleración 5000 rpm/s; Etapa 3 - 4000 rpm, 5 segundos, aceleración 5000 rpm/s; Etapa 4 -

600 rpm, 5 segundos, aceleración 5000 rpm/seg. También se pueden utilizar otras fórmulas de recubrimiento por centrifugación. Después del recubrimiento por centrifugación, los sustratos se calentaron a una temperatura de 65-75°C en horno o placa caliente durante 1 h.

- 5 Lavado: Después de la etapa de calentamiento, los sustratos se pueden lavar en agua para retirar el PAZAM no unido añadiendo una etapa de sonicación (10 min) a una temperatura de 45°C, seguido de un enjuague con agua abundante y secado con una pistola de nitrógeno.

10 Injerto del cebador: el sustrato preparado se utilizó en la etapa de injerto del cebador haciendo reaccionar oligonucleótidos de alquino en KPi (10 mM) con PMDETA, sulfato de cobre y NaAsc (solución acuosa de 500 mg/ml) a una temperatura de 60°C durante 30 minutos.

15 Control de calidad: una vez completada la etapa de injerto del cebador, los cebadores injertados se sometieron al control de calidad TET. TET es un oligonucleótido marcado con colorante que tiene una secuencia complementaria al cebador P5/P7. TET se puede hibridar al cebador P5/P7 sobre una superficie; el exceso de TET se puede lavar, y la concentración de colorante unido se puede medir mediante detección de fluorescencia utilizando un instrumento de escaneo tal como un escáner Typhoon (General Electric). La intensidad de la concentración de colorante se midió como una indicación del porcentaje de superficie restante después de la inmovilización con hidrogel. Los procedimientos de deposición y de reticulación de superficie tratada con PAZAM también se describieron en la solicitud de patente de EE. UU. nº 13/784.368.

20 La FIG. 1A muestra un sustrato de vidrio D263 Schott silanizado con el derivado de norborneno-silano [(5-biciclo[2.2.1]hept-2-enil)etil]trimetoxisilano (1a) y posteriormente recubierto y térmicamente reticulado con PAZAM. El área oscura es la intensidad de fluorescencia real observada al injertar los cebadores P5/P7 e hibridar con cadenas complementarias modificadas con colorante TET. La FIG. 1 B muestra el gráfico relacionado de las medianas de las intensidades de fluorescencia para cada carril de la misma superficie sin patrón silanizada con norborneno (1a)/recubierta con PAZAM, injertada, hibridada con una secuencia oligonucleotídica complementaria que contiene colorante TET.

Ejemplo 2 Preparación de una superficie con patrón con PAZAM sobre un sustrato de nanopocillos

30 Las agrupaciones secuenciables, con patrones se crearon integrando los sustratos de nanopocillos con el polímero PAZAM y el pulido mecánico químico (CMP). Se fabricó un sustrato de nanopocillos (400 nm de diámetro, 750 nm de distancia, 300 nm de profundidad de pocillos) a través de un método de nanofabricación patentado desarrollado por Illumina y subcontratado a Taiwan Semiconductor Manufacturing Company Ltd (TSMC) utilizando litografía por nanoimpresión. El norborneno silano del Ejemplo 1 se depositó por CVD sobre la superficie completa del sustrato y PAZAM se recubrió por centrifugación y se calentó a una temperatura de 60-70°C, creando una unión covalente del polímero a la superficie del sustrato. El polímero intersticial unido covalentemente se retiró puliendo la superficie con 3 µm de suspensión de micropartículas de SiO<sub>2</sub> en agua al 10% en peso a través del método de CMP. El sustrato polimérico con patrón se injertó después con cebadores siguiendo el protocolo estándar de Illumina. Se tomaron imágenes de los cebadores con patrón sobre el sustrato con una cámara Typhoon. Después, el sustrato se sembró con ADN phiX, se agrupó con el protocolo de amplificación patentado de Illumina, obtenido a partir del kit Twist DX (amplificación isotérmica) y se secuenció. La secuenciación se realizó sobre un Illumina HiSeq 2000, utilizando el kit de reactivos de secuenciación SBS estándar y las métricas se extrajeron utilizando el visor de análisis de secuenciación de Illumina. Los datos del análisis de secuenciación mostraron que la métrica de secuenciación del recorrido del sustrato silanizado con norborneno son equivalentes a las de los sustratos funcionalizados con acrilamidas.

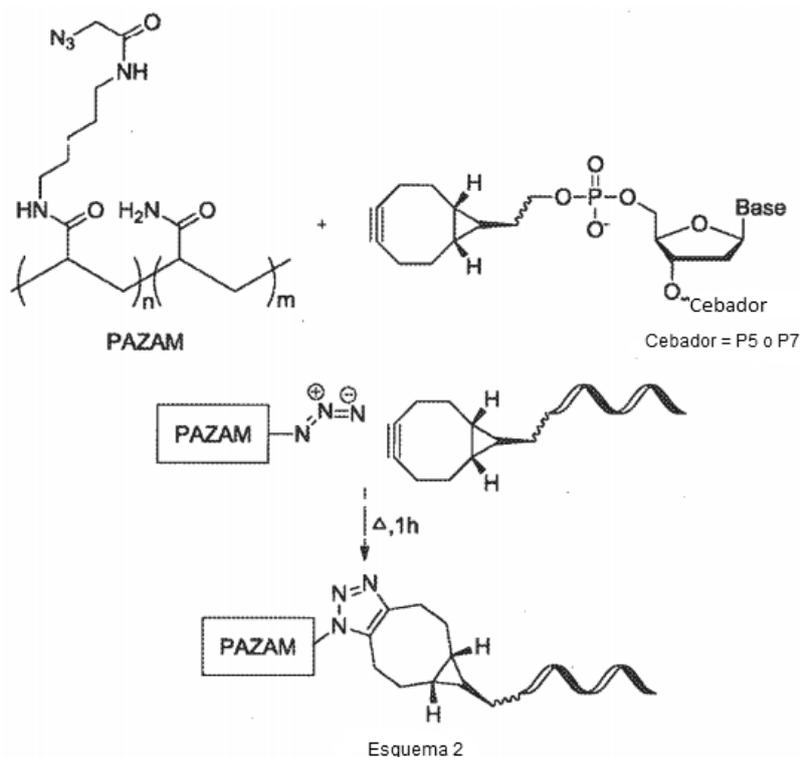
45 La FIG 2A muestra un sustrato de vidrio D263 Schott modelado con nano pocillos silanizados con el derivado de norborneno-silano (1a) y posteriormente recubiertos y térmicamente reticulados con PAZAM. El área oscura es la intensidad de fluorescencia real observada después del pulido mecánico químico del exceso de PAZAM y tras injertar los cebadores P5/P7 e hibridar con cadenas complementarias modificadas con colorante TET. La FIG 2B muestra el gráfico relacionado de la mediana de intensidades de fluorescencia para cada carril de la misma superficie sin patrón silanizada con norborneno (1a)/recubierta con PAZAM injertada, hibridada con una secuencia oligonucleotídica complementaria que contiene colorante TET.

50 El sustrato silanizado con norborneno no solo eliminó la necesidad de un agente de reticulación adicional, los sustratos silanizados con norborneno mostraron una afinidad preferencial por PAZAM y facilitaron la difusión de la disolución acuosa de PAZAM. Como resultado, los recubrimientos con PAZAM fueron más homogéneos y menos sensibles a las variaciones en la calidad del sustrato. La FIG. 3A muestra la imagen typhoon de una celda de flujo como resultado del fallo típico de recubrimiento por centrifugación con una superficie funcionalizada con acrilamidas estándar. La FIG. 3B muestra la imagen typhoon de una celda de flujo silanizada con derivado de norborneno silano (1a), que da como resultado un recubrimiento más homogéneo. La FIG. 3C muestra que una solución acuosa de PAZAM al 0.25% humedece una superficie silanizada con el derivado de norborneno silano (1a) en comparación con la extensión de agua, incluso en presencia de un gran desajuste de energía entre las energías superficiales de la interfaz sólido-líquido.

Ejemplo 3 Ensayos de estabilidad de la superficie

5 Los sustratos silanizado con norborneno/recubiertos con PAZAM también demostraron una buena vida útil. Varios sustratos con patrón y sin patrón se silanizaron con norborneno silano del Ejemplo 1 utilizando el método YES, después se sometieron a recubrimiento con PAZAM y reticulación utilizando el método descrito en los ejemplos 1 y 2. Los sustratos con patrón se almacenaron en un portador de portaobjetos en la oscuridad a temperatura ambiente, dentro de un desecador. Después de 30 días, estos sustratos se secuenciaron y proporcionaron resultados de control de calidad TET y la métrica de secuenciación aceptables (FIG. 4).

Ejemplo 4 Injerto de cebadores con oligos modificados con BCN



10 Una realización de un método para injertar oligos modificados con BCN a una superficie recubierta con PAZAM es la siguiente: se utilizaron oligos de P5 y P7 con BCN modificado en 5' que contienen las mismas secuencias que los oligos estándar de P5 y P7 (tiofosfato y alquino) para hacerlos reaccionar con una superficie de celda de flujo recubierta con PAZAM (0,25% p/v) sin ningún catalizador (Esquema 2). La superficie recubierta con PAZAM se preparó tratando primero la superficie con 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS), seguido de un tratamiento con cloruro de acrililo (80  $\mu$ L de cloruro de acrililo puro y 40  $\mu$ L de DIPEA en 1880 $\mu$ L de MeCN anhidro) o éster acrilóico de NHS activado (20mg/mL en KPi pH = 8,0, 200 mM) para formar los grupos acrilamida insaturados. Después, se introdujo PAZAM a la superficie insaturada y el sustrato se incubó a una temperatura de 60°C durante 50-75min (estático). El método general se describe en la de solicitud de EE.UU. n° 13/784.368. Las condiciones experimentales detalladas para cada carril de la celda de flujo se ilustran en la Tabla 1 a continuación.

Detalles	[alquino]/ $\mu$ M total
PAZAM al 1%, injerto estándar Blackpool	2
PAZAM al 1%, injerto estándar Blackpool	2
PAZAM al 1%, injertos sin cobre, cebadores BCN P5 y P7	2
PAZAM al 1%, injertos sin cobre, cebadores BCN P5 y P7	2
PAZAM al 1%, injertos sin cobre, cebadores BCN P5 y P7	2
PAZAM al 1%, injertos sin cobre, cebadores BCN P5 y P7	2
PAZAM al 1%, injerto sin cobre, solo cebador BCN P5	2
PAZAM al 1%, injerto sin cobre, solo cebador BCN P7	2

5 En la FIG. 5A se representa una imagen Typhoon inicial de la superficie injertada de la celda de flujo utilizando el injerto sin catalizador de los oligos modificados con BCN descritos anteriormente. La superficie de la celda de flujo se sometió a un ensayo de esfuerzo térmico para determinar la robustez del recubrimiento injertado y el resultado mostrado en la FIG. 5B demostró que la reducción de la señal (aproximadamente correlacionada con la pérdida de superficie) es mínima y consistente con los carriles estándar.

10 Para explorar las condiciones experimentales para obtener densidades de cebadores óptimas, también se ensayaron diferentes concentraciones de oligos modificados con BCN (Tabla 2). La superficie de la celda de flujo recubierta con PAZAM se preparó a partir de un silano modificado con norborneno utilizando el procedimiento similar descrito en el Ejemplo 1. Después, se injertaron diferentes concentraciones de cebadores modificados con BCN a la capa de polímero. La imagen Typhoon inicial de la superficie injertada de una celda de flujo utilizando el método de injerto sin cobre y diferentes concentraciones de cebadores BCN se demuestra en la FIG. 6A. La superficie de la celda de flujo también se sometió a un ensayo de estrés térmico y la FIG. 6B indica los resultados de los análisis de control de calidad TET realizados antes y después del estrés térmico de superficie.

Tabla 2.

Canal	Detalles	[alquino]/ $\mu$ M total
1	PAZAM al 25%, injerto sin cobre utilizando cebadores BCN P5 y P7	2
2		2
3		4
4		4
5		10
6		10
7		20
8		20

20 La amplificación por puentes realizada sobre ambas superficies de la celda de flujo injertada se realizó sin problemas. Las agrupaciones se observaron utilizando un microscopio de fluorescencia, y parecían comparables con las desarrolladas en las líneas de control. La FIG. 7A muestra una imagen de fluorescencia de agrupaciones desarrolladas a partir de una superficie injertada con cebadores BCN. La concentración de siembra del molde fue 0,5 pM. Del mismo modo, la FIG. 7B muestra imágenes de fluorescencia de agrupaciones desarrolladas a partir de una superficie injertada con cebador BCN donde la concentración del molde era 3 pM.

25 Las superficies de las celdas de flujo injertadas con oligos modificados con BCN se tomaron después a través de varios recorridos de secuenciación utilizando un instrumento HiSeq. La métrica de alto nivel fue comparable con los carriles control. La comparación de los datos de SBS muestra que la métrica de secuenciación de alto nivel es muy comparable con los resultados obtenidos actualmente de las superficies tratadas con PAZAM injertadas utilizando oligos de alquino estándar.

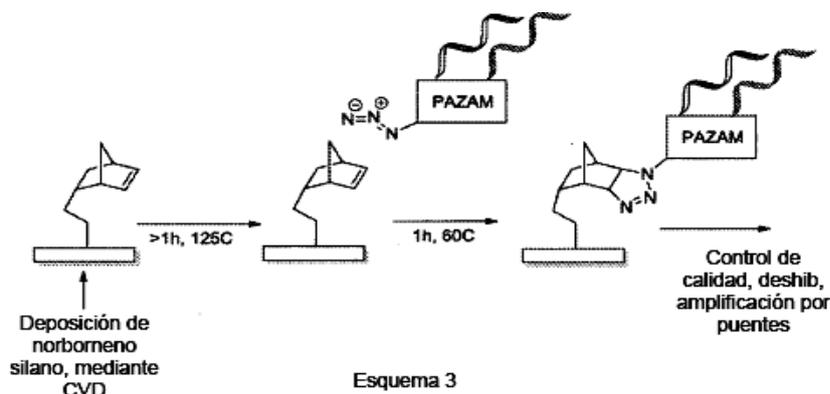
Ejemplo 5 Injerto de cebador con BCN-oligos

30 En algunas realizaciones de los métodos de preparación de superficie de sustrato descritos en la presente memoria, se recubren primero los sustratos en bruto con un derivado de silano, p. ej., silano modificado con norborneno, después PAZAM se recubre por centrifugación sobre la superficie. El sustrato después se pule y se ensambla, posteriormente se somete a un injerto de cebador y a control de calidad. También se exploró el enfoque alternativo de preparar un sustrato utilizando PAZAM pre-injertado mediante la funcionalización de PAZAM con los oligos P5 y P7 estándar en solución. Este método ofrece varias ventajas importantes. Moviendo la etapa de injerto de cebador

35 secuencia arriba permitiría una purificación más efectiva del polímero y un mayor control de la cantidad de oligos utilizados para lograr una densidad de cebador en la superficie diana. Además, el flujo de trabajo hacia un sustrato acabado se puede acortar, ya que la superficie del sustrato recubierto ya contendría los cebadores necesarios para la hibridación del molde y, por lo tanto, eliminaría la necesidad de utilizar instrumentación fluidica especializada para lograr superficies adecuadamente injertadas.

40 Se añadió una solución de la mezcla de cebadores P5/P7 modificados con BCN (concentración total = 15  $\mu$ M) a una solución acuosa de PAZAM (0,5% p/v) y la mezcla resultante se calentó durante 2 horas a una temperatura de 70°C. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se utilizó para recubrir una celda de flujo HiSeq estándar,

pretratada con una capa de silano modificado con norborneno (Esquema 3).



5 La superficie preinjertada se sometió al ensayo de estrés térmico estándar y las pérdidas de señal (correspondientes a las pérdidas de superficie) fueron comparables al control. Se realizó un experimento de secuenciación SBS HiSeq 2x26 utilizando los reactivos estándar como se describe en el protocolo estándar de Illumina. La FIG. 8A muestra el tipo de agrupaciones obtenidas a partir de una superficie tratada con PAZAM preinjertada. La concentración de siembra del molde se redujo (0,5 pM). En la FIG. 8B, se muestra la superficie inferior de un canal en la misma celda de flujo con la concentración de siembra incrementada a 3 pM. El cambio en la densidad de agrupaciones está dentro de los límites esperados y, por lo tanto, muestra que esta nueva superficie se comporta de manera muy similar a las superficies de control. La inspección de las imágenes (Figuras 8A y 8B) indicó que las agrupaciones eran típicas, siendo la única variación el "tamaño" aparente de las agrupaciones que se estimó por consideración del valor semimáximo de anchura total (FWHM, por sus siglas en inglés), que se utiliza internamente como un proxy para el tamaño aparente de la agrupación. Esto es consistente con la intensidad reducida de estas agrupaciones. Una comparación entre las métricas SBS para los canales preinjertados, control e injertados con cebadores modificados con BCN confirma que los ciclos SBS procedían de las agrupaciones generadas en la superficie.

20 Se realizó una ejecución SBS más larga y similar utilizando un instrumento MiSeq. En este caso, se incubó una solución estándar de PAZAM con los cebadores modificados con BCN durante 3 horas a una temperatura de 70°C. La mezcla polimérica injertada resultante se aplicó después a celdas de flujo MiSeq funcionalizadas con norborneno siguiendo los protocolos estándar. La generación de agrupaciones a bordo fue seguida por una ejecución de SBS de 2x151 ciclos utilizando un sistema estándar de cuatro canales. La FIG 9 muestra una imagen en miniatura de agrupaciones que crecen a partir de una superficie de canal recubierta con una mezcla de PAZAM preconjugada obtenida a partir de un sistema MidSeq estándar (2x151 SBS). La parte derecha de la imagen es una ampliación de la parte izquierda de la imagen.

25 Las imágenes de SBS para todos los ciclos de esta ejecución son comparables con las de los experimentos de SBS estándar (SFA y PAZAM). Las mediciones de señal a ruido también son muy similares en comparación con las superficies estándar, mostrando que no hay atrapamiento evidente de las moléculas de colorante durante la secuenciación (es decir, el recubrimiento de polímeros no parece experimentar cambios adicionales).

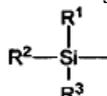
REIVINDICACIONES

1. Un sustrato que comprende una primera superficie que comprende silano o un derivado de silano unido covalentemente a una molécula funcionalizada a través de la reacción de la molécula funcionalizada con una primera pluralidad de restos insaturados seleccionados de cicloalquenos, heteronorbornos, o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de ellos unidas covalentemente a dicho silano o derivado de silano.

2. El sustrato de la reivindicación 1, en donde dicha primera pluralidad de restos insaturados se seleccionan de norborneno, heteronorbornos, derivados de norborneno, trans-cicloocteno, derivados de trans-cicloocteno, o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de ellos.

3. El sustrato de la reivindicación 1 ó 2, en donde dicha primera pluralidad de restos insaturados es norborneno opcionalmente sustituido.

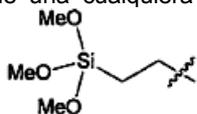
4. El sustrato de una cualquiera de la reivindicaciones 1 ó 2, en donde el silano o derivado de silano comprende la siguiente fórmula



en donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, halógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, ariloxi opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido o heteroariloxi opcionalmente sustituido.

5. El sustrato de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además conectores unidos covalentemente entre átomos de silicio de dicho silano o derivado de silano y la primera pluralidad de restos insaturados.

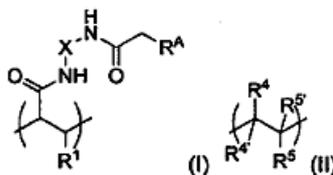
6. El sustrato de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el silano o derivado de silano



comprende la fórmula unida covalentemente a norborneno opcionalmente sustituido.

7. El sustrato de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la molécula funcionalizada es un hidrogel o polímero que comprende uno o más grupos funcionales seleccionados de azido, amino opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, hidrazona opcionalmente sustituida, hidrazina opcionalmente sustituida, carboxilo, hidroxilo, tetrazol opcionalmente sustituido, tetrazina opcionalmente sustituida, óxido de nitrilo, nitrona o tiol, o combinaciones de ellos.

8. El sustrato de la reivindicación 7, en donde la molécula funcionalizada comprende una unidad repetitiva de Fórmula (I) y una unidad repetitiva de Fórmula (II):



en donde

R<sup>1</sup> es H o alquilo;

R<sup>A</sup> se selecciona del grupo que consiste en azido, amino opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, hidrazona opcionalmente sustituida, hidrazina opcionalmente sustituida, carboxilo, hidroxilo, tetrazol opcionalmente sustituido, tetrazina opcionalmente sustituida, óxido de nitrilo, nitrona y tiol;

X es un conector de alqueno opcionalmente sustituido o un conector de heteroalqueno opcionalmente sustituido;

R<sup>4</sup>, R<sup>4'</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>5'</sup> se seleccionan cada uno independientemente de H, R<sup>6</sup>, OR<sup>6</sup>, -C(O)OR<sup>8</sup>, -C(O)R<sup>6</sup>, -OC(O)R<sup>6</sup>, -C(O)NR<sup>7</sup>R<sup>8</sup>, o -NR<sup>7</sup>R<sup>8</sup>,

R<sup>6</sup> se selecciona independientemente de H, OH, alquilo, cicloalquilo, hidroxialquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, o variantes de ellos opcionalmente sustituidos; y

R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> se seleccionan cada uno independientemente de H o alquilo, o R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> están conectados entre sí con el



17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en donde dicha primera pluralidad de restos insaturados son norborneno opcionalmente sustituido.

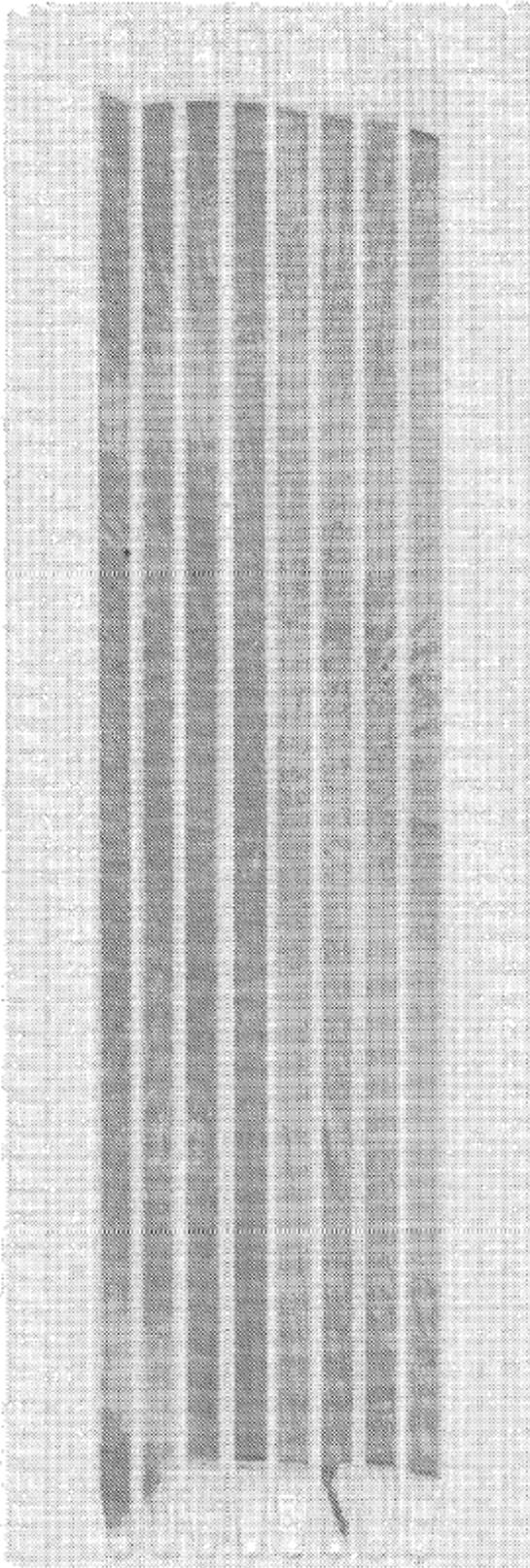


FIG. 1A

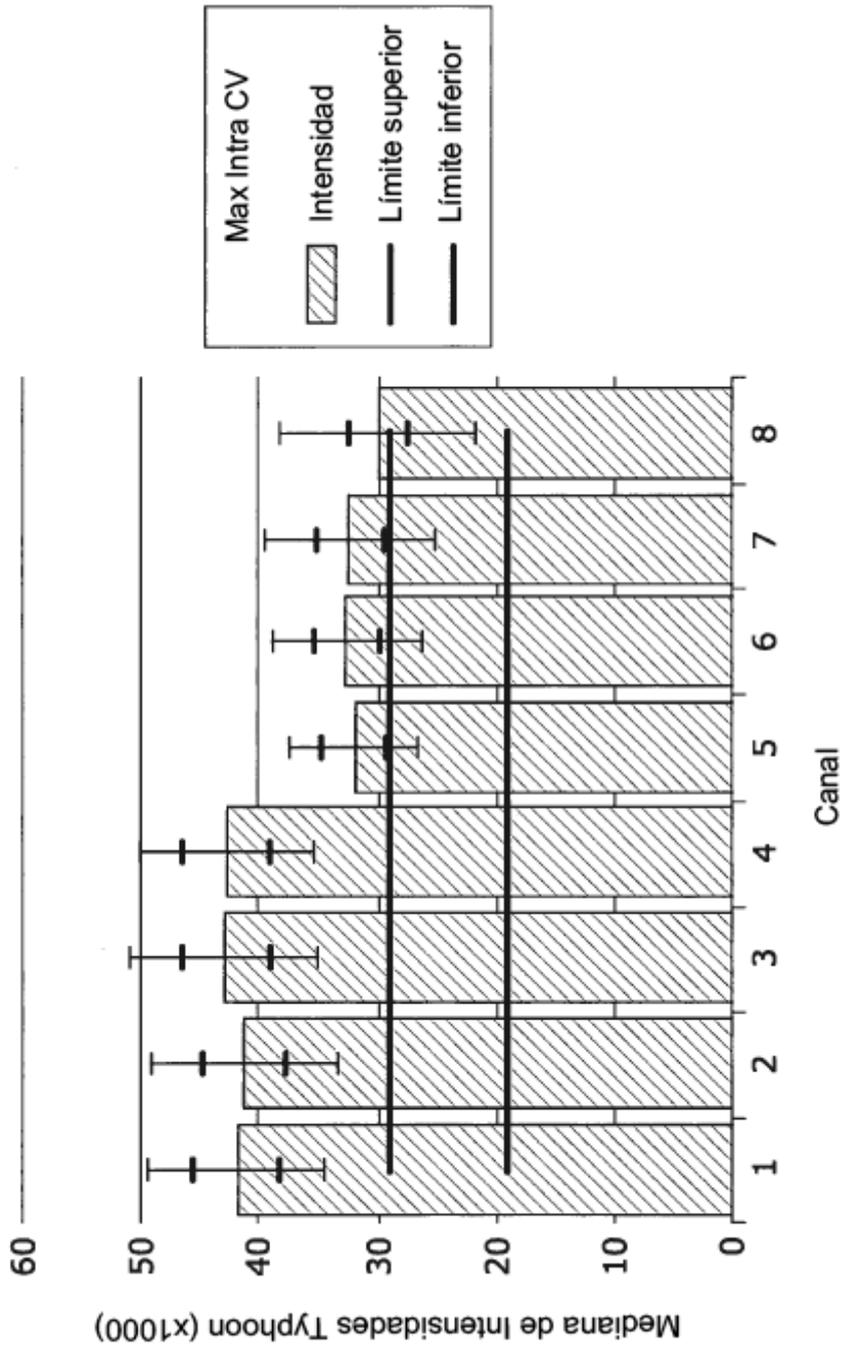


FIG. IB

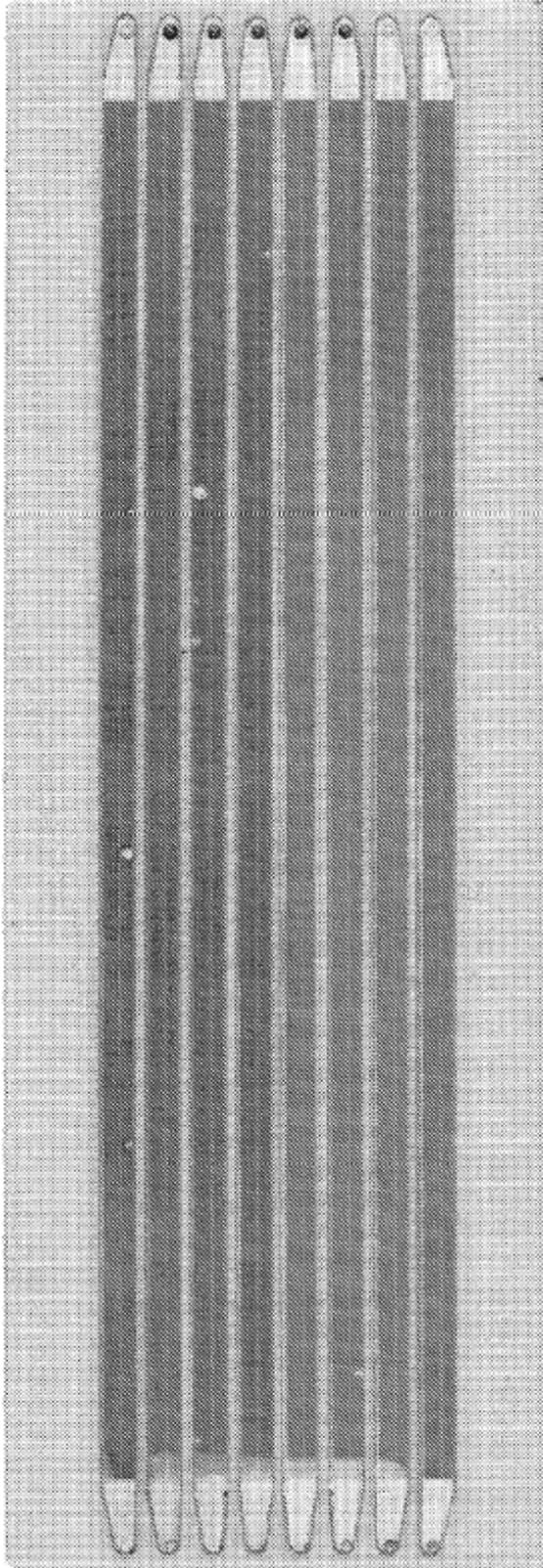


FIG. 2A

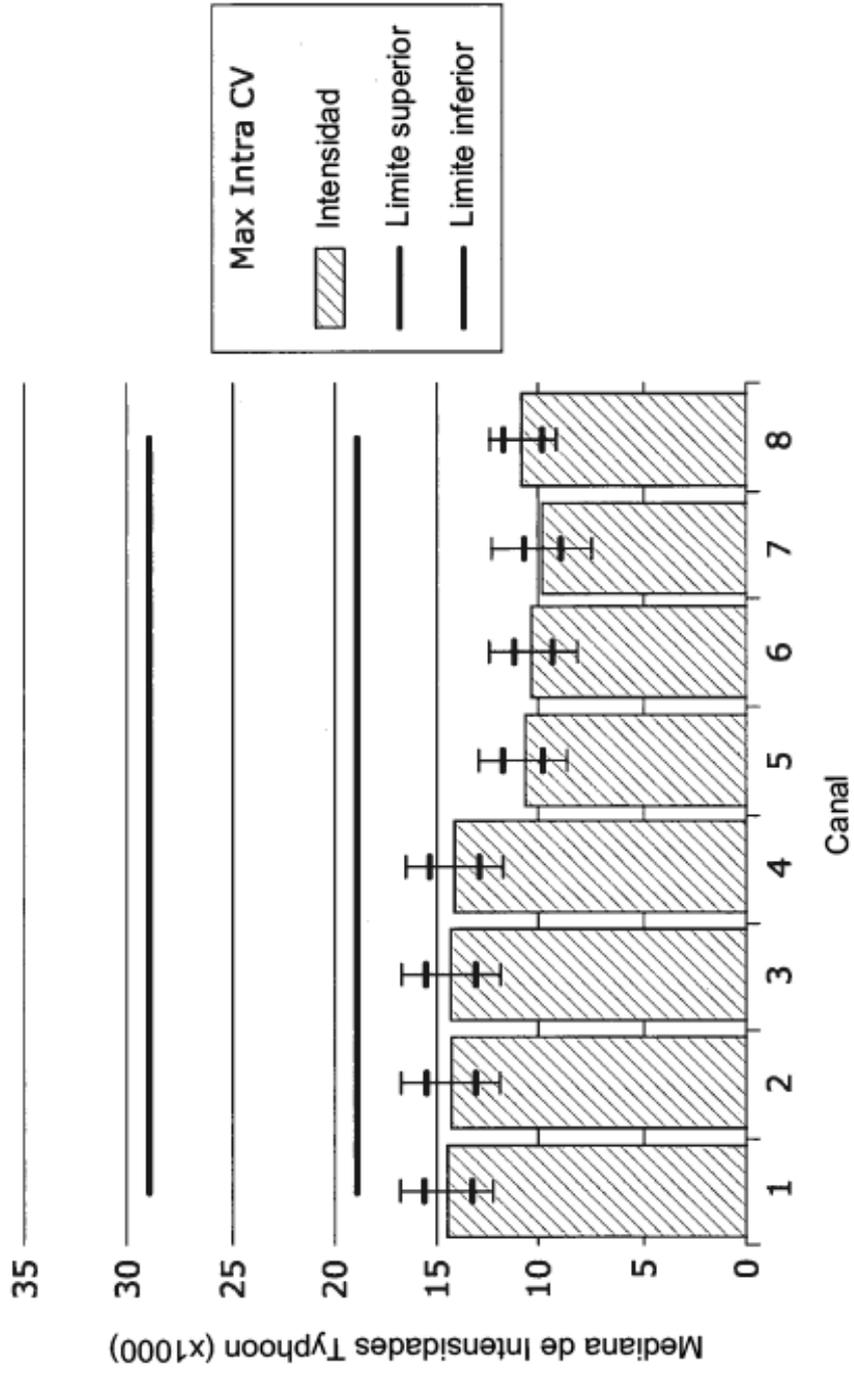


FIG. 2B

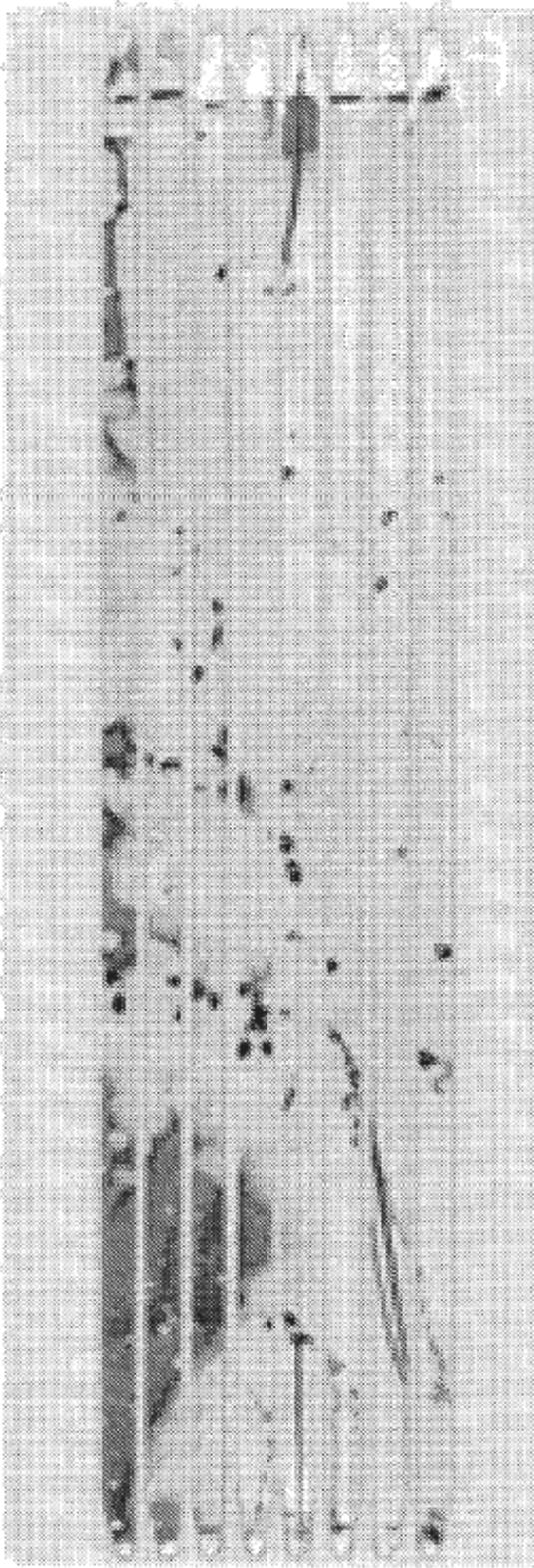


FIG. 3A

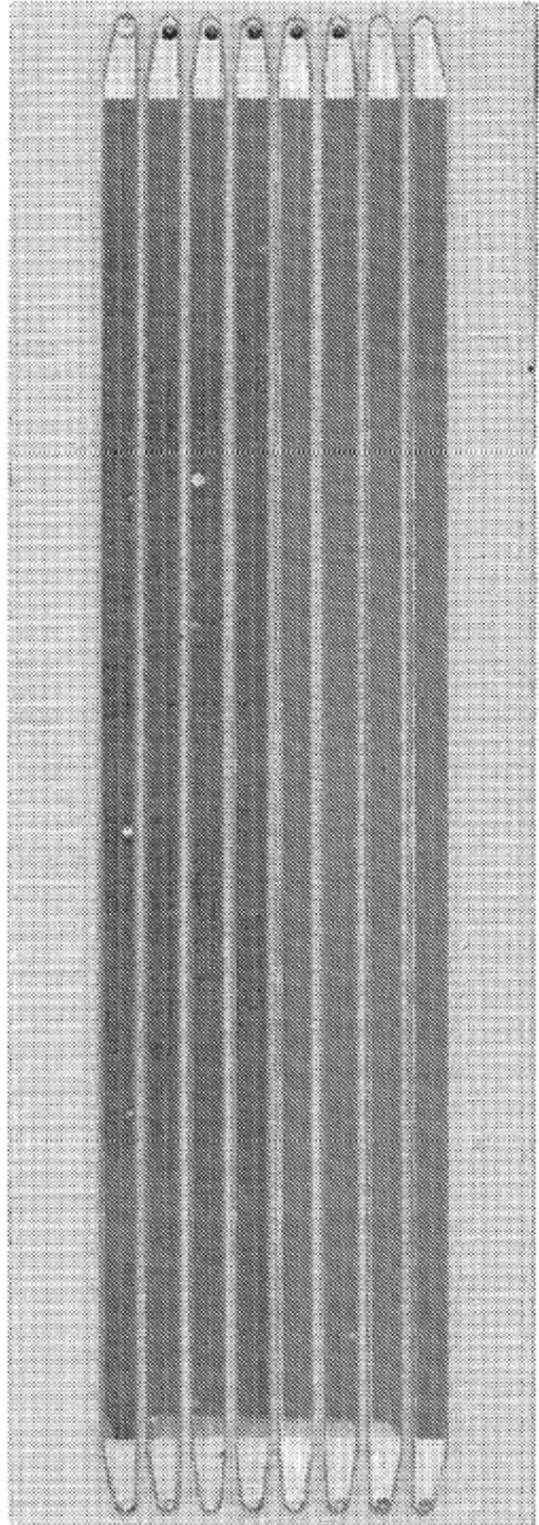


FIG. 3B

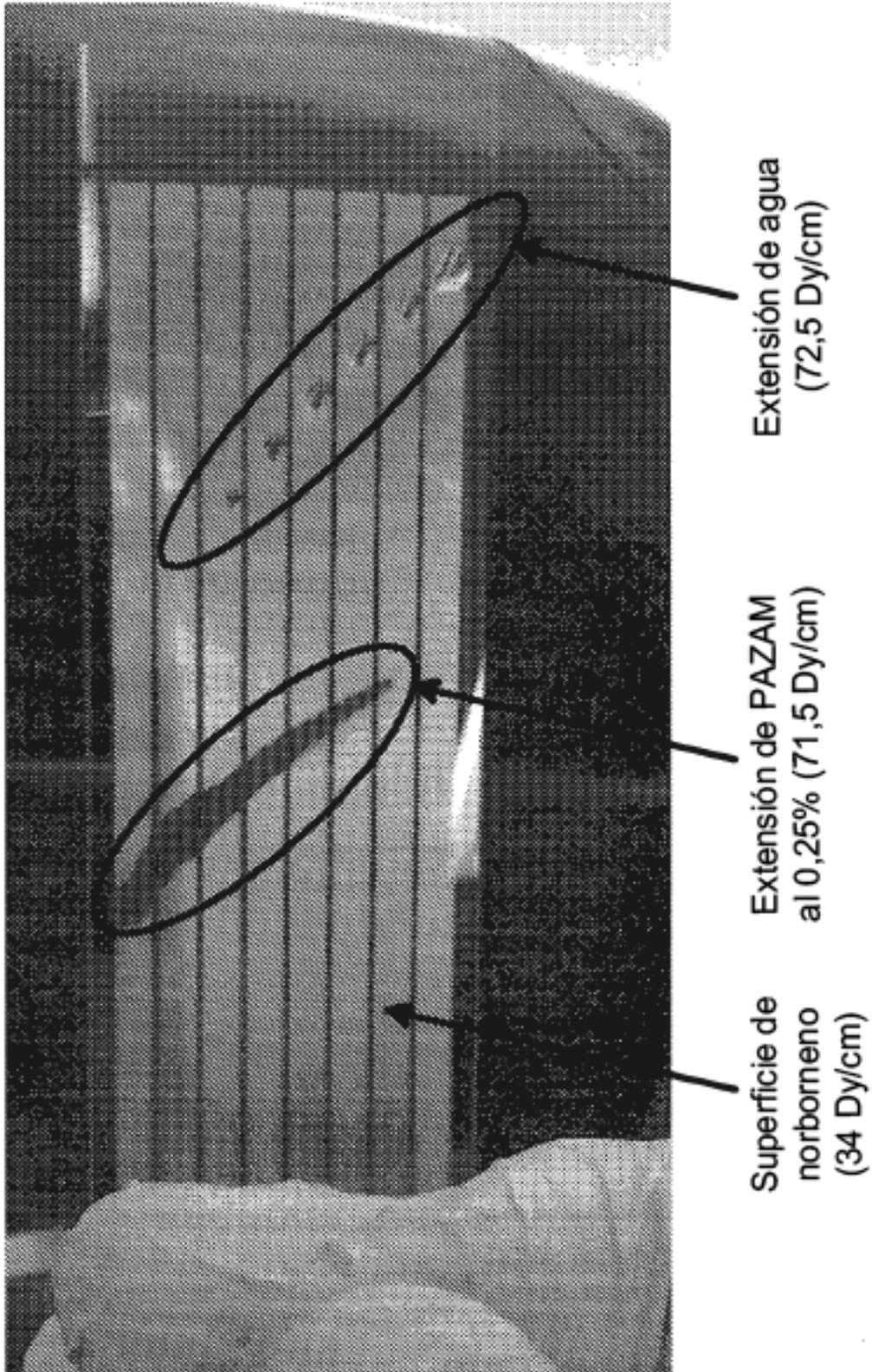


FIG. 3C

Carril	Cuadros	Densidad (K/mm <sup>2</sup> )	Agrupaciones PF (%)	Fase/Prefase (%)	Lecturas (M)	Lecturas PF (M)	% >= Q30	Ciclos de error estimados	Alineados (%)	Tasa de error (%)	Intensidad Ciclo 1	% Intensidad Ciclo 20
1	56	2164 +/- 0	59.5 +/- 6.8	0.134 / 0.252	176.81	105.22	86.4	25	96.8 +/- 1.1	0.26 +/- 0.05	3728 +/- 377	91.3 +/- 5.2
2	56	2164 +/- 0	61.1 +/- 5.7	0.130 / 0.248	176.81	108.07	87.2	25	97.2 +/- 0.8	0.25 +/- 0.05	3617 +/- 357	87.9 +/- 1.8
3	56	2164 +/- 0	61.1 +/- 6.4	0.135 / 0.298	176.81	108.03	87.7	25	97.3 +/- 0.9	0.24 +/- 0.05	3733 +/- 358	79.7 +/- 1.8
4	56	2164 +/- 0	61.2 +/- 6.3	0.133 / 0.310	176.81	108.2	87.5	25	97.4 +/- 1.0	0.25 +/- 0.06	3569 +/- 395	78.6 +/- 1.7
5	56	2164 +/- 0	60.1 +/- 5.4	0.118 / 0.295	176.81	106.27	87.3	25	97.3 +/- 0.8	0.24 +/- 0.05	3521 +/- 410	80.6 +/- 2.2
6	56	2164 +/- 0	58.9 +/- 12.8	0.123 / 0.286	176.81	104.11	87.9	25	94.0 +/- 18.4	0.25 +/- 0.06	3439 +/- 787	78.8 +/- 2.3
7	56	2164 +/- 0	60.2 +/- 6.2	0.117 / 0.307	176.81	106.37	87.4	25	97.2 +/- 1.1	0.25 +/- 0.06	3651 +/- 428	78.9 +/- 2.3
8	56	2164 +/- 0	58.8 +/- 7.2	0.119 / 0.356	176.81	104	86.5	25	96.6 +/- 1.5	0.27 +/- 0.07	3824 +/- 375	78.5 +/- 1.7

FIG. 4

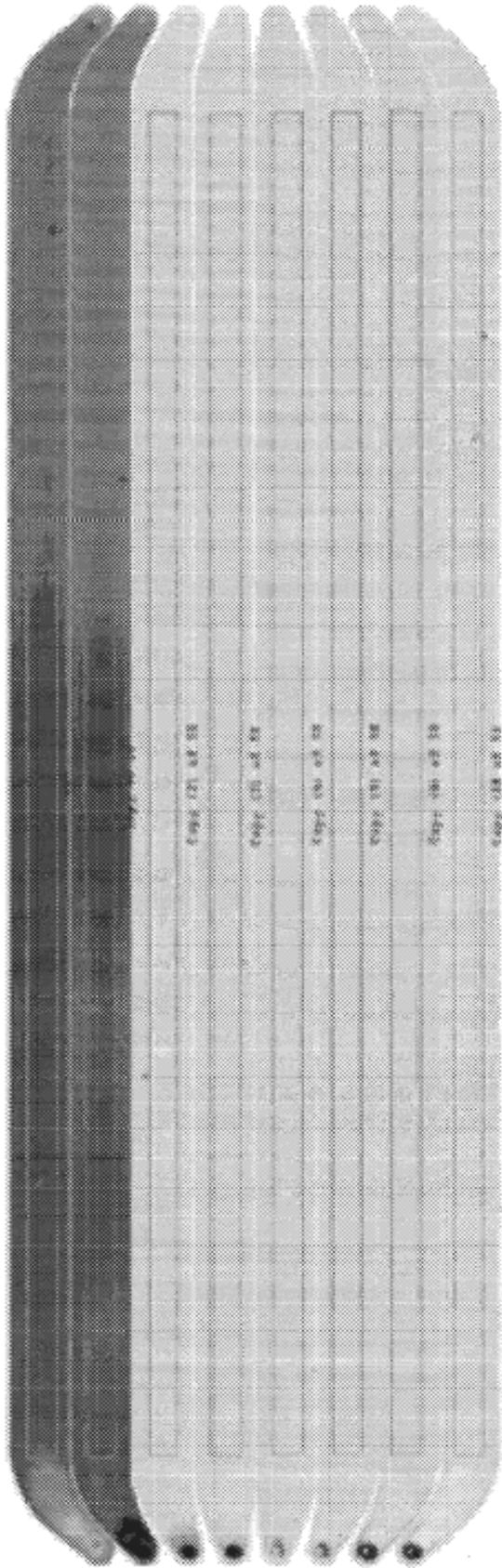


FIG. 5A

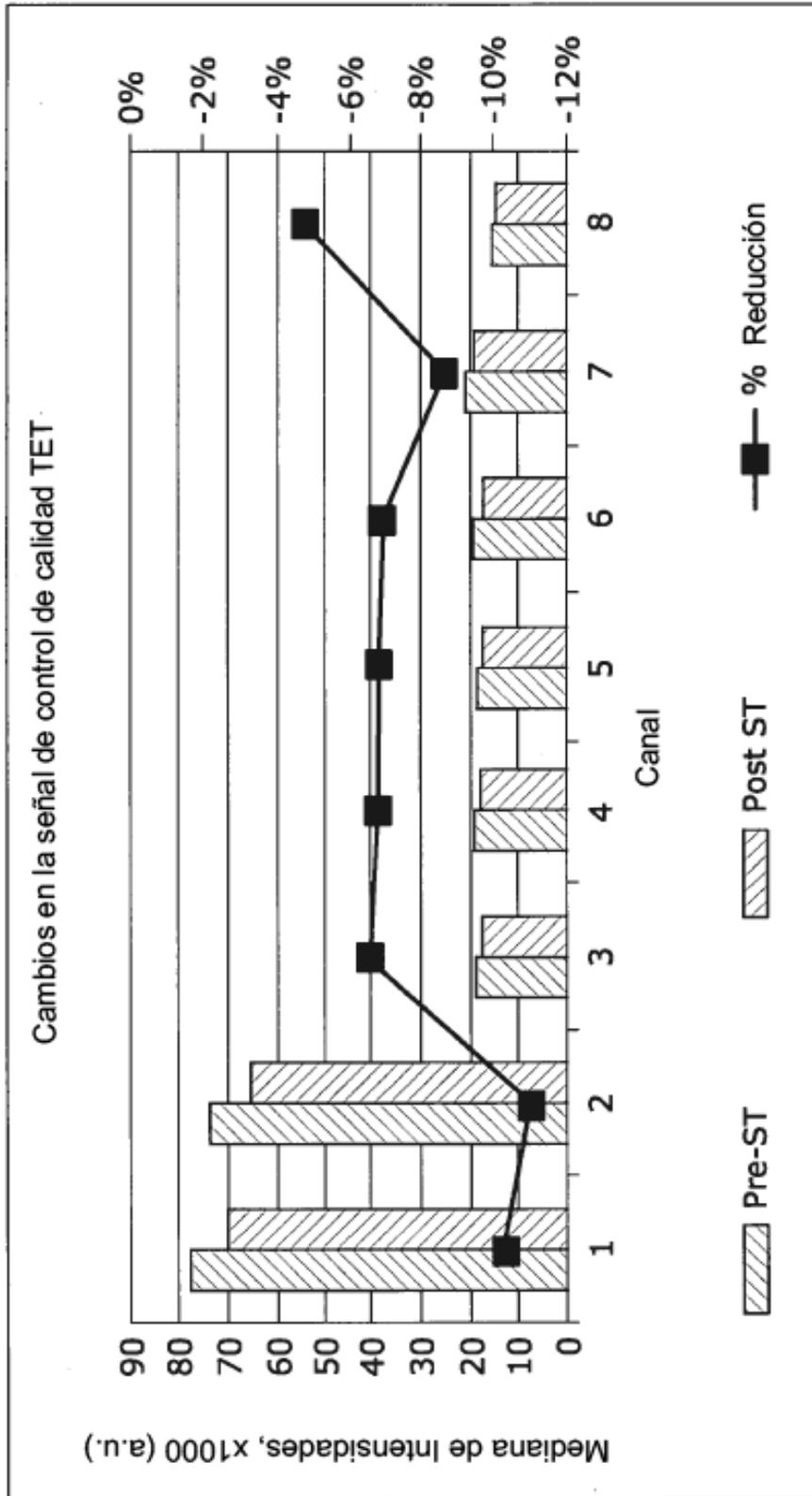


FIG. 5B

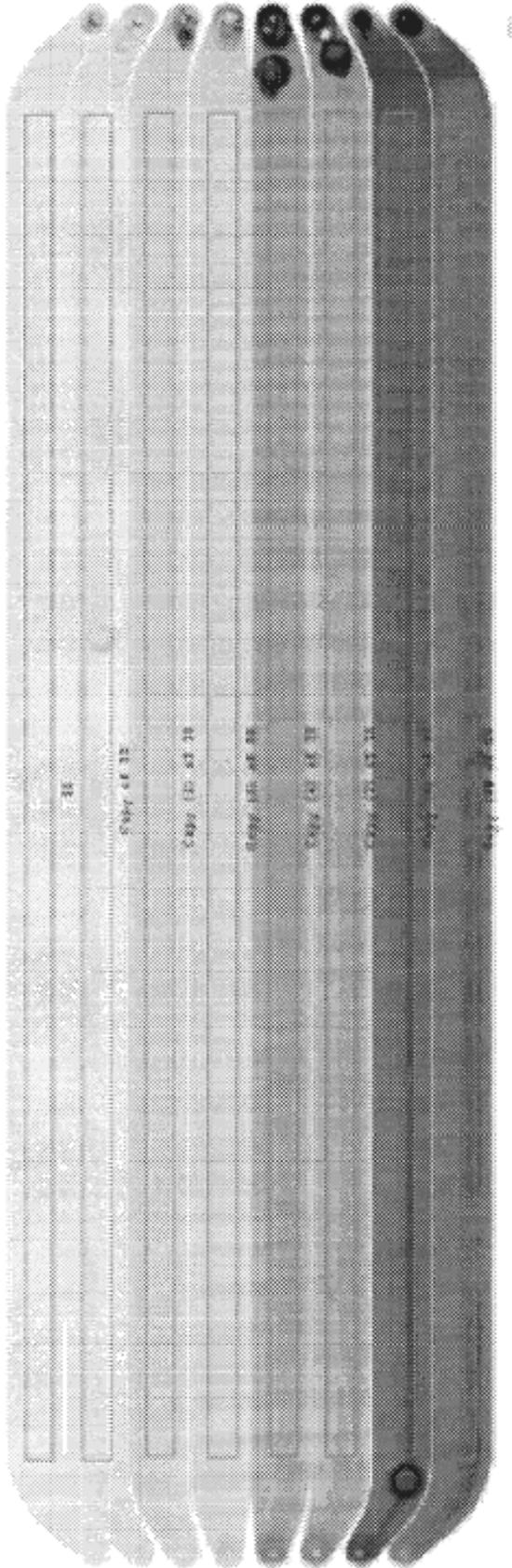


FIG. 6A

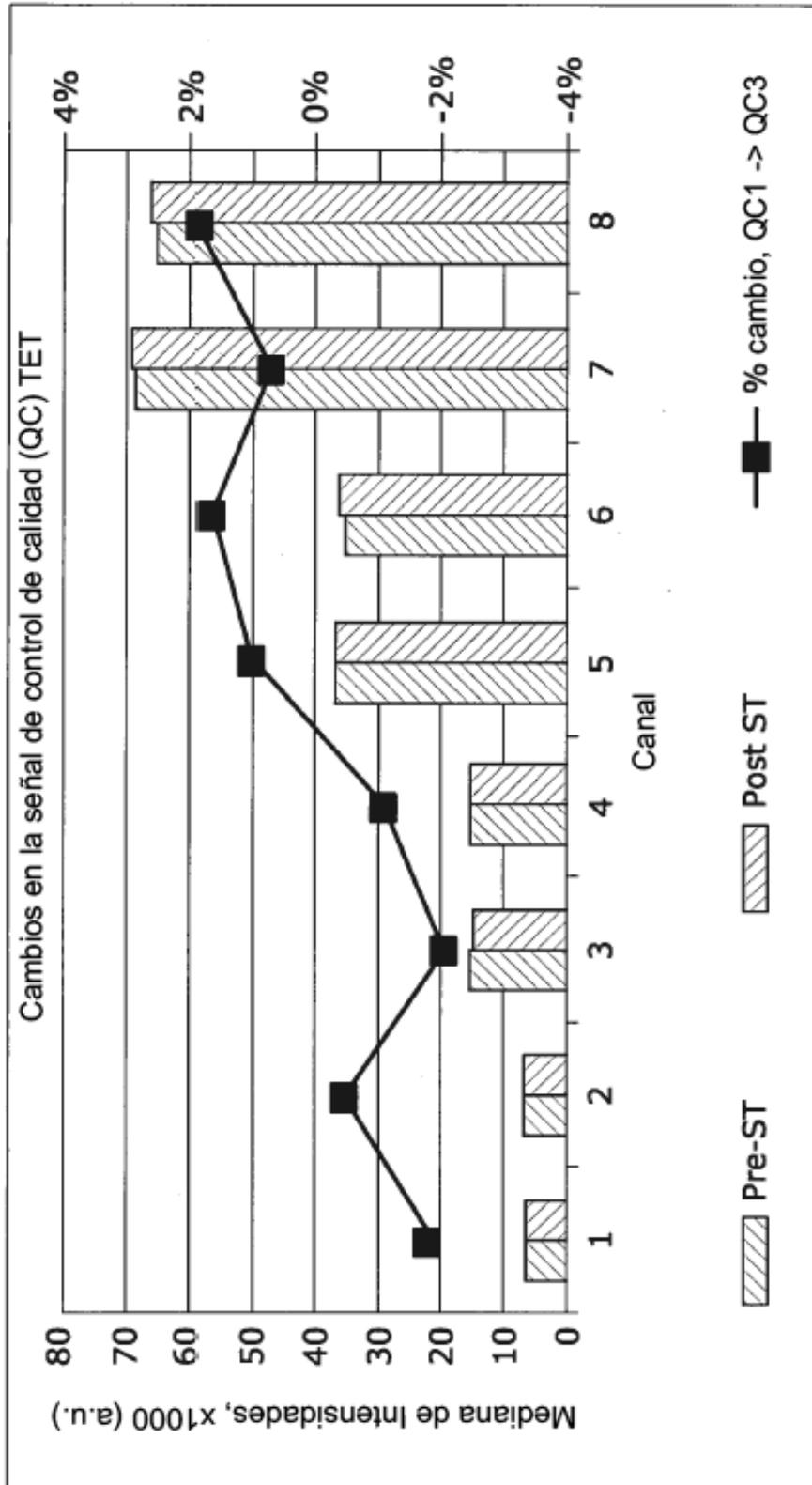


FIG. 6B

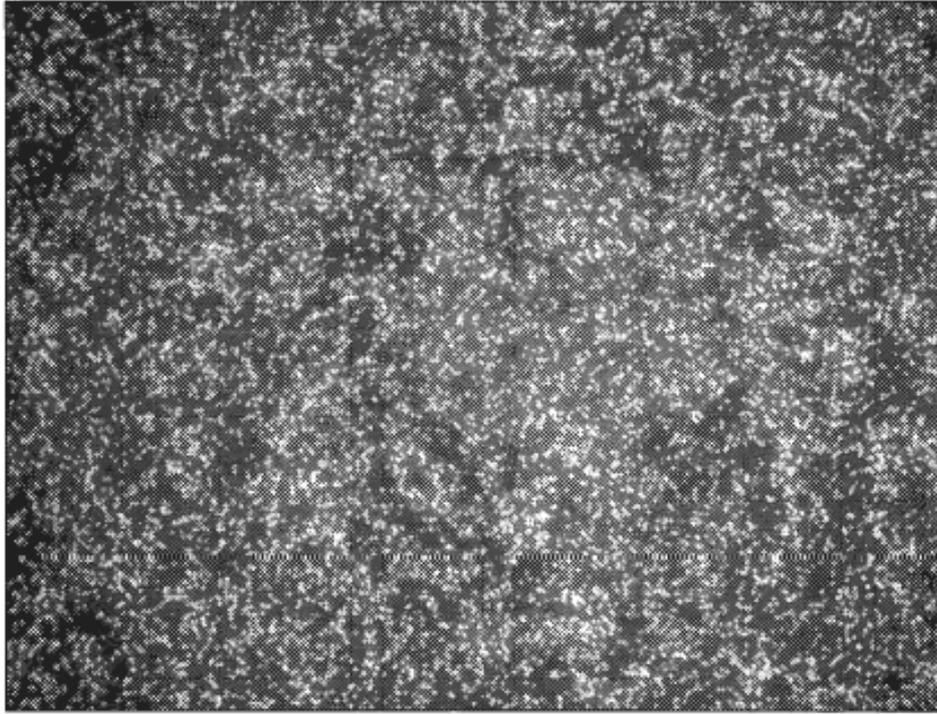


FIG. 7A

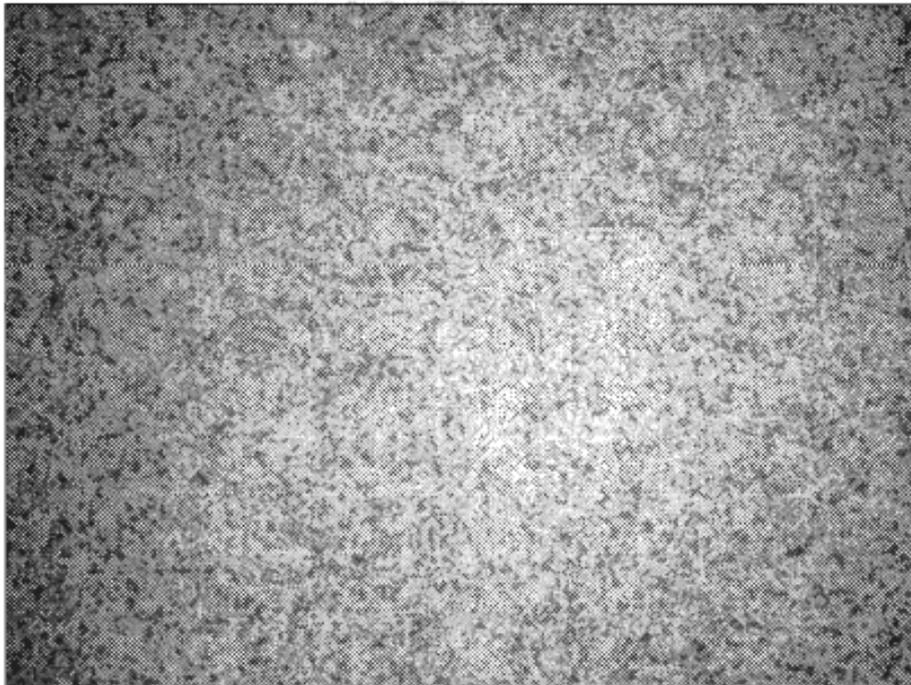


FIG. 7B

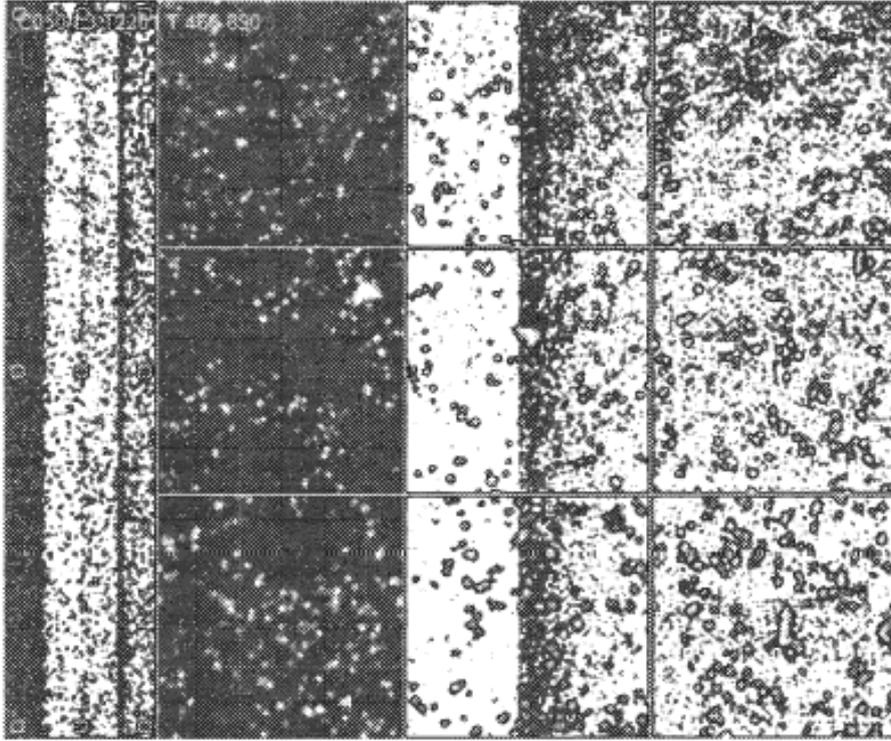


FIG. 8A

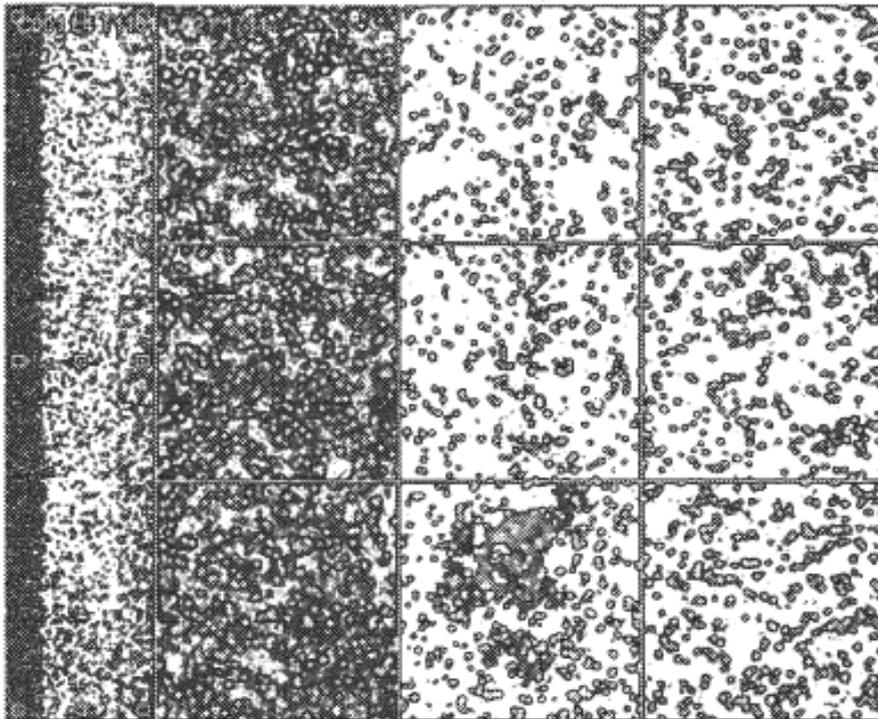


FIG. 8B

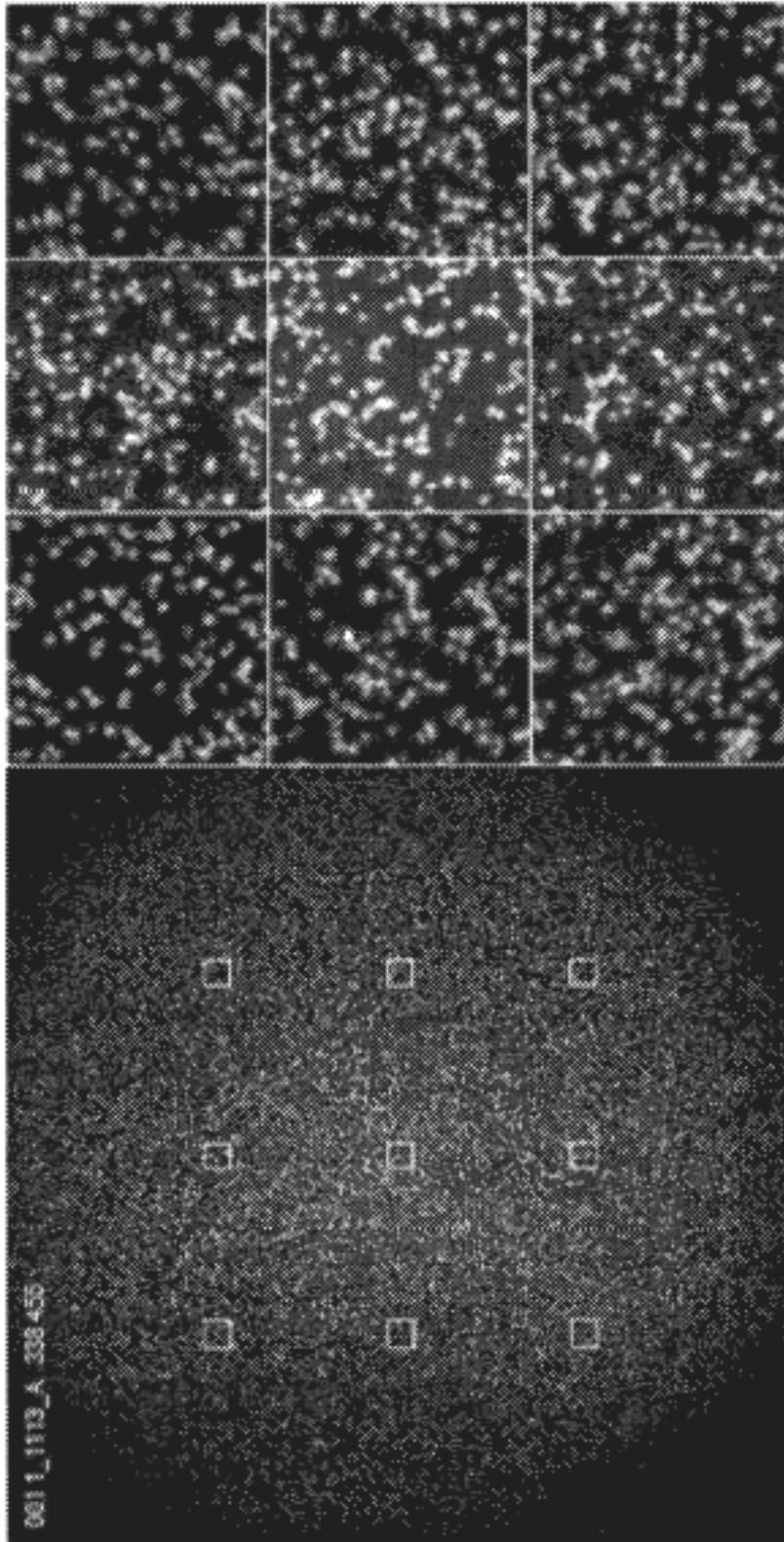


FIG. 9