

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 772 127**

51 Int. Cl.:

C40B 50/18 (2006.01)

C08F 8/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2015** **PCT/EP2015/074759**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2016** **WO16066586**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2015** **E 15791538 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019** **EP 3212684**

54 Título: **Polímeros y recubrimientos de copolímeros de ADN**

30 Prioridad:

31.10.2014 US 201462073764 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.07.2020

73 Titular/es:

ILLUMINA CAMBRIDGE LIMITED (100.0%)
19 Granta Park, Great Abington
Cambridge CB21 6DF, GB

72 Inventor/es:

BROWN, ANDREW A.;
GEORGE, WAYNE N.;
RICHEZ, ALEXANDRE;
DINGWALL, ANNE-CECILE y
VON HATTEN, XAVIER

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 772 127 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

Polímeros y recubrimientos de copolímeros de ADN

Campo

- 5 En general, la presente solicitud se refiere a los campos de la química, biología y ciencia de los materiales. Más específicamente, la presente solicitud se refiere a nuevos recubrimientos de polímeros y copolímeros de ADN injertado para soportar la funcionalización de la superficie del sustrato y aplicaciones secuencia abajo, tales como la secuenciación de ADN y otras aplicaciones de diagnóstico. También se describen métodos para preparar dicha superficie funcionalizada y su uso.

Antecedentes

- 10 Los sustratos recubiertos con polímeros o hidrogeles se usan en muchas aplicaciones tecnológicas. Por ejemplo, los dispositivos médicos implantables se pueden recubrir con polímeros biológicamente inertes. En otro ejemplo, se usan sustratos recubiertos con 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 cadenas de ácido nucleico a una superficie recubierta de polímero o hidrogel de un sustrato. Las secuencias de las cadenas de
- 15 ácido nucleico unidas se pueden entonces determinar por una serie de métodos diferentes que son bien conocidos en la técnica.

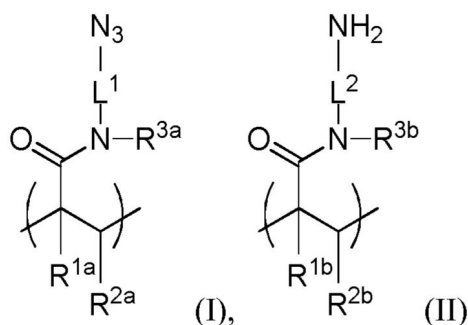
En ciertos procedimientos de Secuenciación por Síntesis ("SBS"), una o más superficies de una celda de flujo se recubren con un polímero o un hidrogel en que luego se injertan cebadores (ADN monocatenario o ADNmc). Sin embargo, hay un coste inherente asociado con llevar a cabo las etapas de recubrimiento, injerto y control de calidad.

- 20 El documento WO2013/184796A describe polímeros para la funcionalización de superficies, y es útil para comprender la presente invención.

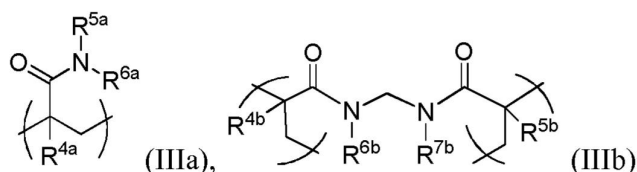
Compendio

- La presente solicitud describe recubrimientos poliméricos que son útiles para aplicaciones de SBS y procedimientos de incorporación de las etapas de acoplamiento de polímero cebador en la síntesis inicial de polímeros. Esto puede
- 25 eliminar parte o todo el procedimiento de injertado realizado para fabricar una celda de flujo de secuenciación u otro sustrato usado para la SBS. Estos procedimientos pueden maximizar la accesibilidad del cebador a la bioquímica secuencia abajo, minimizar las reacciones secundarias y producir una química de superficie más eficaz. Los recubrimientos y procedimientos descritos en la presente memoria son útiles para otros aparatos y procedimientos analíticos que incluyen, pero no se limitan a, los usados para la síntesis o detección de ácidos nucleicos y otras moléculas biológicamente activas.
- 30

Un aspecto de la presente invención descrita en la presente memoria se refiere a un polímero para la funcionalización de superficies, que comprende una unidad repetitiva de fórmula (I) y una unidad repetitiva de fórmula (II):



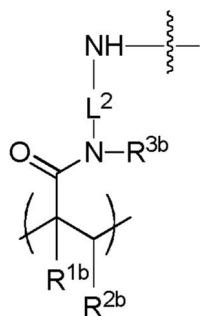
- 35 en donde cada R^{1a} , R^{2a} , R^{1b} y R^{2b} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido o fenilo opcionalmente sustituido; cada R^{3a} y R^{3b} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, fenilo opcionalmente sustituido o aralquilo C_{7-14} opcionalmente sustituido; y cada L^1 y L^2 se selecciona independientemente de un conector alquileo opcionalmente sustituido o un conector heteroalquileo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, el polímero puede comprender además una o más unidades repetitivas seleccionadas del grupo que consiste en poli(acrilamidas, poli(acrilatos, poli(uretanos, poli(siloxanos, siliconas, poli(acroleínas, poli(fosfacenos, poli(isocianatos, poli(oles y poli(sacáridos, o combinaciones de los mismos. En algunas
- 40 de dichas realizaciones, el polímero puede comprender además una o más unidades repetitivas de poli(acrilamida de fórmula (IIIa) o (IIIb) o ambas:



en donde cada R^{4a} , R^{4b} y R^{5b} se selecciona de hidrógeno o alquilo C_{1-3} ; y cada R^{5a} , R^{6a} , R^{6b} y R^{7b} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido o fenilo opcionalmente sustituido.

Otro aspecto descrito en la presente memoria se refiere a un sustrato que tiene una primera superficie que comprende un polímero con una unidad repetitiva de fórmula (I) y una unidad repetitiva de fórmula (II) como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, el polímero puede comprender además una o más unidades repetitivas de varias cadenas principales de polímeros diferentes como se ha descrito antes, por ejemplo, una o más unidades repetitivas de poliacrilamida de fórmula (IIIa) o (IIIb) o ambas.

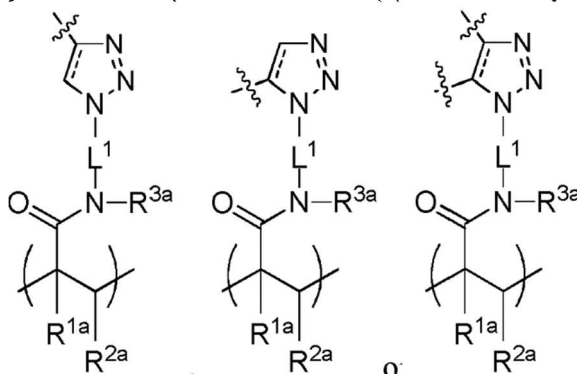
En algunas realizaciones, cuando el polímero se une covalentemente a la primera superficie del sustrato, se forma al menos un enlace covalente entre el grupo amino de la unidad repetitiva de fórmula (II) y la primera superficie del sustrato. Por lo tanto, como se describe en la presente memoria, debe entenderse que un sustrato que tiene una primera superficie que comprende un polímero con una unidad repetitiva de fórmula (I) y una unidad repetitiva de fórmula (II) unida covalentemente al mismo, también incluye el polímero con una unidad repetitiva modificada de la



estructura, que muestra la posición de unión covalente con la superficie del sustrato.

Algunas realizaciones descritas en la presente memoria están relacionadas con un polímero injertado que comprende oligonucleótidos funcionalizados unidos covalentemente a un polímero con una unidad repetitiva de fórmula (I) y una unidad repetitiva de fórmula (II) como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, el polímero puede comprender además una o más unidades repetitivas de varias cadenas principales de polímeros diferentes como se ha descrito antes, por ejemplo, una o más unidades repetitivas de poliacrilamida de fórmula (IIIa) o (IIIb) o ambas.

En algunas realizaciones, cuando los oligonucleótidos funcionalizados se unen covalentemente al polímero, se forman al menos dos enlaces covalentes como resultado de una reacción entre el grupo azido de la unidad repetitiva de fórmula (I) y un oligonucleótido funcionalizado. Por lo tanto, como se describe en el presente documento, debe entenderse que un polímero injertado que comprende oligonucleótidos funcionalizados unidos covalentemente a un polímero de una unidad repetitiva de fórmula (I) y una unidad repetitiva de fórmula (II) también incluye el polímero con



una unidad repetitiva modificada de estructura, que muestra la posición del enlace covalente con el oligonucleótido funcionalizado, en donde ----- es un enlace sencillo o doble.

Algunas realizaciones descritas en la presente memoria están relacionadas con procedimientos para inmovilizar un polímero injertado en una primera superficie de un sustrato, que comprenden:

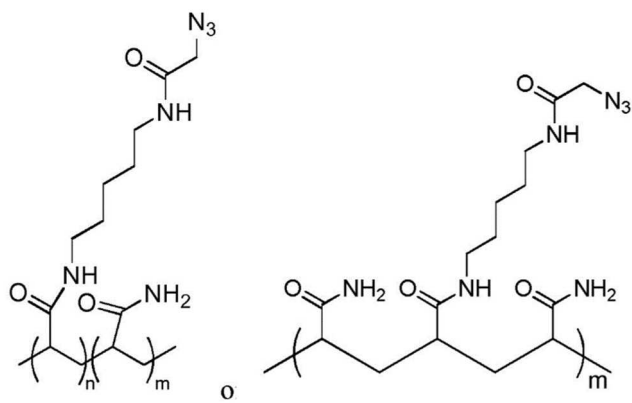
proporcionar un sustrato que tiene una primera superficie que comprende una primera pluralidad de grupos

funcionales unidos covalentemente a la misma;

proporcionar un polímero injertado que comprende oligonucleótidos funcionalizados unidos covalentemente a un polímero, en donde el polímero comprende una segunda pluralidad de grupos funcionales; y

- 5 hacer reaccionar la primera pluralidad de grupos funcionales de la primera superficie con la segunda pluralidad de grupos funcionales del polímero de modo que el polímero se une covalentemente a la primera superficie del sustrato.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, cuando la superficie se trata con silano funcionalizado que comprende restos insaturados seleccionados de cicloalquenos, cicloalquinos, heterocicloalquenos, heterocicloalquinos; y los oligonucleótidos funcionalizados comprenden biciclo[6.1.0]non-4-ino; entonces el polímero
10 no es una poli(N-(5-azidoacetamidilpentil)acrilamida-co-acrilamida) (PAZAM) de la siguiente estructura:



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. En algunas de dichas realizaciones, los restos insaturados del silano funcionalizado comprenden norborneno.

- 15 Algunas realizaciones descritas en la presente memoria están relacionadas con procedimientos o métodos para inmovilizar un polímero descrito en la presente memoria en una primera superficie de un sustrato, que comprende: proporcionar un sustrato que tiene una primera superficie que comprende una primera pluralidad de grupos funcionales unidos covalentemente a la misma; proporcionar un polímero descrito en la presente memoria; y hacer reaccionar la primera pluralidad de grupos funcionales de la primera superficie con el polímero de manera que el polímero se une covalentemente a la primera superficie del sustrato.

20 Breve descripción de los dibujos

Las figs. 1A a 1D muestra la imagen de fluorescencia de Typhoon de la celda de flujo recubierta de polímero con superficie de monocapa de norborneno-silano y la gráfica de barras relacionada de la mediana de la intensidad de Typhoon de los polímeros del Ejemplo 1 (Tabla 2).

- 25 Las figs. 2A a 2D muestran la imagen de fluorescencia de Typhoon de la celda de flujo recubierta de polímero con superficie de monocapa de norborneno-silano y la gráfica de barras relacionada de la mediana de la intensidad de Typhoon de los polímeros del Ejemplo 1 (Tabla 3).

La fig. 3A es una recta y gráfica de barras que ilustra los datos de intensidad de TET QC (Tabla 4) después de recubrir una superficie de norborneno con diferentes polímeros como se da en el Ejemplo 1 (Tabla 2) y el porcentaje de pérdida de superficie medido después de una prueba de tensión térmica.

- 30 La fig. 3B es una recta y gráfica de barras que ilustra los datos de intensidad de TET QC (Tabla 5) después de recubrir una superficie epoxídica con diferentes polímeros como se da en el Ejemplo 1 (Tabla 3) y porcentaje de pérdida de superficie medido después de una prueba de tensión térmica.

- 35 Las figs. 4A a 4D muestran la imagen de fluorescencia de Typhoon de la celda de flujo recubierta de polímeros con superficie de monocapa de norborneno-silano y la gráfica de barras relacionada de la intensidad mediana de Typhoon de los polímeros del Ejemplo 1 (Tabla 6).

La fig. 4E es una recta y gráfica de barras que ilustra los datos de intensidad de TET QC (Tabla 7) después de recubrir una superficie de norborneno con diferentes polímeros como se da en el Ejemplo 1 (Tabla 6) y el porcentaje de pérdida de superficie medido después de una prueba de tensión térmica.

- 40 La fig. 5 muestra una serie de imágenes de RMN de una reacción entre el norborneno y una biperidil-tetrazina en diferentes puntos de tiempo.

La fig. 6 muestra una gráfica de líneas del patrón de absorción de aUV-Vis de una reacción entre bipiridil-tetrazina y biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il-metanol.

La fig. 7 muestra la reacción de acoplamiento entre un dendrímero injertado y un dendrímero funcionalizado con grupos de unión a la superficie.

5 Descripción detallada

La presente solicitud se refiere a ácido nucleico-copolímeros (por ejemplo, ADN-copolímeros y procedimientos para injertar dichos ácido nucleico-copolímeros en la superficie de un sustrato. Algunas realizaciones de polímeros usados para la conjugación previa con cebadores de ADN monocatenario ("ADNmc") incluyen copolímeros ternarios de acrilamida/azido-acrilamida/aminoetilacrilamida, poli(acrilamida modificada con tetrazina y los productos de reacción de poli(metacrilato de glicidilo) con amino-PEG-azida o amino-PEG-Boc-amida. El ácido nucleico-copolímero después se puede unir covalentemente a una superficie de un sustrato, en algunos casos, una superficie de un sustrato funcionalizada con silano, tal como una superficie de una celda de flujo o una superficie de una matriz molecular. La presente descripción también se refiere a métodos para preparar dichas superficies recubiertas con ácido nucleico-copolímero y a métodos para usar sustratos que comprenden dichas superficies recubiertas con ácido nucleico-copolímero en reacciones de secuenciación por síntesis.

Algunas realizaciones se refieren a celdas de flujo para llevar a cabo reacciones de secuenciación por síntesis que incluyen oligonucleótidos funcionalizados preconjugados con un polímero descrito en la presente memoria por uno o más restos funcionales, tales como biciclo[6.1.0]non-4-ino, alquino, amido o enlace derivado de azido. En algunas realizaciones, los cebadores son un cebador P5 o P7. Los cebadores P5 y P7 se usan en la superficie de celdas de flujo comerciales vendidas por Illumina Inc. para la secuenciación en las plataformas HiSeq®, MiSeq®, NextSeq® y Genome Analyzer®.

Se pueden lograr procedimientos adicionales y ahorros de coste incorporando marcadores de control de calidad (QC) dentro del polímero junto con la unión del cebador. Se pueden usar ensayos analíticos para determinar la calidad y la consistencia del ADN-copolímero con o sin marcadores de QC, y se pueden usar nuevamente para determinar la eficacia de la deposición cuando se trabaja con un formato de oblea abierta. Estos puntos de control adicionales del control de calidad deberían reducir la variación de lote a lote de celdas de flujo para producir productos más consistentes, y también ayudar a reducir dónde se ha producido la desviación del procedimiento cuando aparecen fallos durante la fabricación.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia. El uso del término "incluyendo" así como otras formas, tales como "incluir", "incluye" e "incluido" no es limitante. El uso del término "tener" así como otras formas, tales como "tener", "tiene" y "tenía" no es limitante. Como se usa en esta memoria descriptiva, ya sea en una frase de transición o en el cuerpo de la reivindicación, los términos "comprende(n)" y "comprender" deben interpretarse como que tienen un significado abierto. Es decir, los términos anteriores se deben interpretar como sinónimos con las frases "que tiene al menos" o "que incluye al menos". Por ejemplo, cuando se usa en el contexto de un procedimiento, el término "que comprende" significa que el procedimiento incluye al menos las etapas citadas, pero puede incluir etapas adicionales. Cuando se usa 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.

Como se usa en la presente memoria, las abreviaturas orgánicas comunes se definen como sigue:

Ac Aceto

Ac₂O Anhídrido acético

APTS aminopropil-silano

45 APES (3-aminopropil)triétoxissilano

APTMS (3-aminopropil)trimetoxissilano

ac. Acuoso

ATRP Polimerización radicalica por transferencia de átomos

Azapa N-(5-azidoacetamidilpentil)acrilamida

50 BCN Biciclo[6.1.0]non-4-ino

Bn bencilo

	Brapa o BRAPA	N-(5-bromoacetamidilpentil)acrilamida
	Bz	Benzoilo
	BOC o Boc	terc-butoxicarbonilo
	Bu	n-butilo
5	cat.	Catalítico
	CMP	Pulido mecánico químico
	CRP	Polimerización radicalica controlada
	CVD	Deposición química de vapor
	°C	Temperatura en grados centígrados
10	dATP	trifosfato de desoxiadenosina
	dCTP	Trifosfato de desoxicitidina
	dGTP	Trifosfato de desoxiguanosina
	dTTP	Trifosfato de desoxitimidina
	DCA	Ácido dicloroacético
15	DCE	1,2-dicloroetano
	DCM	cloruro de metileno
	DIEA	Diisopropiletilamina
	DIPEA	Diisopropiletilamina
	DMA	Dimetilacetamida
20	DME	Dimetoxietano
	DMF	N,N'-Dimetilformamida
	DMSO	Dimetilsulfóxido
	DPPA	Difenilfosforilazida
	Et	etilo
25	EtOAc o EA	Acetato de etilo
	g	Gramo(s)
	h	Hora(s)
	iPr	isopropilo
	KPi	Tampón de fosfato de potasio 10 mM a pH 7.0
30	KPS	persulfato de potasio
	IPA	Alcohol isopropílico
	KPi	Tampón de fosfato potásico 10 mM a pH 7.0
	KPS	Persulfato potásico
	IPA	Alcohol isopropílico
35	IPHA.HCl	Hidrocloruro de N-isopropilhidroxilamina
	m o min	Minuto(s)

	MeOH	Metanol
	MeCN	Acetonitrilo
	ml	Mililitro(s)
	NaN ₃	Azida de sodio
5	NHS	N-hidroxisuccinimida
	NMP	Polimerización radicalica mediada por nitrógeno
	PAZAM	poli(N-(5-azidoacetamidilpentil)acrilamida-co-acrilamida) de cualquier relación de acrilamida a Azapa
	PEG	Polietilenglicol
	PG	Grupo de protección
10	PGMA	Poli(metacrilato de glicidilo)
	Ph	fenilo
	ppt	precipitado
	RAFT	Polimerización por transferencia de cadena de fragmentación por adición reversible
	t.a.	temperatura ambiente
15	SFA	Acrilamida libre de silano como se define en la Pub. de Pat. de EE.UU. n° 2011/0059865
	Sulfo-HSAB o SHSAB	N-hidroxisulfosuccinimidil-4-azidobenzoato
	TEA	Trietilamina
	Terc, t	terciario
	THF	Tetrahidrofurano
20	TEMED	Tetrametiletilendiamina
	YES	Yield Engineering Systems
	μl	Microlitro(s)

Como se usa en la presente memoria, el término "matriz" se refiere a una población de diferentes moléculas sonda que están unidas a uno o más sustratos de modo que las diferentes moléculas sonda se pueden diferenciar entre sí según la ubicación relativa. Una matriz puede incluir diferentes moléculas sonda que está ubicada cada una en una ubicación direccionable diferente sobre un sustrato. Alternativa o adicionalmente, una matriz puede incluir sustratos separados, que lleva cada uno una molécula sonda diferente, en donde las diferentes moléculas sonda se pueden identificar de acuerdo con las ubicaciones de los sustratos sobre una superficie a la que están unidos los sustratos o de acuerdo con las ubicaciones de los sustratos en un líquido. Las matrices de ejemplo en las que se ubican 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, US 2002/0102578 y publicación PCT N° WO 00/63437. Los formatos de ejemplo que se pueden usar en la invención para distinguir perlas en una matriz líquida, por ejemplo, usando un dispositivo microfluídico, tal como un separador de células activadas por fluorescencia (FACS), se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 6 524 793. Otros ejemplos de matrices que se pueden usar en la invención incluyen, sin limitación, las descritas 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 WO 93/17126; WO 95/11995; WO 95/35505; EP 742 287; y EP 799 897.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "unido covalentemente" o "con enlace covalente" se refiere a la formación de un enlace químico que se caracteriza por compartir pares de electrones entre átomos. Por ejemplo, un recubrimiento de polímero unido covalentemente se refiere a un recubrimiento de polímero 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, adhesión o interacción electrostática. Se apreciará que los polímeros que están unidos covalentemente a una superficie también se pueden unir a través de medios además de la unión covalente.

Como se usa en la presente memoria, "C_a a C_b" o "C_{a-b}" en los 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 C₁ a C₄" o "alquilo C₁₋₄", se refiere a todos los grupos alquilo que tienen de 1 a 4 carbonos, es decir, CH₃-, CH₃CH₂-, CH₃CH₂CH₂-, (CH₃)₂CH-, CH₃CH₂CH₂CH₂-, CH₃CH₂CH(CH₃)- y (CH₃)₃C-.

El término "halógeno" o "halogeno-", como se usa 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 el flúor y cloro.

Como se usa en la presente memoria, "alquilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada 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 "de 1 a 20" se refiere a cada número entero en el intervalo dado; p. ej., "de 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 C₁₋₄" o designaciones similares. Solo a modo de ejemplo, "alquilo C₁₋₄" 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 de ninguna manera a metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, butilo terciario, pentilo, hexilo y similares. El grupo alquilo puede estar opcionalmente sustituido.

Como se usa en la presente memoria, "alcoxi" se refiere a la fórmula -OR en donde R es un alquilo como se ha definido antes, tal como "alcoxi C₁₋₉", que incluye, pero no se limita a metoxi, etoxi, n-propoxi, 1-metiletoxi (isopropoxi), n-butoxi, iso-butoxi, sec-butoxi y terc-butoxi, y similares. El grupo alcoxi puede estar opcionalmente sustituido.

Como se usa en la presente memoria, "alquenilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que contiene uno o más dobles enlaces. El grupo alquenilo puede tener de 2 a 20 átomos de carbono, aunque la presente definición 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 también podría ser un alquenilo inferior que tiene 2 a 4 átomos de carbono. El grupo alquenilo se puede designar como "alquenilo C₂₋₄" o designaciones similares. Solo a modo de ejemplo, "alquenilo C₂₋₄" 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-4-ilo. Los grupos alquenilo típicos incluyen, pero no se limitan de ninguna manera a etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo y hexenilo, y similares. El grupo alquenilo puede estar opcionalmente sustituido.

Como se usa en la presente memoria, "alquinilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que contiene uno o más triples enlaces. 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 C₂₋₄" o designaciones similares. Solo a modo de ejemplo, "alquinilo C₂₋₄" 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 se limitan de ninguna manera a etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo y hexinilo, y similares. El grupo alquinilo puede estar opcionalmente sustituido.

Como se usa en la presente memoria, "heteroalquilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que contiene uno o más heteroátomos, es decir, un elemento distinto del carbono, incluyendo, pero no limitados 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 inferior que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. El grupo heteroalquilo se puede designar como "heteroalquilo C₁₋₄" o designaciones similares. El grupo heteroalquilo puede contener uno o más heteroátomos. Solo a modo de ejemplo, "heteroalquilo C₁₋₄" 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 usa en la presente memoria, "alquileo" significa un grupo químico dirradical 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 alquileo puede tener de 1 a 20 000 átomos de carbono, aunque la presente definición también cubre la aparición del término alquileo donde no se designa un intervalo numérico. El grupo alquileo también puede ser un alquileo de tamaño medio que tiene de 1 a 9 átomos de carbono. El grupo alquileo también podría ser un alquileo inferior que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. El grupo alquileo se puede designar como "alquileo C₁₋₄" o designaciones similares. Solo a modo de ejemplo, "alquileo C₁₋₄" indica que hay de uno a cuatro átomos de carbono en la cadena de alquileo, es decir, la cadena de alquileo 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 usa en la presente memoria, el término "heteroalquileo" se refiere a una cadena de alquileo en la que uno o más átomos de la cadena principal del alquileo se seleccionan de un átomo distinto del carbono, p. ej., oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo o combinaciones de los mismos. La cadena de heteroalquileo puede tener una longitud de 2 a 20 000. Heteroalquileos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, $-\text{OCH}_2-$, $-\text{OCH}(\text{CH}_3)-$, $-\text{OC}(\text{CH}_3)_2-$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}-$, $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{SCH}_2-$, $-\text{SCH}(\text{CH}_3)-$, $-\text{SC}(\text{CH}_3)_2-$, $-\text{SCH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NHCH}_2-$, $-\text{NHCH}(\text{CH}_3)-$, $-\text{NHC}(\text{CH}_3)_2-$, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{NHCH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$, y similares.

Como se usa en la presente memoria, "alquenileno" significa un grupo químico dirradical 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 alquenileno puede tener de 2 a 20 000 átomos de carbono, aunque la presente definición también cubre la aparición del término alquenileno donde no se designa un intervalo numérico. El grupo alquenileno también puede ser un alquenileno de tamaño medio que tiene de 2 a 9 átomos de carbono. El grupo alquenileno también podría ser un alquenileno inferior que tiene de 2 a 4 átomos de carbono. El grupo alquenileno se puede designar como "alquenileno C_{2-4} " o designaciones similares. Solo a modo de ejemplo, "alquenileno C_{2-4} " indica que hay de dos a cuatro átomos de carbono en la cadena de alquenileno, es decir, la cadena de alquenileno 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 usa en la presente memoria, "alquinileno" significa un grupo químico dirradical 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 tanto grupos aromáticos carbocíclicos (p. ej., fenilo) como grupos aromáticos heterocíclicos (p. ej., piridina). El término incluye grupos monocíclicos o policíclicos de anillos condensados (es decir, anillos que comparten pares de átomos adyacentes) con la condición de que todo el sistema de anillos sea aromático.

Como se usa en la presente memoria, "arilo" se refiere a un anillo aromático o sistema de anillos (es decir, dos o más anillos condensados que comparten dos átomos de carbono adyacentes) que contienen solo carbono en la cadena principal del anillo. 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_{6-10})", "arilo C_6 a C_{10} ", o designaciones similares. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, pero no se limitan a fenilo, naftilo, azulenilo y antracenilo. El grupo arilo puede estar opcionalmente sustituido.

Como se usa 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 usa en la presente memoria, "aralquilo" o "arialquilo" es un grupo arilo conectado, como un sustituyente, a través de un grupo alquileo, tal como "aralquilo C_{7-14} " 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 inferior (es decir, un grupo alquileo C_{1-4}).

Como se usa en la presente memoria, "heteroarilo" se refiere a un anillo aromático o sistema de anillos (es decir, dos o más anillos condensados que comparten dos átomos adyacentes) que contiene(n) uno o más heteroátomos, es decir, un elemento distinto de carbono, que incluyen, pero no se limitan a nitrógeno, oxígeno y azufre, en la cadena principal del anillo. 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 componen la cadena principal del anillo, incluyendo átomos de carbono y heteroátomos), aunque la presente definición también cubre la aparición del 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 designaciones 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, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, quinolinilo, isoquinilililo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, indolilo, isoindolilo y benzotienilo. El grupo heteroarilo puede estar opcionalmente sustituido.

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

Un "heteroaralquilo" o "heteroarilalquilo" es un grupo heteroarilo conectado, como un 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 C₁₋₄).

Como se usa en la presente memoria, "carbociclilo" significa un anillo cíclico o sistema de anillos no aromático que contiene solo átomos de carbono en la cadena principal del sistema de anillos. Cuando el carbociclilo es un sistema de anillos, dos o más anillos pueden estar unidos entre sí de forma condensada, con puente o espiro. Los carbociclicos pueden tener cualquier grado de saturación con la condición de 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 presente definición también cubre la aparición del término "carbociclilo", donde no se designa un intervalo numérico. El grupo carbociclilo también puede ser un carbociclilo de tamaño medio que tiene de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 átomos de carbono. El grupo carbociclilo se puede designar como "carbociclilo C₃₋₆" 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.

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

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

Como se usa en la presente memoria, "cicloalqueno" o "cicloalqueno" significa un anillo o sistema de anillos de carbociclilo 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.

Como se usa en la presente memoria, "heterocicloalqueno" o "heterocicloalqueno" significa un anillo o sistema de anillos de carbociclilo con al menos un heteroátomo en la cadena principal del anillo, que tiene al menos un doble enlace, en donde ningún anillo en el sistema de anillos es aromático. En algunas realizaciones, el anillo o sistema de anillos de heterocicloalqueno o heterocicloalqueno es de 3 miembros, 4 miembros, 5 miembros, 6 miembros, 7 miembros, 8 miembros, 9 miembros o 10 miembros.

Como se usa en la presente memoria, "cicloalquino" o "cicloalquino" significa un anillo o sistema de anillos de carbociclilo 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 usa en la presente memoria, "heterocicloalquino" o "heterocicloalquino" significa un anillo o sistema de anillos de carbociclilo con al menos un heteroátomo en la cadena principal del anillo, que tiene al menos un enlace triple, en donde ningún anillo en el sistema de anillos es aromático. En algunas realizaciones, el anillo o sistema de anillos del heterocicloalquino o heterocicloalquino es de 3 miembros, 4 miembros, 5 miembros, 6 miembros, 7 miembros, 8 miembros, 9 miembros o 10 miembros.

Como se usa en la presente memoria, "heterociclilo" significa un anillo cíclico o sistema de anillos no aromático que contiene al menos un heteroátomo en la cadena principal del anillo. Los heterociclicos pueden estar unidos entre sí de manera condensada, con puente o espiro. Los heterociclicos pueden tener cualquier grado de saturación con la condición de que al menos un anillo en el sistema de anillos no sea aromático. El(los) heteroátomo(s) pueden estar 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 la cadena principal del anillo, incluyendo 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 medio que tiene de 3 a 10 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(los) heteroátomo(s) se seleccionan de uno hasta tres de O, N o S, y en los heterociclicos monocíclicos preferidos de cinco miembros, el(los) heteroátomo(s) 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, cinolinilo, dioxolanilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, morfolinilo, oxiranilo, oxepanilo, tiepanilo, piperidinilo, piperazinilo, dioxopiperazinilo, pirrolidinilo, pirrolidionilo, pirrolidionilo, 4-piperidonilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, 1,3-dioxinilo, 1,3-dioxanilo, 1,4-dioxinilo, 1,4-dioxanilo, 1,3-oxatianilo, 1,4-oxatianilo, 1,4-oxatianilo, 2H-1,2-oxazinilo, trioxanilo, hexahidro-1,3,5-triazinilo, 1,3-dioxolilo, 1,3-dioxolanilo, 1,3-ditiolilo, 1,3-ditiolanilo, isoxazolinilo, isoxazolidinilo, oxazolinilo, oxazolidinilo, oxazolidinonilo, tiazolinilo, tiazolidinilo, 1,3-oxatiolanilo, indolinilo, isoindolinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidro-1,4-tiazinilo, tiamorfolinilo, dihidrobenzofuranilo, bencimidazolidinilo y tetrahidroquinolina.

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

Como se usa en la presente memoria, "acilo" se refiere a $C(=O)R$, en donde R es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , carbociclilo C_{3-7} , arilo C_{6-10} , 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.

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

Un grupo "C-carboxi" se refiere a un grupo " $-C(=O)OR$ " en el que R se selecciona de hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , carbociclilo C_{3-7} , arilo C_{6-10} , 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, $-C(=O)OH$).

- 10 Un grupo "acetal" se refiere a $RC(H)(OR')_2$, en el que R y R' se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , carbociclilo C_{3-7} , arilo C_{6-10} , 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 " $-CN$ ".

- 15 Un grupo "sulfino" se refiere a un grupo " $-S(=O)R$ " en el que R se selecciona de hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , carbociclilo C_{3-7} , arilo C_{6-10} , heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

Un grupo "sulfonilo" se refiere a un grupo " $-SO_2R$ " en el que R se selecciona de hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , carbociclilo C_{3-7} , arilo C_{6-10} , heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

- 20 Un grupo "S-sulfonamido" se refiere a un grupo " $-SO_2NR_AR_B$ " en el que R_A y R_B se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , carbociclilo C_{3-7} , arilo C_{6-10} , heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

- 25 Un grupo "N-sulfonamido" se refiere a un grupo " $-N(R_A)SO_2R_B$ " en el que R_A y R_B se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , carbociclilo C_{3-7} , arilo C_{6-10} , heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

Un grupo "O-carbamilo" se refiere a un grupo " $-OC(=O)NR_AR_B$ " en el que R_A y R_B se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , carbociclilo C_{3-7} , arilo C_{6-10} , heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

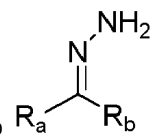
- 30 Un grupo "N-carbamilo" se refiere a un grupo " $-N(R_A)OC(=O)R_B$ " en el que R_A y R_B se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , carbociclilo C_{3-7} , arilo C_{6-10} , heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

Un grupo "C-amido" se refiere a un grupo " $-C(=O)NR_AR_B$ " en el que R_A y R_B se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , carbociclilo C_{3-7} , arilo C_{6-10} , heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

- 35 Un grupo "N-amido" se refiere a un grupo " $-N(R_A)C(=O)R_B$ " en el que R_A y R_B se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , carbociclilo C_{3-7} , arilo C_{6-10} , heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

- 40 Un grupo "amino" se refiere a un grupo " NR_AR_B " en el que R_A y R_B se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , carbociclilo C_{3-7} , arilo C_{6-10} , 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 $-NH_2$).

El término "hidrazina" o "hidrazinilo" como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo $-NHNH_2$.



El término "hidrazona" o "hidrazonilo" como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo $R_a-C(=N-NH_2)-R_b$.

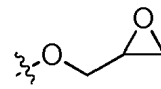
El término "formilo" como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo $-C(O)H$.

- 45 El término "hidroxi" como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo $-OH$.

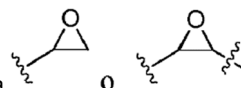
El término "azido" como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo $-N_3$.

El término "tiol" como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo -SH.

La expresión "éter de glicidilo" como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo



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



El término "éster" como se usa en la presente memoria se refiere a $R-C(=O)O-R'$, en donde R y R' pueden ser independientemente alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, cicloalquino, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, aralquilo, (heteroalíclico)alquilo, o variantes opcionalmente sustituidas de los mismos.

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

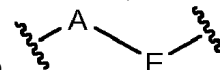
Como se usa en la presente memoria, el término "tetrazina" o "tetrazinilo" se refiere a un grupo heteroarilo de seis miembros que comprende cuatro átomos de nitrógeno. La tetrazina puede estar opcionalmente sustituida.

- Como se usa 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_1-C_6 , alqueno C_1-C_6 , alquino C_1-C_6 , heteroalquilo C_1-C_6 , carbocíclico C_3-C_7 (opcionalmente sustituido con, halógeno, alquilo C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 y haloalcoxi C_1-C_6), carbocíclico- C_3-C_7 -alquilo- C_1-C_6 (opcionalmente sustituido con halógeno, alquilo C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 y haloalcoxi C_1-C_6), heterocíclico de 5-10 miembros (opcionalmente sustituido con halógeno, alquilo C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 y haloalcoxi C_1-C_6), heterocíclico-alquilo- C_1-C_6 (opcionalmente sustituido con halógeno, alquilo C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 y haloalcoxi C_1-C_6), arilo (opcionalmente sustituido con halógeno, alquilo C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 y haloalcoxi C_1-C_6), aril-alquilo(C_1-C_6) (opcionalmente sustituido con halógeno, alquilo C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 y haloalcoxi C_1-C_6), heteroarilo de 5-10 miembros (opcionalmente sustituido con halógeno, alquilo C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 y haloalcoxi C_1-C_6), (heteroaril de 5-10 miembros)-alquilo(C_1-C_6) (opcionalmente sustituido con halógeno, alquilo C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 y haloalcoxi C_1-C_6), halógeno, ciano, hidroxilo, alcoxi C_1-C_6 , alcoxi(C_1-C_6)-alquilo(C_1-C_6) (es decir, éter), ariloxi, sulfhidrilo (mercapto), haloalquilo C_1-C_6 (p. ej., $-CF_3$), haloalcoxi C_1-C_6 (p. ej., $-OCF_3$), alquilo C_1-C_6 , ariloxi, amino, aminoalquilo C_1-C_6 , 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, sulfinilo, sulfonilo y oxo ($=O$). Siempre que un grupo se describa como "opcionalmente sustituido", ese grupo puede estar sustituido con los sustituyentes anteriores.

- Se debe entender que los determinados convenios de nomenclatura de radicales pueden incluir un monorradical o un dirradical 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 dirradical. Por ejemplo, un sustituyente identificado como alquilo que requiere dos puntos de unión incluye dirradicales tales como $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)CH_2-$, y similares. Otros convenios de nomenclatura de radicales indican claramente que el radical es un dirradical tal como "alquilenilo" o "alquilenilo".

- Se debe entender que cuando un sustituyente se representa como un dirradical (es decir, tiene dos puntos de unión al resto de la molécula), el sustituyente puede estar unido 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 **A** está unido al punto de unión más a la izquierda de la molécula, así como el caso en el que **A** está unido al punto de unión más a la derecha de la molécula.

- Cuando los compuestos descritos en la presente memoria tienen al menos un estereocentro, pueden existir como enantiómeros y diastereoisómeros individuales o como mezclas de dichos isómeros, incluyendo los racematos. La separación de los isómeros individuales o la síntesis selectiva de los isómeros individuales se lleva a cabo por aplicación de varios métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica. A menos que se indique lo contrario, todos dichos isómeros y mezclas de los mismos 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.

Como se usa en la presente memoria, un "nucleótido" incluye una base heterocíclica que contiene nitrógeno, un azúcar y uno o más grupos fosfato. Pueden ser unidades monoméricas (sean precursores o monómeros unidos) 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 las mismas. Las bases pirimidínicas incluyen citosina (C), timina (T) y uracilo (U), y derivados modificados o análogos de las mismas. El átomo C-1 de la desoxirribosa se une a N-1 de una pirimidina o a N-9 de una purina.

Como se usa en la presente memoria, un "nucleósido" es estructuralmente similar a un nucleótido, pero carece de cualquier resto de fosfato en la posición 5'. El término "nucleósido" se usa 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 por un carbono y/o un carbono se ha reemplazado por un átomo de azufre u oxígeno. Un "nucleósido" es un monómero que puede tener una base sustituida y/o un resto de azúcar. Además, un nucleósido se puede incorporar en polímeros y oligómeros de ADN y/o ARN más grandes.

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

Como se usa en la presente memoria, el término "cebador" se define como un ácido nucleico que tiene una sola cadena con un grupo 3' OH libre. Un cebador también puede tener una modificación en el extremo 5' para permitir una reacción de acoplamiento o para acoplar el cebador con otro resto. La longitud del cebador puede ser de cualquier número de bases y puede incluir una variedad de nucleótidos no naturales. Como se usa en la presente memoria, "cebador BCN" o "cebador modificado BCN" se refiere a un cebador que comprende biciclo[6.1.0]non-4-ino unido covalentemente al extremo 5'.

Como se usa 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 SiH_4 , o 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 $\text{X-R}^{\text{C}}\text{-Si(OR}^{\text{D}}\text{)}_3$, en donde X es un grupo orgánico no hidrolizable, tal como amino, vinilo, epoxi, metacrilato, azufre, alquilo, alquenilo, alquinilo; R^{C} es un espaciador, por ejemplo $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$, en donde n es de 0 a 1000; R^{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 usa en la presente memoria, el término "polímero" se refiere a una molécula compuesta por muchas subunidades repetidas o unidades repetitivas. Ejemplos no limitantes de estructuras de polímeros incluyen polímeros lineales, ramificados o hiperramificados. Ejemplos no limitantes de polímeros lineales que comprenden copolímeros de bloque o copolímeros aleatorios. Los ejemplos no limitantes de polímeros ramificados incluyen polímeros en estrella, polímeros en forma de estrella o en bloque de estrella que comprenden segmentos tanto hidrófobos como hidrófilos, polímeros en forma de H que comprenden segmentos tanto hidrófobos como hidrófilos, polímeros en forma de mancuerna, polímeros en peine, polímeros en cepillo, polímeros dendronizados, en escalera y dendrímeros. Los polímeros descritos en la presente memoria también pueden estar en forma de nanopartículas de polímeros. Otros ejemplos de arquitecturas de polímeros incluyen, pero no se limitan a polímeros de bloques de anillo, polímeros de espiral-ciclo-espiral, etc.

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

Como se usa en la presente memoria, la expresión "método YES" se refiere a la herramienta de deposición química de vapor proporcionada por Yield Engineering Systems ("YES") con un procedimiento de deposición química de vapor desarrollado por Illumina, Inc. Incluye tres sistemas diferentes de deposición de vapor. El sistema automático de vapor de silano YES-VertaCoat está diseñado para la producción en masa con un módulo flexible de manejo de obleas que

puede acomodar obleas de 200 o 300 mm. El sistema de vapor de silano YES-1224P de carga manual está diseñado para una producción en masa versátil con sus cámaras configurables de gran capacidad. Yes-LabKote es una versión de sobremesa de bajo coste que es ideal para estudios de viabilidad y para RyD.

- 5 Como se usa en la presente memoria, la expresión "porcentaje de superficie restante" se puede referir a la intensidad medida usando un TET QC para teñir los cebadores de superficie P5/P7. Los cebadores P5 y P7 se usan en 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 cebadores se describen en la Pub. de patente de EE.UU. N° 2011/0059865 A1. Las secuencias de cebador P5 y P7 comprenden lo siguiente:

Conjunto de extremos emparejados:

- 10 P5: extremo emparejado 5' → 3'

AATGATACGGCGACCACCGAGAUCTACAC

P7: extremo emparejado 5' → 3'

CAAGCAGAAGACGGCATACGAG*AT

Conjunto de lectura única:

- 15 P5: lectura única: 5' → 3'

AATGATACGGCGACCACCGA

P7: lectura única 5' → 3'

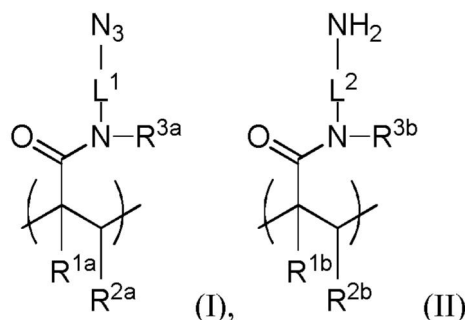
CAAGCAGAAGACGGCATACGA

- 20 En algunas realizaciones, los cebadores P5 y P7 pueden comprender un conector o espaciador en el extremo 5'. Dicho conector o espaciador se puede incluir con el fin de permitir la escisión, o para conferir alguna otra propiedad deseable, por ejemplo, para permitir la unión covalente a un polímero o un soporte sólido, o para actuar como espaciadores para situar el sitio de escisión a una distancia óptima del soporte sólido. En ciertos casos, se pueden colocar 10 nucleótidos espaciadores entre el punto de unión de los cebadores P5 o P7 a un polímero o un soporte sólido. En algunas realizaciones se usan espaciadores poliT, aunque también se pueden usar otros nucleótidos y combinaciones de los mismos. En una realización, el espaciador es un espaciador 10T. TET es un oligonucleótido marcado con colorante que tiene una secuencia complementaria de los cebadores P5/P7. TET se puede hibridar con los cebadores P5/P7 en una superficie; el exceso de TET se puede separar por lavado, y la concentración de colorante unido se puede medir por detección de fluorescencia usando un instrumento de barrido tal como un Typhoon Scanner (General Electric).

Polímeros y copolímeros de ADN

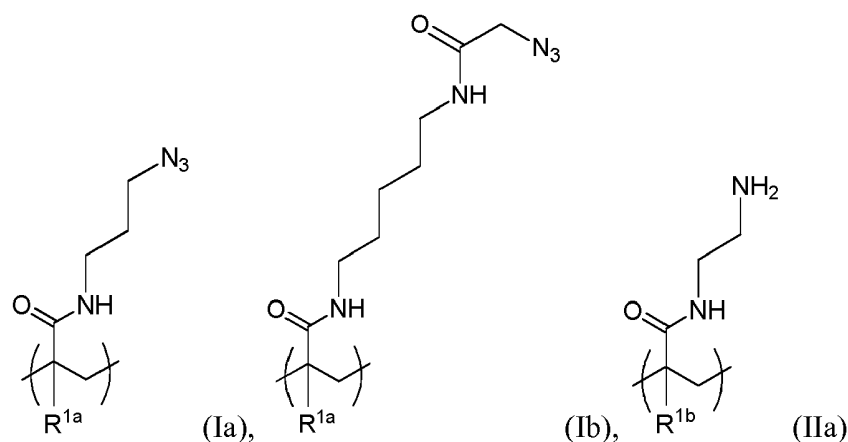
- 30 Polímeros y copolímeros de ácidos nucleicos con unidades repetitivas de fórmulas (I) y (II)

Algunas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a un polímero para la funcionalización de superficies, que comprende una unidad repetitiva de fórmula (I) y una unidad repetitiva de fórmula (II) como se ha descrito antes.



- 35 en donde cada R^{1a} , R^{2a} , R^{1b} y R^{2b} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido o fenilo opcionalmente sustituido; cada R^{3a} y R^{3b} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, fenilo opcionalmente sustituido o aralquilo C_{7-14} opcionalmente sustituido; y cada L^1 y L^2 se selecciona independientemente de un conector alquilenos opcionalmente sustituido o un conector heteroalquilenos opcionalmente sustituido.
- 40 En algunas realizaciones, R^{1a} es hidrógeno. En algunas realizaciones, R^{2a} es hidrógeno. En algunas realizaciones,

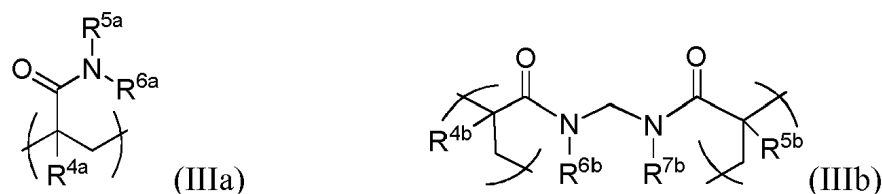
R^{3a} es hidrógeno. En algunas realizaciones, R^{1a} se selecciona de hidrógeno o alquilo opcionalmente sustituido, preferiblemente alquilo C_{1-6} y cada uno de R^{2a} y R^{3a} es hidrógeno. En algunas realizaciones, cada uno de R^{1a} , R^{2a} y R^{3a} es hidrógeno. En algunas realizaciones, R^{1b} es hidrógeno. En algunas realizaciones, R^{2b} es hidrógeno. En algunas realizaciones, R^{3b} es hidrógeno. En algunas realizaciones, R^{1b} se selecciona de hidrógeno o alquilo opcionalmente sustituido, preferiblemente alquilo C_{1-6} y cada uno de R^{2b} y R^{3b} es hidrógeno. En algunas realizaciones, cada uno de R^{1b} , R^{2b} y R^{3b} es hidrógeno. En algunas realizaciones, L^1 es un alquileo opcionalmente sustituido. En algunas de dichas realizaciones, L^1 es metileno opcionalmente sustituido. En algunas otras realizaciones, L^1 es etileno opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones adicionales, L^1 es propileno opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, L^1 es un conector heteroalquileo opcionalmente sustituido. En algunas de dichas realizaciones, L^1 es $-(CH_2)_m-NH-(CH_2)_n-$ opcionalmente sustituido con uno o más grupos oxo, y en donde cada m y n es un número entero independientemente seleccionado de 1 a 10. En algunas realizaciones, L^2 es un alquileo opcionalmente sustituido. En algunas de dichas realizaciones, L^2 es metileno opcionalmente sustituido. En algunas otras realizaciones, L^2 es etileno opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones adicionales, L^2 es propileno opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, la unidad repetitiva de fórmula (I) también está representada por la fórmula (Ia) o (Ib) y la fórmula (II) también está representada por la fórmula (IIa):



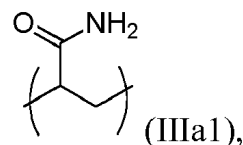
en donde

en donde cada R^{1a} y R^{1b} se selecciona de hidrógeno o metilo. En algunas realizaciones, el polímero comprende unidades repetitivas de fórmula (Ia) y (IIa). En algunas otras realizaciones, el polímero comprende unidades repetitivas de fórmula (Ib) y (IIa). En algunas realizaciones de la unidad repetitiva de fórmula (II) o (IIa), el grupo funcional amino está en forma de una sal inorgánica, por ejemplo, sal de hidrocloreuro. En algunas realizaciones, las unidades repetitivas de las fórmulas (I) y (II) tienen una relación molar de aproximadamente 1:1. En algunas de dichas realizaciones, las unidades repetitivas de las fórmulas (Ia) y (IIa) tienen una relación molar de aproximadamente 1:1. En algunas de dichas realizaciones, las unidades repetitivas de las fórmulas (Ib) y (IIa) tienen una relación molar de aproximadamente 1:1.

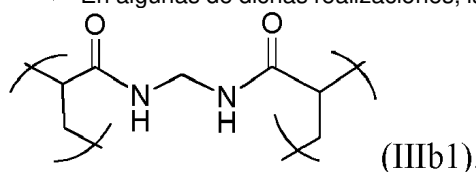
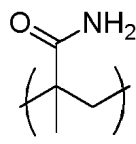
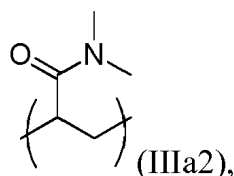
En algunas realizaciones, el polímero puede comprender además una o más unidades repetitivas seleccionadas del grupo que consiste en poliacrilamidas, poliacrilatos, poliuretanos, polisiloxanos, siliconas, poliactoleínas, polifosfacenos, poliisocianatos, polioles y polisacáridos, o combinaciones de los mismos. En algunas de dichas realizaciones, el polímero puede comprender además una o más unidades repetitivas de poliacrilamida de fórmula (IIIa) o (IIIb) o ambas:



en donde cada R^{4a} , R^{4b} y R^{5b} se selecciona de hidrógeno o alquilo C_{1-3} ; y cada R^{5a} , R^{6a} , R^{6b} y R^{7b} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido o fenilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, cada R^{4a} , R^{4b} y R^{5b} se selecciona de hidrógeno o metilo. En algunas realizaciones, R^{6b} y R^{7b} son ambos hidrógeno. En algunas realizaciones, al menos uno de R^{5a} o R^{6a} es hidrógeno. En algunas de dichas realizaciones, tanto R^{5a} como R^{6a} son hidrógeno. En algunas otras realizaciones, al menos uno de R^{5a} o R^{6a} es metilo. En algunas de dichas realizaciones, tanto R^{5a} como R^{6a} son metilo. En algunas de dichas realizaciones, las unidades repetitivas



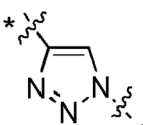
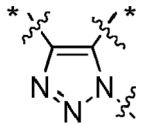
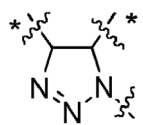
de fórmula (IIIa) también están representadas por (IIIa1), (IIIa2) o (IIIa3):

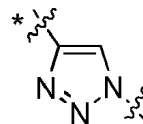


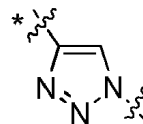
también está representada por (IIIb1):

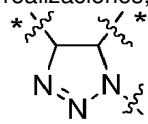
- En algunas realizaciones específicas, el polímero comprende unidades repetitivas de fórmulas (Ib), (IIa) y (IIIa). En algunas realizaciones adicionales, el polímero comprende unidades repetitivas de fórmulas (Ib), (IIa), (IIIa) y (IIIb). En algunas de dichas realizaciones, el porcentaje en moles de fórmula (IIIa) es de aproximadamente 85% a aproximadamente 90%. En algunas de dichas realizaciones, el porcentaje en moles de las fórmulas (Ib) y (IIa) es aproximadamente 5% cada una. En una realización, el polímero comprende unidades repetitivas de fórmulas (IIIa1), (Ib) y (IIa) en el porcentaje molar de aproximadamente 90% a aproximadamente 5% a aproximadamente 5%. En otra realización, el polímero comprende unidades repetitivas de fórmulas (IIIa1), (Ib) y (IIa) en la relación molar en porcentaje de aproximadamente 85% a aproximadamente 5% a aproximadamente 10%. En otra realización más, el polímero comprende unidades repetitivas de fórmulas (IIIa2), (Ib) y (IIa) en la relación molar en porcentaje de aproximadamente 90% a aproximadamente 5% a aproximadamente 5%. En algunas realizaciones adicionales, el polímero puede comprender además de aproximadamente 0,5% en moles a aproximadamente 2% en moles de una unidad repetitiva de fórmula (IIIb1).

Algunas realizaciones descritas en la presente memoria están relacionadas con un polímero injertado que comprende oligonucleótidos funcionalizados unidos covalentemente a un polímero con una unidad repetitiva de fórmula (I) y una unidad repetitiva de fórmula (II) como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, el polímero puede comprender además una o más unidades repetitivas de varias cadenas principales de polímeros diferentes como se ha descrito antes, por ejemplo, una o más unidades repetitivas de poliacrilamida de fórmula (IIIa) o (IIIb) o ambas. En algunas realizaciones, el enlace covalente entre el oligonucleótido funcionalizado y el polímero comprende el resto

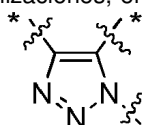
estructural ,  o , o combinaciones de los mismos, en donde * indica el punto de conexión con el oligonucleótido funcionalizado. En algunas de dichas realizaciones, el enlace covalente entre el

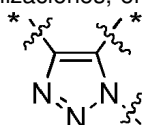


- oligonucleótido funcionalizado y el polímero comprende el resto estructural . En algunas otras de dichas realizaciones, el enlace covalente entre el oligonucleótido funcionalizado y el polímero comprende un resto estructural



. En algunas de dichas realizaciones, el enlace covalente entre el oligonucleótido funcionalizado y el

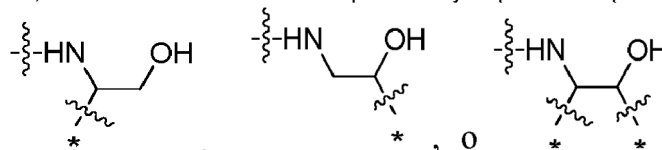


- polímero comprende el resto estructural . En algunas realizaciones, el polímero injertado se prepara haciendo reaccionar uno o más restos funcionales del oligonucleótido funcionalizado con el polímero, dichos uno o más restos funcionales comprenden o se seleccionan de alquinos, cicloalquenos, cicloalquinos, heterocicloalquenos, heterocicloalquinos o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de los mismos. En algunas de dichas realizaciones, dichos uno o más restos funcionales comprenden alquino o se seleccionan de alquino. En algunas otras realizaciones, dichos uno o más restos funcionales comprenden o se seleccionan de norborneno, ciclooctino o

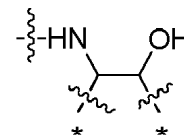
biciclononino, o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de los mismos. En una realización, el biciclononino es biciclo[6.1.0]non-4-ino. En algunas de dichas realizaciones, el polímero injertado se prepara haciendo reaccionar el grupo azido del polímero con dichos uno o más restos funcionales de los oligonucleótidos funcionalizados, por ejemplo, biciclo[6.1.0]non-4-ino.

5 Sustratos

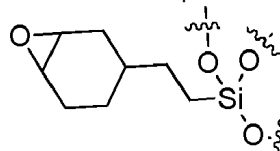
Algunas realizaciones descritas en la presente memoria están relacionadas con un sustrato que tiene una primera superficie que comprende un polímero con una unidad repetitiva de fórmula (I) y una unidad repetitiva de fórmula (II) unido covalentemente a la misma como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, el polímero puede comprender además una o más unidades repetitivas seleccionadas del grupo que consiste en poliacrilamidas, poliacrilatos, poliuretanos, polisiloxanos, siliconas, poliácroleínas, polifosfacenos, poliisocianatos, polioles y polisacáridos, o combinaciones de los mismos. En algunas de dichas realizaciones, el polímero puede comprender además una o más unidades repetitivas de poliacrilamida de fórmula (IIIa) o (IIIb) con la estructura mostrada antes. En algunas realizaciones, los enlaces covalentes entre el polímero y el sustrato se forman por reacción de apertura de anillo epoxi por amina. En algunas realizaciones, el enlace covalente entre el polímero y la primera superficie del



15 sustrato comprende el resto estructural , , O , o combinaciones de los mismos, en donde el amino sustituido deriva de la unidad repetitiva de fórmula (II) y * indica el punto de conexión del polímero con la primera superficie del sustrato. En alguna de dichas realizaciones, la unión

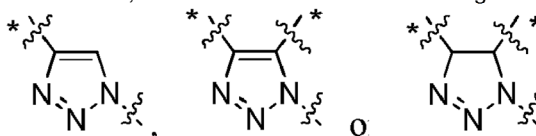


covalente entre el polímero y la primera superficie comprende el resto estructural . En algunas realizaciones, el sustrato se prepara haciendo reaccionar el polímero con una primera pluralidad de grupos funcionales unidos covalentemente a la primera superficie, en donde la primera pluralidad de grupos funcionales comprende o se seleccionan de vinilo, acrililo, alqueno, cicloalqueno, heterocicloalqueno, alquino, cicloalquino, heterocicloalquino, nitreno, aldehído, hidrazinilo, éter de glicidilo, epoxi, carbeno, isocianato o maleimida, o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de los mismos. En algunas de dichas realizaciones, la primera pluralidad de grupos funcionales comprende o se seleccionan de grupos epoxi. En una realización, dicho grupo epoxi tiene la



25 estructura . En algunas realizaciones, el sustrato se prepara haciendo reaccionar los grupos amino del polímero con los grupos epoxi de la primera superficie. En algunas realizaciones, la superficie se trata previamente con un silano funcionalizado que comprende dicha primera pluralidad de grupos funcionales descritos antes, y el polímero se une covalentemente a la primera superficie por reacción con la primera pluralidad de los grupos funcionales del silano funcionalizado.

30 En algunas realizaciones, el sustrato comprende además oligonucleótidos funcionalizados unidos covalentemente al polímero. En alguna realización, el enlace covalente entre el oligonucleótido y el polímero se forma por reacción click de cicloadición con azida. En algunas realizaciones, el enlace covalente entre el oligonucleótido funcionalizado y el



polímero comprende el resto estructural , , o combinaciones de los mismos, en donde * indica el punto de conexión del polímero con el oligonucleótido funcionalizado. En algunas de dichas realizaciones, los oligonucleótidos funcionalizados se unen covalentemente al polímero haciendo reaccionar uno o más restos funcionales de los oligonucleótidos funcionalizados con los grupos azido del polímero, dichos uno o más restos funcionales comprenden o se seleccionan de alquinos, cicloalquenos, cicloalquinos, heterocicloalquenos, heterocicloalquinos, o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de los mismos. En algunas de dichas realizaciones, dichos uno o más restos funcionales comprenden alquino. En algunas otras realizaciones, dichos uno o más restos funcionales comprenden o se seleccionan de norborneno, ciclooctino o biciclononino, o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de los mismos. En una realización, el biciclononino es biciclo[6.1.0]non-4-ino. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos funcionalizados se unen covalentemente al polímero haciendo reaccionar los grupos azido del polímero con uno o más restos alquino de los oligonucleótidos funcionalizados. En algunas otras realizaciones, los oligonucleótidos funcionalizados se unen covalentemente al polímero haciendo reaccionar los grupos azido del polímero con uno o más restos biciclo[6.1.0]non-4-ino de los oligonucleótidos

funcionalizados.

En realizaciones descritas en la presente memoria, el material de sustrato puede comprender vidrio, sílice, plástico, cuarzo, metal, óxido de metal o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el sustrato comprende vidrio. En algunas realizaciones, la primera superficie del sustrato comprende tanto regiones recubiertas de polímero como regiones inertes.

Preparaciones de superficie del sustrato

Algunas realizaciones descritas en la presente memoria están relacionadas con procedimientos o métodos para inmovilizar un polímero injertado en una primera superficie de un sustrato proporcionando un sustrato que tiene una primera superficie que tiene una primera pluralidad de grupos funcionales unidos covalentemente a la misma; proporcionando un polímero injertado que tiene oligonucleótidos funcionalizados unidos covalentemente a un polímero, en donde el polímero comprende una segunda pluralidad de grupos funcionales; y haciendo reaccionar la primera pluralidad de grupos funcionales de la primera superficie con la segunda pluralidad de grupos funcionales del polímero de modo que el polímero se une covalentemente a la primera superficie del sustrato.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, la primera superficie del sustrato se trata previamente con un silano funcionalizado, en donde dicho silano funcionalizado comprende la primera pluralidad de grupos funcionales. En algunas realizaciones, el silano funcionalizado se deposita sobre la superficie por el método de Deposición Química de Vapor (CVD). En algunas de dichas realizaciones, el silano funcionalizado se puede aplicar sobre la primera superficie por el método de CVD usando el horno de Yield Engineering Systems (YES).

En algunas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, el polímero injertado se forma haciendo reaccionar una tercera pluralidad de grupos funcionales del polímero con uno o más restos funcionales de los oligonucleótidos funcionalizados. En algunas otras realizaciones, el polímero injertado se forma haciendo reaccionar dichos uno o más restos funcionales de los oligonucleótidos funcionalizados con monómeros que comprenden una tercera pluralidad de grupos funcionales; polimerizando los monómeros que han reaccionado para formar el polímero de modo que los oligonucleótidos funcionalizados se unen covalentemente al polímero.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, la segunda pluralidad de grupos funcionales del polímero son los mismos que la tercera pluralidad de grupos funcionales del polímero. Por ejemplo, la segunda pluralidad y la tercera pluralidad de grupos funcionales del polímero pueden ser ambas tetrazinas. En algunas otras realizaciones, los grupos funcionales en la segunda pluralidad de grupos funcionales del polímero son diferentes de los grupos funcionales en la tercera pluralidad de grupos funcionales del polímero.

La cadena principal de polímero usada en los métodos descritos en la presente memoria puede ser lineal, ramificada, hiperramificada o dendrítica. La estructura de polímero final puede estar en diferentes arquitecturas, que incluyen, por ejemplo, arquitecturas de copolímero aleatorio, copolímero de bloques, polímero en forma de peine o polímero en forma de estrella. Se pueden usar diferentes clases de cadenas principales de polímeros en los métodos descritos en la presente memoria, que incluyen, pero no se limitan a poliácridamidas, poliácridatos, poliuretanos, polisiloxanos, siliconas, poliácroleínas, polifosfacenos, poliisocianatos, polioles, polisacáridos, etc. En algunas realizaciones, el polímero comprende cadena principal de poliácridamida. En algunas otras realizaciones, el polímero comprende cadena principal de poliácridato. En otras realizaciones más, el polímero comprende cadena principal de poliuretano. En otras realizaciones más, el polímero comprende una cadena principal de polifosfacenos. En otras realizaciones más, el polímero comprende una cadena principal de dendrímero.

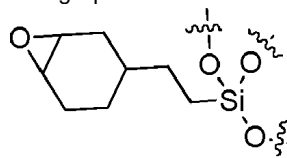
En algunas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, la primera pluralidad de grupos funcionales de la primera superficie comprende o se seleccionan de vinilo, acrililo, alqueno, cicloalqueno, heterocicloalqueno, alquino, cicloalquino, heterocicloalquino, nitreno, aldehído, hidrazino, éter glicídico, epoxi, carbeno, isocianato o maleimida, o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de los mismos. En algunas de dichas realizaciones, la primera pluralidad de grupos funcionales comprende o se selecciona de cicloalqueno, éter de glicidilo, epoxi o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones adicionales, la primera pluralidad de grupos funcionales comprende o se selecciona de norborneno. En algunas otras realizaciones, la primera pluralidad de grupos funcionales comprende un epoxi. En otras realizaciones más, la primera pluralidad de grupos funcionales comprende éter de glicidilo.

En algunas realizaciones del método descrito en la presente memoria, los grupos funcionales del polímero pueden comprender o se seleccionan de amino, tetrazino, azido, carboxilo, hidroxilo, tiol, aldehído, halógeno-, alqueno, alquino, epoxi, éter de glicidilo, etc. En algunas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, la segunda pluralidad de grupos funcionales del polímero comprende o se selecciona de amino, tetrazino, azido, carboxilo, hidroxilo, tiol, aldehído o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de los mismos. En algunas de dichas realizaciones, la segunda pluralidad de grupos funcionales comprende o se selecciona de amino o amino protegido, por ejemplo, amino protegido con Boc. En algunas otras realizaciones, la segunda pluralidad de grupos funcionales comprende tetrazino opcionalmente sustituido. En otras realizaciones más, la segunda pluralidad de grupos funcionales comprende azido.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, la tercera pluralidad de grupos funcionales del polímero comprende o se selecciona de azido, tetrazinilo, glicidilo, epoxi, alquinilo o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de los mismos. En algunas de dichas realizaciones, la tercera pluralidad de grupos funcionales comprende azido. En algunas otras realizaciones, la tercera pluralidad de grupos funcionales comprende tetrazinilo opcionalmente sustituido. En algunas otras realizaciones más, la tercera pluralidad de grupos funcionales comprende alquinilo. En algunas otras realizaciones más, la tercera pluralidad de grupos funcionales comprende éter de glicidilo opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, dichos uno o más restos funcionales de los oligonucleótidos funcionalizados comprenden o se seleccionan de amino, azido, carboxilo, anhídrido de ácido, tetrazina, epoxi, éter de glicidilo, vinilo, acrililo, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, nitreno, aldehído, hidrazinilo o maleimida o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones adicionales, dichos uno o más restos funcionales de los oligonucleótidos funcionalizados comprenden o se seleccionan de alquinilo, cicloalquenilo, cicloalquinilo, amino, azido, hidroxilo, tiol, carboxilo, anhídrido de ácido, o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de los mismos. En algunas de dichas realizaciones, dichos uno o más restos funcionales comprenden cicloalquinilo, por ejemplo, biciclo[6.1.0]non-4-ino (BCN). En algunas otras realizaciones, dichos uno o más restos funcionales comprenden alquinilo. En algunas otras realizaciones más, dichos uno o más restos funcionales comprenden azido. En algunas otras realizaciones más, dicho uno o más restos funcionales comprenden amino opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, el polímero injertado comprende oligonucleótidos funcionalizados unidos covalentemente a un polímero con una unidad repetitiva de fórmula (I) y una unidad repetitiva de fórmula (II) como se describe en la presente memoria. En algunas de dichas realizaciones, la primera pluralidad de grupos funcionales de la primera superficie comprende grupos epoxi. En una realización, dicho



grupo epoxi es covalentemente a la primera superficie haciendo reaccionar los grupos amino del polímero con los grupos epoxi de la primera superficie.

Algunas realizaciones descritas en la presente memoria están relacionadas con procedimientos o métodos para inmovilizar un polímero descrito en la presente memoria en una primera superficie de un sustrato, que comprende: proporcionar un sustrato que tiene una primera superficie que comprende una primera pluralidad de grupos funcionales unidos covalentemente a la misma; proporcionar un polímero con unidades repetitivas de fórmulas (I) o (II) como se describe en la presente memoria; y hacer reaccionar la primera pluralidad de grupos funcionales de la primera superficie con el polímero de manera que el polímero esté unido covalentemente a la primera superficie del sustrato. En algunas de dichas realizaciones, los procedimientos o métodos comprenden además proporcionar oligonucleótidos funcionalizados que comprenden uno o más restos funcionalizados; y hacer reaccionar dichos uno o más restos funcionalizados con el polímero de manera que los oligonucleótidos funcionalizados se unen covalentemente al polímero. En algunas de dichas realizaciones, la primera pluralidad de grupos funcionales de la primera superficie comprende o se seleccionan de vinilo, acrililo, alquenilo, cicloalquenilo, heterocicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, heterocicloalquinilo, nitreno, aldehído, hidrazinilo, éter de glicidilo, epoxi, carbeno, isocianato o maleimida, o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de los mismos. En algunas de dichas realizaciones, dichos uno o más restos funcionalizados comprenden o se seleccionan de amino, azido, carboxilo, anhídrido de ácido, tetrazina, epoxi, éter de glicidilo, vinilo, acrililo, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, nitreno, aldehído, hidrazinilo, o maleimida o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de los mismos.

En cualquier realización de los métodos descritos en la presente memoria, el polímero o el polímero injertado con unidades repetitivas de fórmulas (I) o (II) pueden comprender además una o más unidades repetitivas seleccionadas del grupo que consiste en poliácridamidas, poliácridatos, poliuretanos, polisiloxanos, siliconas, poliácroleínas, polifosfocenos, poliisocianatos, polioles y polisacáridos, o combinaciones de los mismos. En algunas de dichas realizaciones, el polímero puede comprender además una o más unidades repetitivas de poliácridamida de fórmula (IIIa) o (IIIb) con la estructura mostrada anteriormente.

En cualquier realización de los métodos descritos en la presente memoria, el método comprende además una etapa de lavado para eliminar el exceso de oligonucleótidos funcionalizados no unidos. En algunas realizaciones, el método comprende además una etapa de secado.

En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, el sustrato puede comprender un material seleccionado de vidrio, sílice, cuarzo, plástico, metal, óxido metálico, conformado o no, o combinaciones de los mismos. En una realización, la superficie del sustrato comprende vidrio. En algunas realizaciones, la superficie del sustrato puede comprender tanto regiones recubiertas de silano funcionalizadas como regiones inertes. En algunas realizaciones, las regiones inertes se seleccionan de regiones de vidrio, regiones de metal, regiones de máscara y regiones intersticiales, o combinaciones de las mismas. En una realización, las regiones inertes comprenden vidrio.

En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, se pueden incluir marcadores de QC en las estructuras de polímero y/o cebador.

- 5 En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, el polímero o polímero injertado se puede aplicar a la superficie del sustrato mediante diversas técnicas de aplicación superficial conocidas por un experto en la técnica, por ejemplo, recubrimiento por centrifugación, recubrimiento por pulverización, recubrimiento por inmersión, recubrimiento por inyección de tinta, etc.

Materiales de sustratos y diseño

- 10 En algunas realizaciones, los sustratos usados en la presente solicitud incluyen sustratos basados en sílice, tales como vidrio, sílice fundida y otros materiales que contienen sílice. En algunas realizaciones, los sustratos basados en sílice también pueden ser silicio, dióxido de silicio, nitruro de silicio, hidruros de silicona. En algunas realizaciones, los sustratos usados en la presente solicitud incluyen materiales plásticos tales como polietileno, poliestireno, poli(cloruro de vinilo), polipropileno, náilon, poliésteres, policarbonatos y poli(metacrilato de metilo). El material plástico preferido es poli(metacrilato de metilo), poliestireno y sustratos de polímero de olefina cíclica. En algunas realizaciones, el sustrato es un material basado en sílice o material plástico. En realizaciones particulares, el sustrato tiene al menos una superficie que comprende vidrio.

En algunas realizaciones, los sustratos pueden ser, o pueden contener, un metal. En algunas de dichas 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 tántalo u óxido de estaño.

- 20 La acrilamida, enona o acrilato también se pueden usar como un material de sustrato. Otros materiales de sustrato pueden incluir, pero no se limitan a arseniuro de galio, fosfuro de indio, aluminio, material cerámico, poliimida, cuarzo, resinas, polímeros y copolímeros. Las listas anteriores pretenden ser ilustrativas, pero no limitativas de 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 pueden ser semiconductores, es decir, GaAs o ITO.

- 25 Los sustratos pueden comprender un solo material o una pluralidad de materiales diferentes. Los sustratos pueden ser compuestos o laminados. El sustrato puede ser plano, redondo, con textura y con patrón. Los patrones se pueden formar, por ejemplo, mediante almohadillas metálicas que forman características en superficies no metálicas, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. N° 8 778 849. Otra superficie con patrón útil es la que tiene características bien formadas en una superficie, por ejemplo, como se describe en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2014/0243224 A1, publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2011/0172118 A1 o Pat. d EE.UU. N° 7 622 294. Para las realizaciones que usan un sustrato con patrón, se puede unir selectivamente un gel a las características del patrón (p. ej., el gel se puede unir a almohadillas de metal o el gel se puede unir al interior de los pocillos) o, alternativamente, el gel se puede unir uniformemente por las características del patrón y las regiones intersticiales.

- 35 Las ventajas en el uso de sustratos basados en plásticos en la preparación y el uso de matrices moleculares incluyen el coste: la preparación de sustratos basados en plásticos adecuados, por ejemplo, por moldeo por inyección, en general es más barata que la preparación, p. ej., por grabado y unión de sustratos basados en sílice. Otra ventaja es la variedad casi ilimitada de plásticos que permite el ajuste fino de las propiedades ópticas del soporte para adaptarse a la aplicación a la que está destinado o al que se puede destinar.

- 40 Cuando los metales se usan como sustratos o como almohadillas en un sustrato, esto puede deberse a la aplicación deseada: la conductividad de los metales puede permitir la modulación del campo eléctrico en sensores basados en ADN. De esta manera, se puede mejorar la discriminación de los apareamientos erróneos de ADN, se puede afectar a la orientación de las moléculas de oligonucleótidos inmovilizadas o se puede acelerar la cinética de hibridación del ADN.

- 45 En algunas realizaciones, el sustrato se basa en sílice, pero la forma del sustrato empleado puede variar de acuerdo con la aplicación para la que se pone en práctica la presente solicitud. Sin embargo, en general los portaobjetos de material de soporte, tales como sílice, p. ej., sílice fundida, son de particular utilidad en la preparación y posterior integración de moléculas. Son de uso particular en la práctica de la presente solicitud los portaobjetos de sílice fundida vendidos bajo el nombre comercial SPECTRASIL™. A pesar de esto, será evidente para la persona experta que la presente solicitud es igualmente aplicable a otras presentaciones de sustrato (incluyendo soportes basados en sílice), tales como perlas, varillas y similares.

- 55 En algunas realizaciones, la superficie del sustrato comprende tanto regiones recubiertas con moléculas funcionales como regiones inertes sin recubrimientos. En algunas de dichas realizaciones, los recubrimientos de moléculas funcionalizadas son recubrimientos de hidrogel o polímero. Las regiones recubiertas con moléculas funcionales pueden comprender sitios reactivos y, por lo tanto, se pueden usar para unir moléculas a través de enlaces químicos u otras interacciones moleculares. En algunas realizaciones, las regiones recubiertas con moléculas funcionales (p. ej., características reactivas, almohadillas, perlas, postes o pocillos) y las regiones inertes (referidas como regiones

intersticiales) se pueden alternar para formar un patrón o una cuadrícula. Dichos 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 procedimientos usados 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 usar de otro modo en una composición o método expuesto en la presente memoria se describen en la patente de EE.UU. n° 8 778 848 y 8 778 849.

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 dichas 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 polímero. 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 polímero. En dichas 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 polímero 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 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 usar en el método o la composición expuesta en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a los disponibles en el mercado en Illumina, Inc. (San Diego, CA) o a los descritos en los documentos 2010/0111768 A1 o 2012/0270305.

Aplicación de secuenciación

Una composición, aparato o método expuesto en la presente memoria se puede usar con cualquiera de una variedad de técnicas de amplificación. Las técnicas ilustrativas que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) o amplificación por cebadores aleatorios (RPA). En realizaciones particulares, uno o más cebadores usados para la amplificación se pueden unir a un recubrimiento de polímero. En las realizaciones de PCR, uno o ambos cebadores usados para la amplificación se pueden unir a un recubrimiento de polímero. Los formatos que usan dos especies de cebadores unidos a menudo se denominan amplificación de puente porque los amplicones bicatenarios forman una estructura similar a un puente entre los dos cebadores unidos que flanquean la secuencia molde que se ha copiado. Se describen reactivos y condiciones de ejemplo que se pueden usar para la amplificación por puente, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 5 641 658; publicación de patente de EE.UU. n° 2002/0055100; patente de EE.UU. n° 7 115 400; Publ. de patente de EE.UU. n° 2004/0096853; Publ. de patente de EE.UU. n° 2004/0002090; Publ. de patente de EE.UU. n° 2007/0128624; y Publ. de patente de EE.UU. n° 2008/0009420. La amplificación por PCR también se puede llevar a cabo con uno de los cebadores de amplificación unido a un recubrimiento de polímero y el segundo cebador en solución. Un formato ilustrativo que usa 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), WO 05/010145 o Publ. de patente de EE.UU. n° 2005/0130173 o 2005/0064460. La PCR en emulsión es ilustrativa del formato y se entenderá que, para los propósitos de los métodos expuestos en la presente memoria, el uso de una emulsión es opcional y, de hecho, para varias realizaciones no se usa 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 polímero como se expone en la presente memoria.

Las técnicas de RCA se pueden modificar para usar con un método, composición o aparato de la presente descripción. Los componentes ilustrativos que se pueden usar en una reacción de RCA y los principios por los cuales la RCA produce amplicones se describen, por ejemplo, en Lizardi et al., *Nat. Genet.* 19: 225-232 (1998) y US 2007/0099208 A1. Los cebadores utilizados para la RCA pueden estar en disolución o unidos a un recubrimiento de polímero.

Las técnicas de MDA se pueden modificar para usar con un método, composición o aparato 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 y col., *Nucl. Acids Res.* 20:1691-96 (1992); US 5 455 166; US 5 130 238; y US 6.214.587. Los cebadores usados para la MDA pueden estar en solución o unidos a un recubrimiento de polímero.

En realizaciones particulares, se puede usar una combinación de las técnicas de amplificación ilustradas antes. Por ejemplo, se pueden usar RCA y MDA en una combinación en donde la RCA se usa para generar un amplicón

concatamérico en solución (p. ej., usando cebadores de fase de solución). El amplicón después se puede usar como molde para la MDA usando cebadores que están unidos a un recubrimiento de polímero. En este ejemplo, los amplicones producidos después de las etapas de RCA y MDA combinadas, se unirán al recubrimiento de polímero.

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

La secuenciación de ácidos nucleicos se puede usar para determinar una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido por diversos procedimientos conocidos en la técnica. En un método preferido, se usa la secuenciación por síntesis (SBS) para determinar una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido unido a una superficie de un sustrato por cualquiera de los recubrimientos de polímero descritos en la presente memoria. En dicho procedimiento, se proporcionan uno o más nucleótidos a un polinucleótido molde que está asociado con una polinucleótido polimerasa. La polinucleótido polimerasa incorpora el uno o más nucleótidos en una cadena de ácido nucleico recién sintetizada que es complementaria al molde del polinucleótido. La síntesis se inicia a partir de un cebador oligonucleótido que es complementario de una parte del polinucleótido molde o de una parte de un ácido nucleico universal o no variable que se une covalentemente en un extremo del polinucleótido molde. A medida que los nucleótidos se incorporan contra el polinucleótido molde, se genera una señal detectable que permite determinar qué nucleótido se ha incorporado durante cada paso del procedimiento de secuenciación. De esta manera, se puede generar la secuencia de un ácido nucleico complementario de al menos una parte del polinucleótido molde, permitiendo así la determinación de la secuencia de nucleótidos de al menos una porción del polinucleótido molde.

Las celdas de flujo proporcionan un formato conveniente para alojar una matriz que se produce por los métodos de la presente descripción y que se somete a una secuenciación por síntesis (SBS) u otra técnica de detección que implica el suministro repetido de reactivos en ciclos. Por ejemplo, para iniciar un primer ciclo de SBS, se pueden hacer fluir uno o más nucleótidos marcados, ADN polimerasa, etc., hacia/a través de una celda de flujo que alberga una matriz de ácido nucleico hecha por los métodos expuestos en la presente memoria. Se pueden detectar aquellos sitios de una matriz donde la extensión del cebador hace que se incorpore un nucleótido marcado. Opcionalmente, los nucleótidos pueden incluir además una propiedad de terminación reversible que termina una extensión adicional del cebador una vez que se ha añadido un nucleótido a un cebador. Por ejemplo, se puede añadir un análogo de nucleótido que tiene un resto terminador reversible a un cebador de modo que la extensión posterior no pueda ocurrir hasta que se suministre un agente de desbloqueo para eliminar el resto. Por lo tanto, para realizaciones que usan terminación reversible, se puede suministrar un reactivo de desbloqueo a la celda de flujo (antes o después de que ocurra la detección). Se pueden llevar a cabo lavados entre las distintas etapas de suministro. Después el ciclo se puede repetir n veces para extender el cebador mediante n nucleótidos, detectando así una secuencia de longitud n. Los procedimientos ilustrativos de SBS, los sistemas fluidicos y las plataformas de detección que se pueden adaptar fácilmente para usar con una matriz producida por los métodos de la presente descripción se describen, por ejemplo, en Bentley et al., *Nature* 456: 53-59 (2008), WO 04/018497; US 7 057 026; WO 91/06678; WO 07/123744; US 7 329 492; US 7 211 414; US 7 315 019; US 7 405 281 y US 2008/0108082.

Se pueden usar otros procedimientos de secuenciación, incluyendo, por ejemplo, los que usan reacciones cíclicas, como la pirosecuenciación. La pirosecuenciación detecta la liberación de pirofosfato inorgánico (PPi) a medida que se incorporan nucleótidos particulares en una cadena de ácido nucleico que se desarrolla (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); US 6 210 891; US 6 258 568 y US 6 274 320). En la pirosecuenciación, el PPi liberado se puede detectar al convertirse inmediatamente en trifosfato de adenosina (ATP) por la ATP sulfúrilasa, y el nivel de ATP generado se puede detectar por los fotones producidos por la luciferasa. Por lo tanto, la reacción de secuenciación se puede controlar por un sistema de detección de luminiscencia. Las fuentes de radiación de excitación usadas para los sistemas de detección basados en fluorescencia no son necesarias para los procedimientos de pirosecuenciación. Los sistemas, detectores y procedimientos fluidicos útiles que se pueden usar para la aplicación de pirosecuenciación a las matrices de la presente descripción se describen, por ejemplo, en los documentos WO 12/058096 A1, US 2005/0191698 A1, US 7 595 883 y US 7 244 559.

Las reacciones de secuenciación por ligadura también son útiles, incluyendo, por ejemplo, las descritas en Shendure et al. *Science* 309: 1728-1732 (2005); US 5 599 675; y US 5 750 341. 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 WO 1989/10977. Tanto en los procedimientos de secuenciación por ligadura como de secuenciación por hibridación, los ácidos nucleicos que están presentes en los sitios de una matriz se someten a ciclos repetidos de suministro y detección de oligonucleótidos. Los sistemas fluidicos para los métodos de SBS expuestos en la presente memoria o en las referencias citadas en la presente memoria, se pueden adaptar fácilmente para suministrar reactivos

para los procedimientos de secuenciación por ligadura o secuenciación por hibridación. Típicamente, los oligonucleótidos están marcados por fluorescencia y se pueden detectar usando 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 usar métodos que implican la monitorización en tiempo real de la actividad de la ADN polimerasa. Por ejemplo, las incorporaciones de nucleótidos se pueden detectar por interacciones de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre una polimerasa que porta fluoróforo y nucleótidos marcados con γ -fosfato, o con guías de onda en modo cero (ZMW). 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); Korlach 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 usar un detector eléctrico y técnicas asociadas que están disponibles en el mercado en Ion Torrent (Guilford, CT, una filial de Life Technologies) o los métodos y sistemas de secuenciación descritos en US 2009/0026082 A1; US 2009/0127589 A1; US 2010/0137143 A1; o US 2010/0282617 A1.

Otra aplicación útil para una matriz de la presente descripción, por ejemplo, que se ha producido por un método expuesto en la presente memoria, es el análisis de expresión génica. La expresión génica se puede detectar o cuantificar usando técnicas de secuenciación de ARN, tales como las denominadas secuenciación digital de ARN. Las técnicas de secuenciación de ARN se pueden llevar a cabo usando metodologías de secuenciación conocidas en la técnica, tales como las expuestas anteriormente. La expresión génica también se puede detectar o cuantificar usando técnicas de hibridación llevadas a cabo por hibridación directa con una matriz o usando un ensayo multiplex, cuyos productos se detectan en una matriz. Una matriz de la presente descripción, por ejemplo, que se ha producido por un método expuesto en la presente memoria, también se puede usar para determinar genotipos para una muestra de ADN genómico de uno o más individuos. Se describen métodos de ejemplo para los análisis de expresión basado en matrices y genotipado que se pueden llevar a cabo en una matriz de la presente descripción en los documentos de patente de EE.UU. nº 7 582 420; 6 890 741; 6 913 884 o 6 355 431 o Pub. de patente de EE.UU. nº 2005/0053980 A1; 2009/0186349 A1 o US 2005/0181440 A1.

En algunas realizaciones del método descrito anteriormente que usan una celda de flujo, solo está presente un único tipo de nucleótido en la celda de flujo durante una sola etapa de flujo. En dichas realizaciones, el nucleótido se puede seleccionar del grupo que consiste en dATP, dCTP, dGTP, dTTP y análogos de los mismos. En otras realizaciones del método descrito antes que usan una celda de flujo, está presente una pluralidad de diferentes tipos de nucleótidos en la celda de flujo durante una sola etapa de flujo. En dichos métodos, los nucleótidos se pueden seleccionar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP y análogos de los mismos.

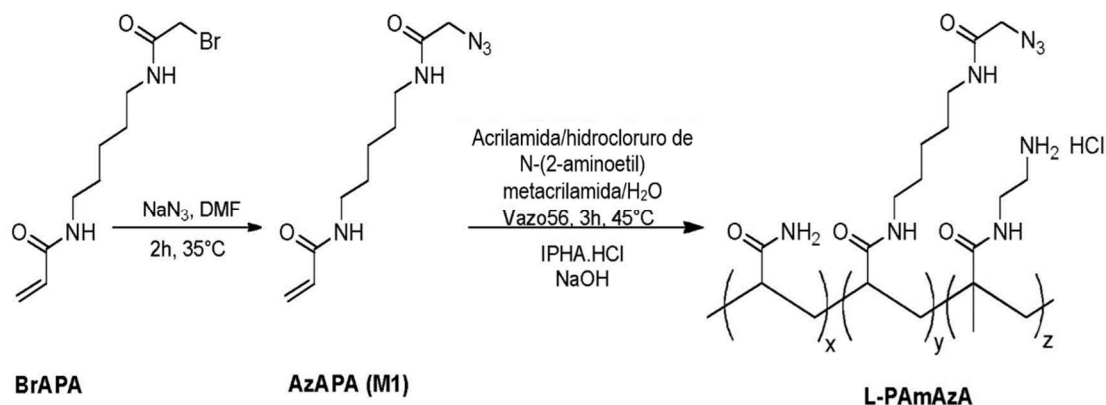
La determinación del nucleótido o nucleótidos incorporados durante cada etapa de flujo para uno o más de los polinucleótidos unidos al recubrimiento de polímero en la superficie del sustrato presente en la celda de flujo se logra mediante la detección de una señal producida en o cerca del molde de polinucleótido.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

Ejemplos

Se describen realizaciones adicionales y ejemplos de comparación con mayor detalle a continuación.

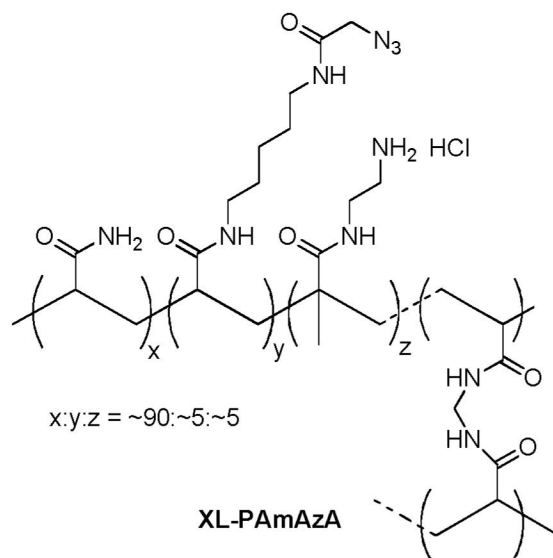
Ejemplo 1

Esquema 1. Síntesis de poliacrilamidas bifuncionalizadas de modo ortogonal



El esquema 1 ilustra un esquema sintético para la preparación de poli(acrilamida-co-AzAPA-co-aminoetilacrilamida) (L-PAmAzA). En la primera etapa, se sintetizó N-(5-azidoacetamidopentil)acrilamida (AzAPA) haciendo reaccionar N-(5-bromoacetamidopentil)acrilamida (BrAPA) con azida sódica en DMF a 35°C durante 2 horas. Después, se sintetizó L-PAmAzA usando un sistema de iniciación de polímero de tipo AIBN (Vazo56) haciendo reaccionar AzAPA con acrilamida y N-(2-aminoetil)metacrilamida HCl. El L-PAmAzA resultante tiene las tres unidades repetitivas en la relación molar x:y:z de aproximadamente 90% a aproximadamente 5% a aproximadamente 5%.

Además, la reticulación de L-PAmAzA se logró mediante la introducción de monómeros de N,N'-metilénbisacrilamida en la reacción de polimerización, que dio como resultado un polímero reticulado (XL-PAmAzA) con una estructura de ejemplo que se muestra a continuación:



Se preparó una serie de poli(acrilamidas) lineales que llevaban funcionalidades ortogonales usando el iniciador térmico Vazo56 siguiendo el procedimiento similar descrito antes. El tiempo de reacción era de aproximadamente 1.5 horas a aproximadamente 3 horas, seguido de una etapa de purificación mediante precipitación en MeCN. La Tabla 1 a continuación resume las cantidades de los monómeros para las reacciones de polimerización.

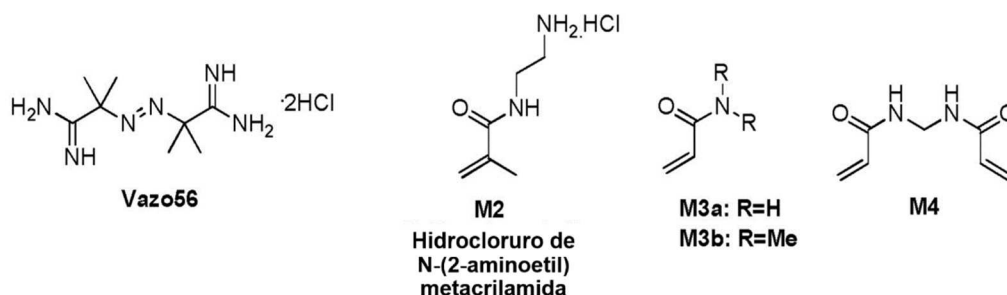
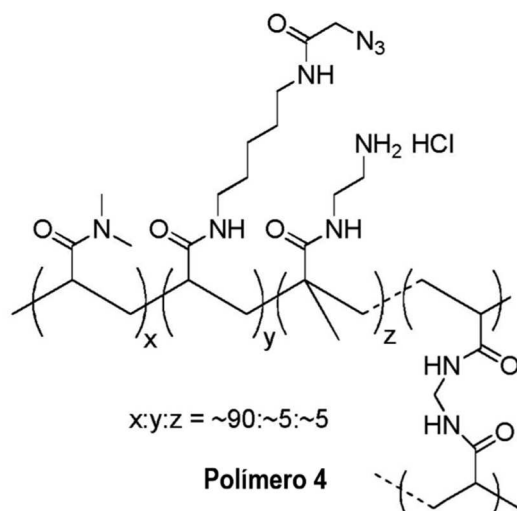


Tabla 1.				
Polímero	M1 (% en moles)	M2 (% en moles)	M3a/b (% en moles)	M4 (% en moles)
1	5	5	a:90	0
2	5	5	a:90	1
3	5	10	a:85	1
4	5	5	b:90	1
5	5	5	a:90	2
6	5	5	a:90	0,5

Con el fin de demostrar la reactividad ortogonal de las poli(acrilamidas) bifuncionales, se evaluó el rendimiento del recubrimiento de tres nuevas poli(acrilamidas) en la Tabla 1 (Polímero 1, "P1"; Polímero 4, "P4"; Polímero 6, "P6") que contienen 5% en moles de grupo funcional aminoetil en la superficie de monocapa epoxi, frente a la superficie de

monocapa de norborneno convencional. El polímero 1 y el polímero 6 son L-PAmAzA y XL-PAmAzA con las estructuras ilustradas antes. La estructura simplificada del Polímero 4 se muestra a continuación.



- 5 Se usó el polímero PAZAM de referencia como control. La configuración de la celda de flujo para la superficie de monocapa de norborneno y la superficie de monocapa de epoxi se resumen en la Tabla 2 y la Tabla 3, respectivamente.

Tabla 2.						
Canal	Temperatura de acoplamiento del polímero (°C)	Tiempo de acoplamiento del polímero (min)	Vol. PAZAM ref. (ul)	Polímero	[PAZAM Final]/%p/v	[P5/P7]/uM
1	60	60	420	control PAZAM	0,5	18
2	60	60	420	P1	0,5	18
3	60	60	420	P4	0,5	18
4	60	60	420	P6	0,5	18
5	60	60	420	control PAZAM	0,5	18
6	60	60	420	P1	0,5	18
7	60	60	420	P4	0,5	18
8	60	60	420	P6	0,5	18

Tabla 3.						
Canal	Temperatura de acoplamiento del polímero (°C)	Tiempo de acoplamiento del polímero (min)	Vol. PAZAM ref. (ul)	Polímero	[PAZAM Final]/%p/v	[P5/P7]/uM
1	60	60	420	control PAZAM	0,5	18
2	60	60	420	P1	0,5	18
3	60	60	420	P4	0,5	18
4	60	60	420	P6	0,5	18
5	60	60	420	control PAZAM	0,5	18
6	60	60	420	P1	0,5	18
7	60	60	420	P4	0,5	18
8	60	60	420	P6	0,5	18

Se usaron sustratos HiSeq (proporcionados por ILLUMINA, San Diego, CA) para esta detección inicial y el proceso de CVD se llevó a cabo usando un desecador. Los polímeros poli(acrilamidas) bifuncionales reaccionaron con norborneno por una reacción click de azida promovida por tensión para unirse covalentemente a la superficie de monocapa de norborneno a 60°C. De forma similar, los polímeros poli(acrilamidas) bifuncionales se aplicaron en recubrimiento sobre las monocapas epoxídicas por reacción de apertura del anillo de epoxi con grupos funcionales amina que da como resultado la unión covalente de los polímeros a la superficie. Se usaron dos medidas de QC para medir el éxito del método. Tanto QC1 como QC3 usan láser verde, con PMT a 450V y emisión de filtro a 555BP. La mezcla de oligos TET QC para QC1 es 1.6 mM: 100 ml de oligos 16 µM + 0.9 ml de HT1. La mezcla de oligos TET QC para QC3 es 0.6 mM (cada uno): 35 ml de oligos 16 µM + 0.9 ml de HT1. La imagen de fluorescencia de Typhoon de la celda de flujo recubierta de polímeros y la gráfica relacionada de la intensidad mediana de Typhoon de los polímeros en la superficie de monocapa de silano norborneno para TET QC1 y TET QC3 se ilustran en las figuras 1A, 1B, 1C y 1D, respectivamente. La imagen de fluorescencia de Typhoon de la celda de flujo recubierta de polímeros y la gráfica relacionada de la intensidad mediana de Typhoon de los polímeros en la superficie de monocapa de silano epoxi para TET QC1 y TET QC3 se ilustran en las figuras 2A, 2B, 2C y 2D respectivamente.

Las mediciones de TET QC para la superficie de norborneno y la superficie de epoxi se resumen en la Tabla 4 y Tabla 5, respectivamente.

Tabla 4.			
Bandas	% Cambio de intensidad, QC1->QC3	% Pérdida de superficie	Polímero
1	11%	-11%	PAZAM control
2	-1%	1%	P1
3	0%	0%	P4
4	-3%	3%	P6
5	13%	-13%	PAZAM control
6	-2%	2%	P1
7	-6%	6%	P4
8	-5%	5%	P6

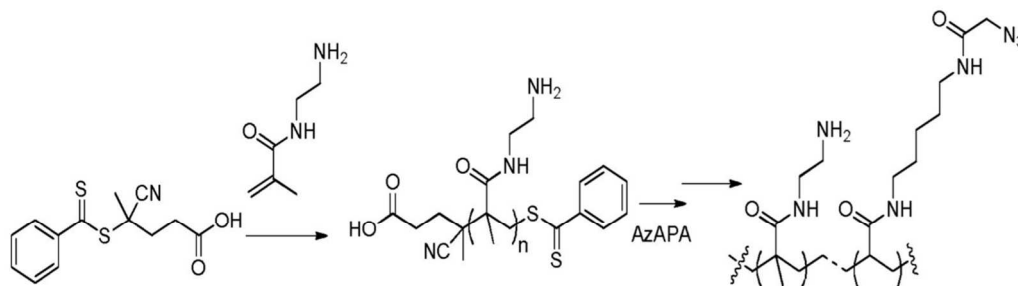
Tabla 5.			
Bandas	% Cambio de intensidad, QC1->QC3	% Pérdida de superficie	Polímero
1	84%	-84%	PAZAM control
2	31%	-31%	P1
3	11%	-11%	P4
4	13%	-13%	P6
5	84%	-84%	PAZAM control
6	32%	-32%	P1
7	12%	-12%	P4
8	24%	-24%	XL-PAAM3

Los resultados del par de celdas de flujo indicadas antes proporcionaron constatación que apoya el uso de la reactividad ortogonal de los materiales de poli(acrilamida) para mantener la secuenciación por síntesis. Primero, todos los materiales funcionalizados con azido ensayados eran capaces de adherirse de manera segura a una superficie norborneno. Esto significa que la incorporación de azida en la estructura del polímero era tal que se podía obtener una superficie estable, medida por un ensayo de tensión térmica. En segundo lugar, todos los polímeros funcionalizados con amina eran capaces de recubrir la superficie epoxídica que se generaba por el uso de un desecador. Las densidades de los cebadores de la superficie eran de aproximadamente 20-30k. En estos experimentos, el polímero de control (es decir, el PAZAM de referencia), que no contenía grupo funcional amina, mostraba la mayor pérdida de superficie después del ensayo de tensión térmica. Este es el resultado esperado. Los polímeros de poli(acrilamida) bifuncionalizados P1, P4 y P6, cada uno con 5% de grupos funcionales amina, mostraban una estabilidad de superficie razonable. Los resultados indicaban que estas superficies recubiertas de poli(acrilamida) eran robustas (las pérdidas de superficie estaban en el intervalo de aproximadamente el 20% a 30% después de someter la superficie recubierta de polímero al ensayo de tensión estándar). Los resultados de los cambios en la señal de TET QC de la superficie de

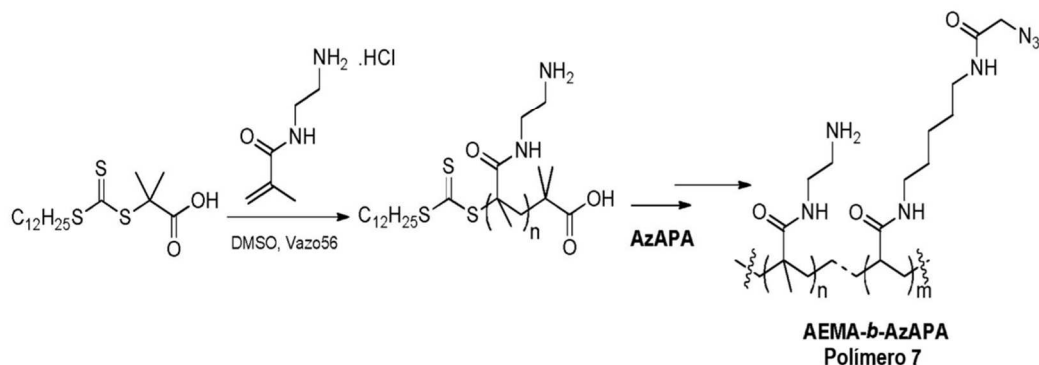
monocapa de norborneno y la superficie de monocapa de epoxi se muestran en la fig. 3A y fig. 3B respectivamente. De las tres poli(acrilamidas) bifuncionalizadas ensayadas, el Polímero 4 demuestra la mejor robustez de la superficie.

Las poli(acrilamidas) ortogonales preparadas por el procedimiento descrito antes son en general copolímeros aleatorios. Puede ser deseable separar diferentes partes funcionales de la arquitectura del polímero, por ejemplo, separando todos los grupos funcionales azida de todos los grupos funcionales amina en diferentes segmentos de la cadena polimérica. Esta síntesis alternativa se puede lograr fácilmente usando métodos de polimerización por radicales controlada (CRP) (p. ej., RAFT, ATRP). Los esquemas 2.1 y 2.2 demuestran dos rutas sintéticas para preparar un copolímero de bloques AEMA-b-AzAPA (Polímero 7).

Esquema 2.1.



Esquema 2.2.



El rendimiento del recubrimiento de un copolímero de bloques AEMA-b-AzAPA preparado por una técnica RAFT de acuerdo con el Esquema 2.2 se comparó con el de un copolímero aleatorio Polímero 4 sobre una superficie de monocapa de epoxi-silano. El procedimiento de CVD se llevó a cabo en la celda de flujo usando un desecador en un horno a 60°C y la celda de flujo se incubó durante la noche. La configuración de la celda de flujo se resume en la Tabla 6. La reacción de acoplamiento entre los grupos funcionales amino del Polímero 7 y el Polímero 4 con la superficie epoxídica se realizó a 60°C durante una hora.

Tabla 6

Canal	Temperatura de acoplamiento del polímero (°C)	Tiempo de acoplamiento de polímero/superficie epoxídica (min)	Vol. de polímero usado para acoplamiento (μl)	Polímero	Aprox. [polímero]/% p/v	[P5/P7]/μM
1	60	60	450	Polímero 7	0,3*	10
2	60	60	450	Polímero 7	0,3*	10
3	60	60	450	Polímero 7	0,3*	10
4	60	60	450	Polímero 7	0,3*	10
5	60	60	450	Polímero 4	0,5	10
6	60	60	450	Polímero 4	0,5	10
7	60	60	450	Polímero 4	0,5	10
8	60	60	450	Polímero 4	0,5	10

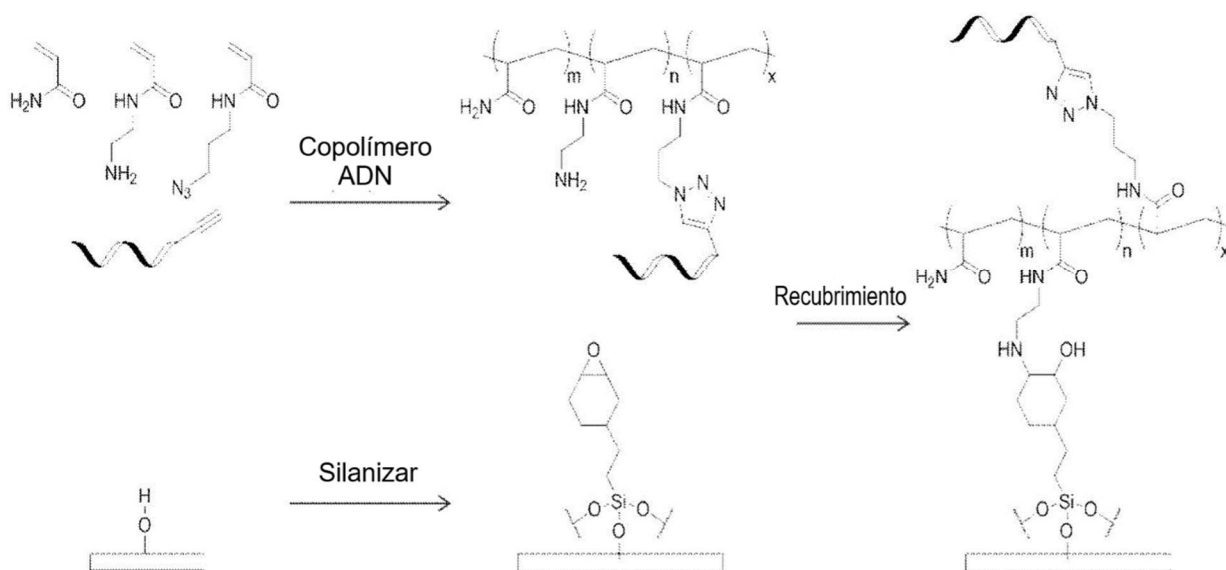
* El contenido de sólidos de este lote, medido por RI, era muy alto (4,9%Brix a 0,3% en p/v)

Se usaron dos medidas de QC (QC1 y QC3) para medir el éxito del método. La imagen de fluorescencia de Typhoon de la celda de flujo recubierta de polímero y la gráfica relacionada de la intensidad mediana de Typhoon de los polímeros en la superficie de monocapa de epoxi-silano para TET QC1 y TET QC3 se ilustran en las figs. 4A, 4B, 4C y 4D, respectivamente. Los resultados del cambio de señal de TET QC se muestran en la fig. 4E. Las mediciones de TET QC para la superficie epoxídica se resumen en la Tabla 7 a continuación. Ambos materiales produjeron superficies estables según se midió por TET QC realizado después de un ensayo de tensión térmica. En cada caso, los revestimientos eran muy uniformes.

Tabla 7.			
Bandas	Polímero	% Cambio de intensidad QC1->QC3	% Pérdida de superficie
1	Polímero 7	4%	-4%
2	Polímero 7	4%	-4%
3	Polímero 7	3%	-3%
4	Polímero 7	2%	-2%
5	Polímero 4	12%	-12%
6	Polímero 4	13%	-13%
7	Polímero 4	13%	-13%
8	Polímero 4	14%	-14%

Ejemplo 2

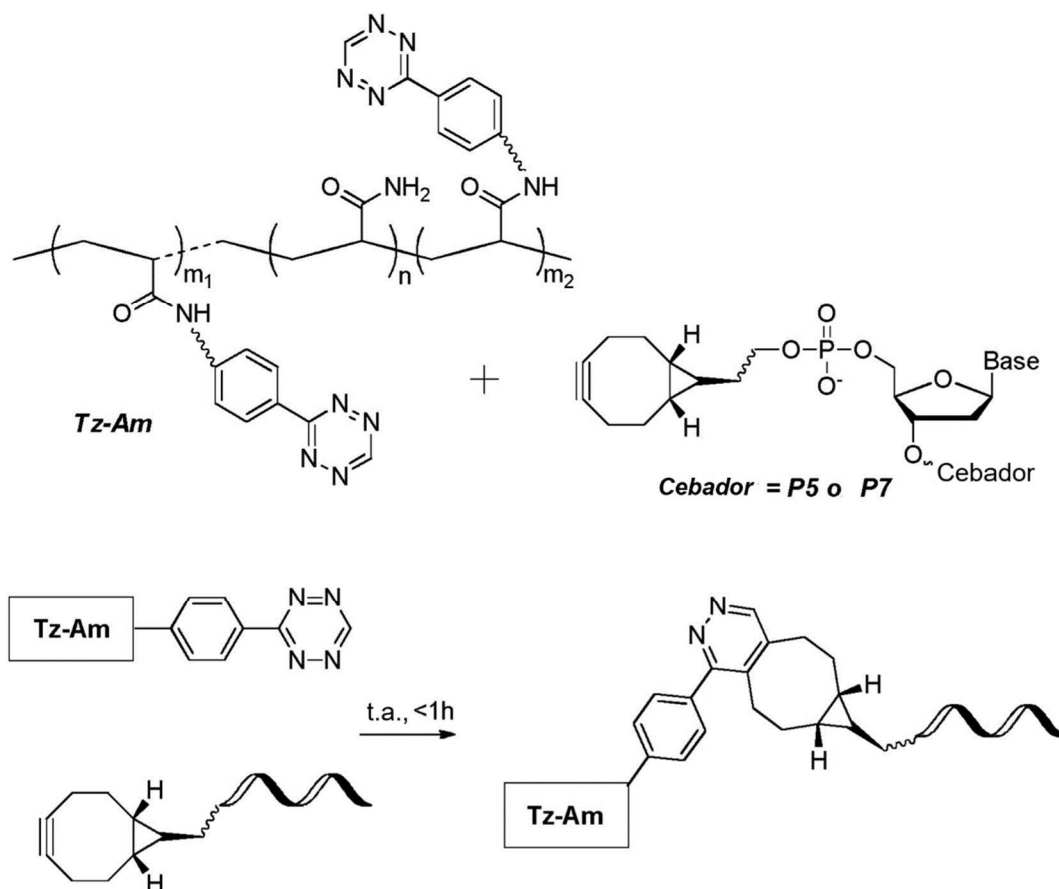
Esquema 3.



El esquema 3 ilustra un diagrama de flujo de preparación de sustrato inmovilizando un copolímero de ADN en una superficie de sustrato silanizada. Primero, se forma el copolímero de ADN haciendo reaccionar cebadores funcionalizados con alquino con monómeros de acrilamida, azido-acrilamida y amino-acrilamida para formar un copolímero ternario pre-injertado (copolímero de ADN). La superficie del sustrato se trata primero con un silano que comprende grupos epoxi. Después, el copolímero de ADN se inmoviliza en la superficie del sustrato haciendo reaccionar los grupos amino primarios del polímero con los grupos epoxi del silano. La arquitectura del copolímero de ADN preparado por este procedimiento se puede modificar por adición de otros monómeros, por ejemplo, se puede añadir N,N-metilenbisacrilamida para introducir reticulación de una manera definida, o se pueden añadir inímeros (o monómero-iniciadores) para introducir puntos de ramificación de una manera definida. También se pueden usar técnicas de polimerización controlada tales como RAFT, ATRP o NMP para crear estructuras de copolímeros de bloques que separan las partes funcionales del polímero para que sea más eficaz, si es necesario.

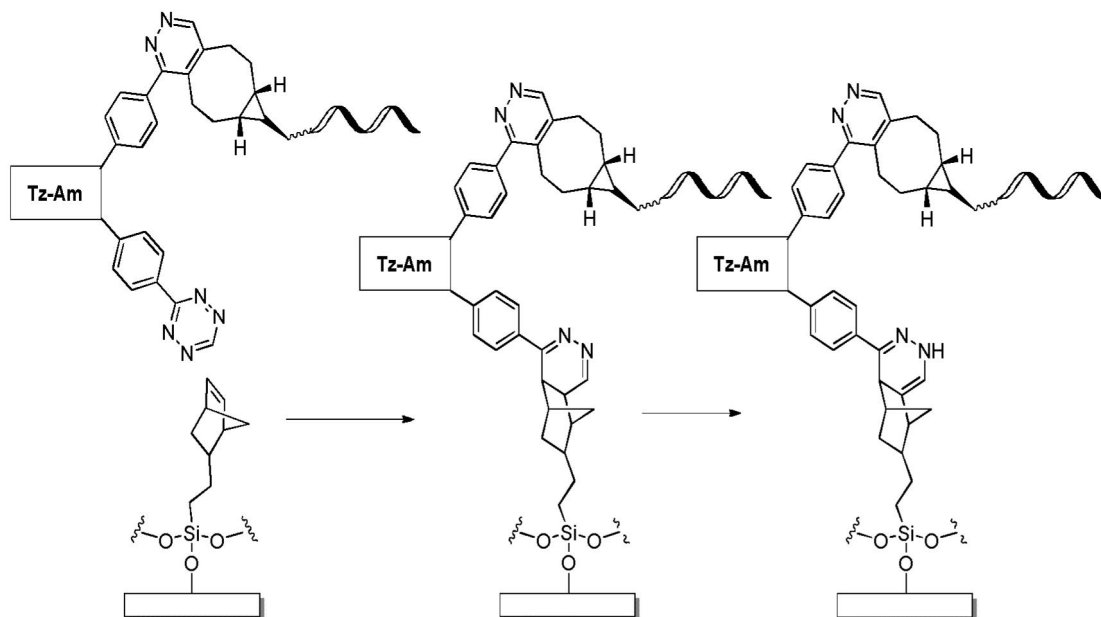
Ejemplo 3

Esquema 4. Reacción de oligo con polímero funcionalizado con tetrazina



- 5 El esquema 4 ilustra la reacción entre los cebadores P5 o P7 funcionalizados con biciclo[6.1.0]non-4-ino ("BCN") con polímero de acrilamida modificado con tetrazina ("Tz-Am") para formar un polímero injertado. Esta reacción click promovida por tensión, sin catalizador, se puede llevar a cabo a temperatura ambiente y es compatible con el entorno acuoso. El polímero injertado resultante se puede purificar usando una serie de métodos, p. ej., precipitación o filtración de flujo tangencial ("TFF"), etc. Otras posibles cadenas principales poliméricas no limitantes que se pueden usar en este procedimiento incluyen poliacrilatos o polifosfacenos.

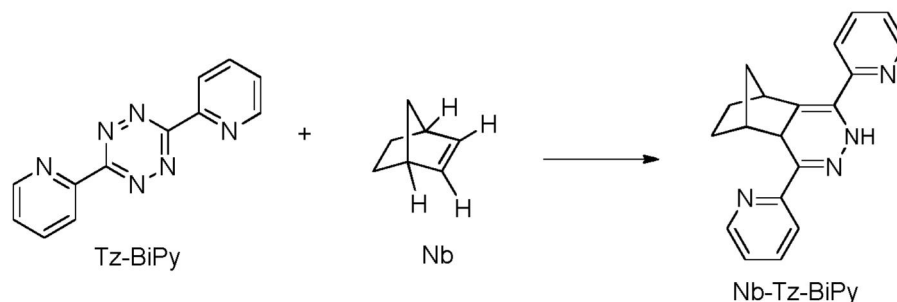
Esquema 5. Unión de polímero con tetrazina preinjertado a la superficie



El esquema 5 ilustra la unión del polímero de acrilamida con tetrazina preinjertado a la superficie funcionalizada con norborneno de un sustrato. La superficie silanizada de norborneno es una parte estándar de la plataforma NextSeq® de Illumina. Alternativamente, el polímero funcionalizado con tetrazina y los cebadores BCN se pueden unir a la superficie del sustrato *in situ* en lugar de formar el polímero injertado.

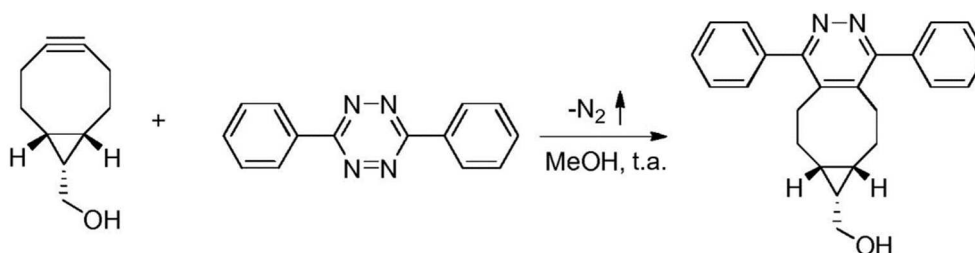
Para evaluar la viabilidad de este enfoque, se llevaron a cabo experimentos iniciales usando un sistema modelo en una reacción en disolución a pequeña escala (Esquema 6).

Esquema 6.



El esquema 6 demuestra la reacción entre el norborneno (Nb) y una bipiridil-tetrazina (BiPy) disponible en el mercado en una relación molar 1:1. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente en un tubo de RMN, usando CDCl_3 como disolvente con agitación suave. Se realizó un espectro de RMN de la mezcla de reacción en tres tiempos de medición diferentes, uno al comienzo de la reacción ($t = 0$), uno a los 15 minutos y otro a los 60 minutos. Los espectros de RMN mostraban que el pico de los dos hidrógenos del alqueno del norborneno (con un desplazamiento químico a aproximadamente 5.8 ppm) estaba desapareciendo y se volvían casi invisibles después de una hora (véase la fig. 5). Esto indica la rápida cinética de la reacción entre la tetrazina y el norborneno.

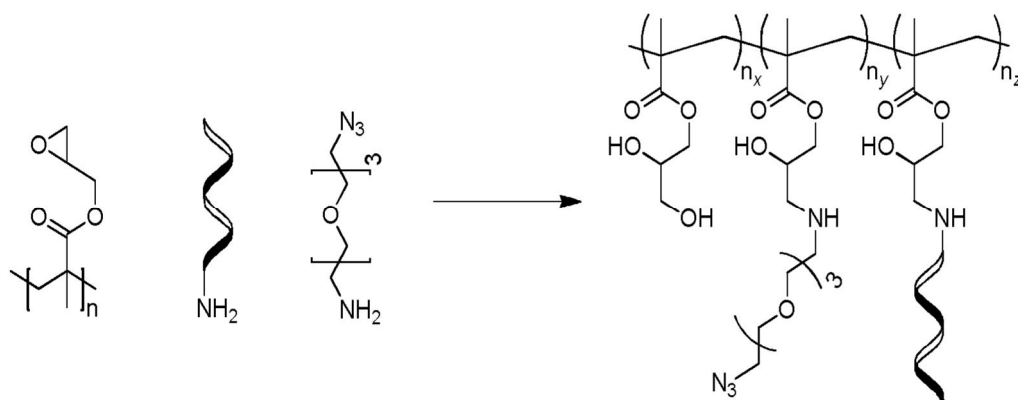
Esquema 7.



En un experimento separado, el Esquema 7 demuestra una cicloadición [4 + 2] promovida por tensión fácil de ciclooctino (10 mM) con una 1,2,4,5-tetrazina sustituida con bisfenilo (1 mM). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente en MeOH seco. La Fig. 6 muestra el patrón de disminución de la absorción de UV-vis del ciclooctino que indica que la reacción casi se había completado después de solo 9 minutos. Véase W. Chen, D. Wang, C. Dai, D. Hamelberg B. Wang, *Chem. Commun.*, 2012, 48, 1736-1738.

Ejemplo 4

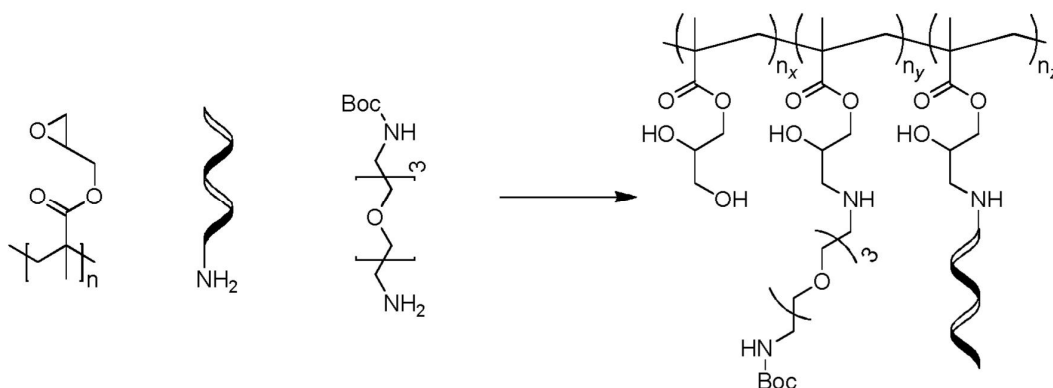
Esquema 8. Preparación de poli(metacrilato de glicidilo) preinjertado



El esquema 8 ilustra la preparación de un polímero peine de poli(metacrilato de glicidilo) preinjertado haciendo reaccionar los grupos éter de glicidilo del poli(metacrilato de glicidilo) con los grupos amino de los cebadores funcionalizados y amino-PEG-azida. Este polímero injertado se puede unir a una superficie de norborneno de referencia por una reacción click promovida por tensión, sin catalizador, entre los grupos azido de la cadena lateral del polímero y los norbornenos. Se puede usar una serie de amino-azidas disponibles en el mercado y los grupos azido también se pueden sustituir por otros grupos funcionales ortogonales.

Ejemplo 5

Esquema 9. Preparación de poli(metacrilato de glicidilo) preinjertado



El esquema 9 ilustra la preparación de un polímero peine de poli(metacrilato de glicidilo) preinjertado haciendo reaccionar los grupos glicidilo del poli(metacrilato de glicidilo) con los grupos amino de los cebadores funcionalizados y amino-PEG-Boc-amida. Este polímero injertado después se somete a la desprotección de Boc para generar la cadena lateral funcionalizada con amino primario, que se une a una superficie funcionalizada con glicidilo o epoxi.

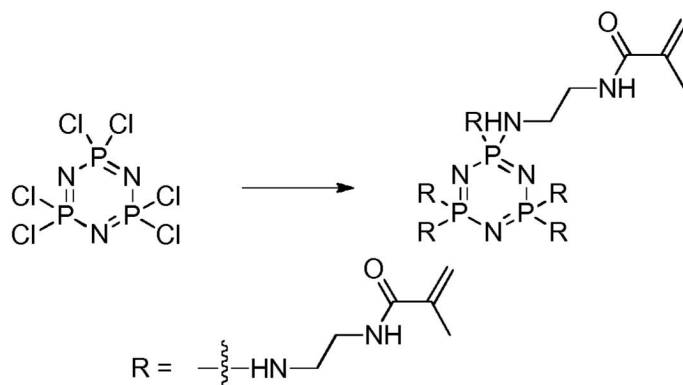
Ejemplo 6

La fig. 7 ilustra la posible química de superficie de un dendrímero preinjertado con superficie externa unida a oligonucleótidos. El punto de origen del dendrímero se puede funcionalizar con un grupo azido para la unión directa a la superficie. Alternativamente, el grupo azido puede reaccionar con un grupo alquino en el punto central de un segundo dendrímero, en donde el segundo dendrímero tiene una superficie externa cubierta de grupos de unión al sustrato "A" para crear una partícula de tipo Janus para el autoensamblaje.

Ejemplo 7

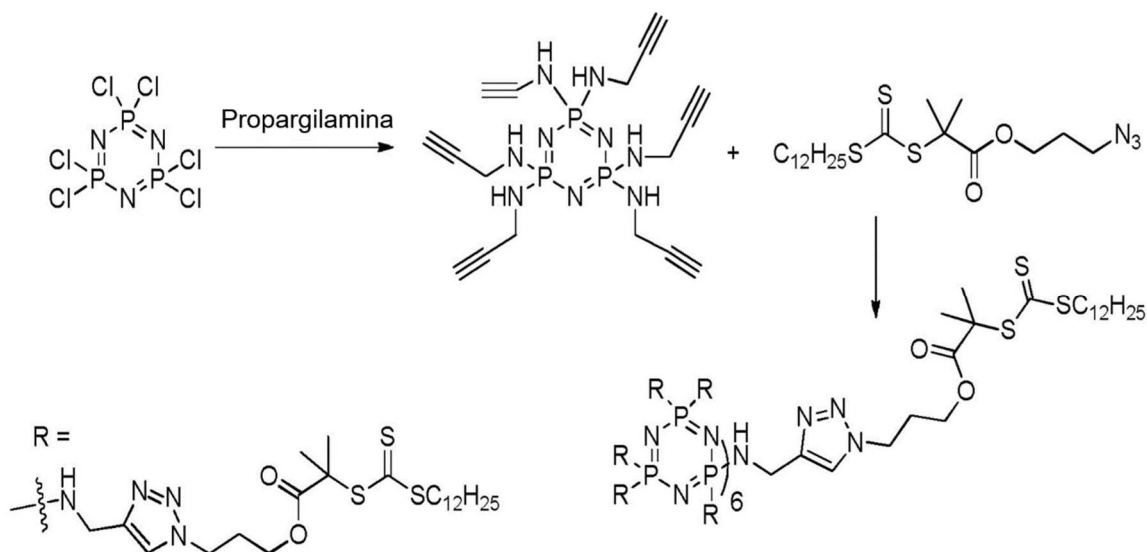
También se pueden usar polímeros ortogonales con cadenas principales de polifosfaceno en la presente solicitud. Los polifosfacenos pueden servir como armazones lineales para una posible ramificación de la arquitectura del polímero, la construcción de polímeros dendronizados o para la posterior unión de polímero. El esquema 10.1 ilustra una ruta sintética que usa el núcleo de hexaclorofosfaceno cíclico para la construcción de monómeros de acrilamida modificados.

Esquema 10.1.

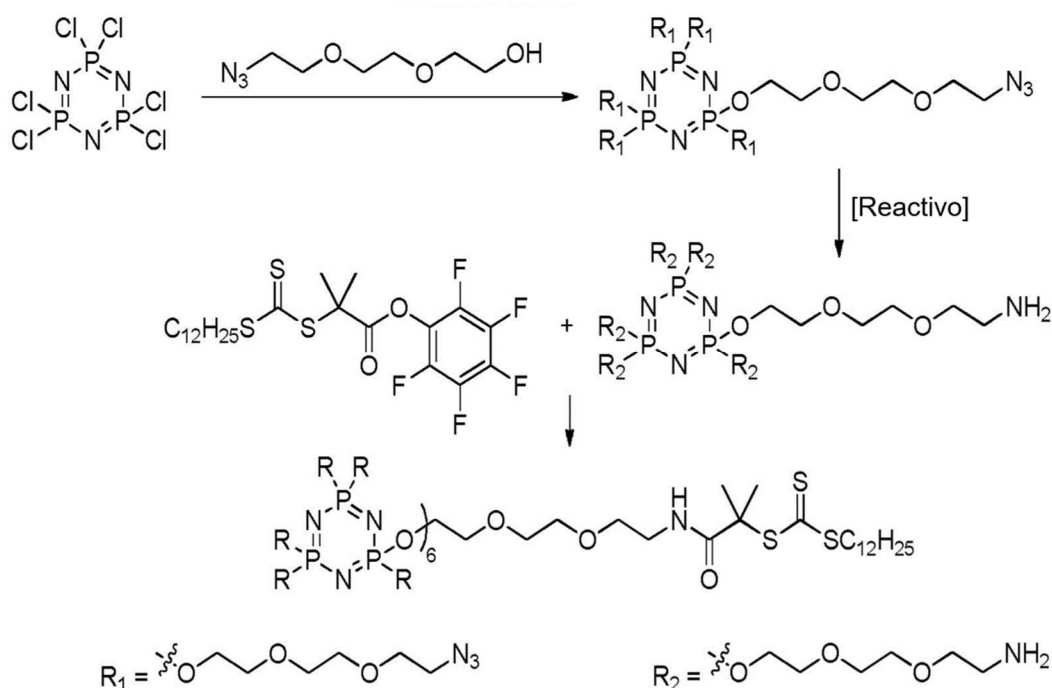


Los esquemas 10.2 y 10.3 demuestran la síntesis de dos armazones de polifosfaceno para la posterior unión de polímero. Han descrito varias síntesis de polifosfacenos Qiu et al., *Nanotechnology*, 18 (2007) 475-602 y Cheng et al., *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 2013, 51, 1205-1214.

Esquema 10.2.

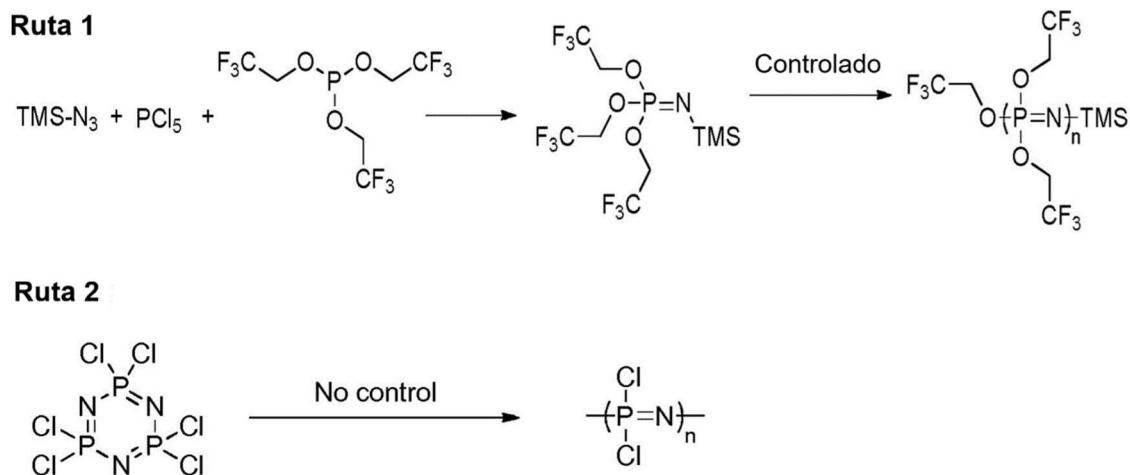


Esquema 10.3.



El esquema 10.4 ilustra dos posibles rutas para preparar la cadena principal de polidiclorofosfaceno lineal (PDPCP). La ruta 1 es la polimerización aniónica controlada. La ruta 2 es la reacción de apertura de anillo del hexaclorofosfaceno. Se prefiere la ruta 1 con acceso potencial a arquitectura polimérica lineal, ciclo-lineal y reticulada, así como la posibilidad de introducir reticulación.

Esquema 10.4.



Listado de secuencias

- 10 <110> Illumina Cambridge Limited Brown, Andrew A George, Wayne N. Richez, Alexandre Dingwall, Anne-Cecile von Hatten, Xavier
- <120> POLÍMEROS NUEVOS Y RECUBRIMIENTOS DE COPOLÍMEROS DE ADN
- <130> ILLINC.267A
- <150> 62/073764
- 15 <151> 31-10-2014
- <160> 4

<170> FastSEQ for Windows Versión 4.0

<210> 1
 <211> 29
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintetizado artificialmente

<400> 1
 aatgatacgg cgaccaccga gauctacac 29

10 <210> 2
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 15 <223> Cebador sintetizado artificialmente

<400> 2
 caagcagaag acggcatacg agat 24

<210> 3
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintetizado artificialmente

<400> 3
 25 aatgatacgg cgaccaccga 20

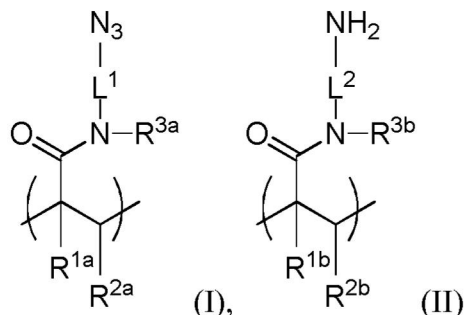
<210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador sintetizado artificialmente

<400> 4
 caagcagaag acggcatacg a 21

REIVINDICACIONES

1. Un polímero para la funcionalización de superficies, que comprende una unidad repetitiva de fórmula (I) y una unidad repetitiva de fórmula (II):



5 en donde:

cada R^{1a} , R^{2a} , R^{1b} y R^{2b} es independientemente hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido o fenilo opcionalmente sustituido;

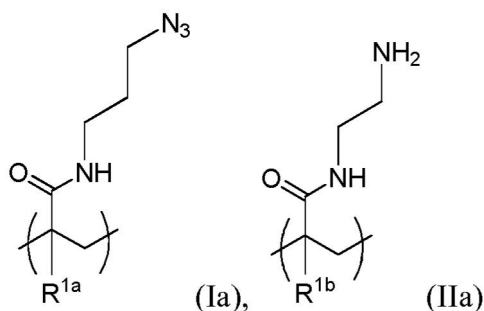
cada R^{3a} y R^{3b} es independientemente hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, fenilo opcionalmente sustituido o aralquilo C_{7-14} opcionalmente sustituido; y

10 cada L^1 y L^2 es independientemente un conector de alquileo opcionalmente sustituido o un conector heteroalquileo opcionalmente sustituido.

2. El polímero de la reivindicación 1, en donde R^{1a} es hidrógeno o alquilo opcionalmente sustituido y cada uno de R^{2a} y R^{3a} es hidrógeno, y/o en donde R^{1b} es hidrógeno o alquilo opcionalmente sustituido y cada uno de R^{2b} y R^{3b} es hidrógeno.

15 3. El polímero de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde L^2 es un alquileo opcionalmente sustituido, y/o en donde L^1 es un alquileo opcionalmente sustituido.

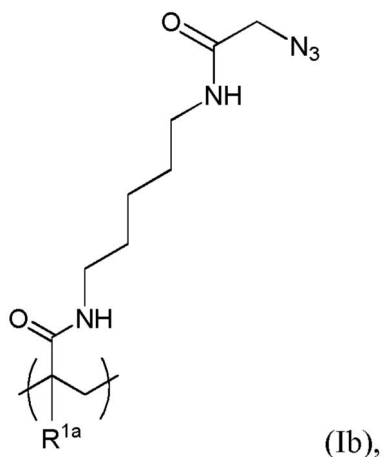
4. El polímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la unidad repetitiva de fórmula (I) y fórmula (II) están representadas por la fórmula (Ia) y fórmula (IIa):



20 en donde R^{1a} es hidrógeno o metilo y R^{1b} es hidrógeno o metilo.

5. El polímero de la reivindicación 1, en donde L^1 es $-(CH_2)_m-NH-(CH_2)_n-$ opcionalmente sustituido con uno o más oxo, y en donde cada m y n es un número entero seleccionado independientemente de 1 a 10.

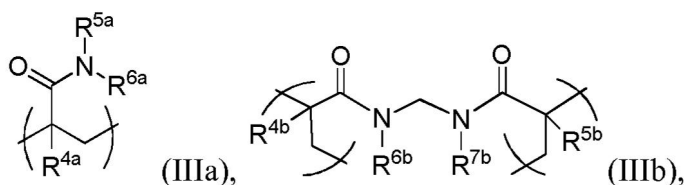
6. El polímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 5, en donde la unidad repetitiva de fórmula (I) está representada por la fórmula (Ib):



en donde R^{1a} es hidrógeno o metilo.

7. El polímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además una o más unidades repetitivas seleccionadas del grupo que consiste en poliacrilamidas, poliacrilatos, poliuretanos, polisiloxanos, siliconas, poliacroleínas, polifosfacenos, poliisocianatos, polioles y polisacáridos, y combinaciones de los mismos.

8. El polímero de la reivindicación 7, en donde el polímero comprende una o más unidades repetitivas de fórmula (IIIa) o (IIIb) o ambas:

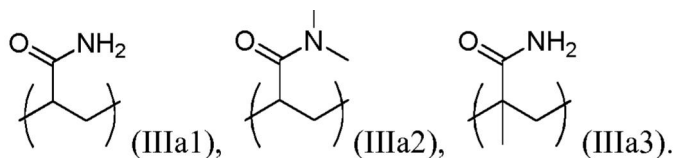


en donde cada R^{4a}, R^{4b} y R^{5b} se selecciona de hidrógeno o alquilo C₁₋₃; y

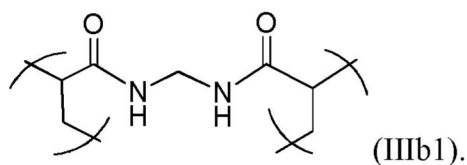
cada R^{5a}, R^{6a}, R^{6b} y R^{7b} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido o fenilo opcionalmente sustituido.

9. El polímero de la reivindicación 8, en donde cada R^{4a}, R^{4b} y R^{5b} se selecciona de hidrógeno o metilo, y/o en donde R^{6b} y R^{7b} son ambos hidrógeno y/o en donde al menos uno de R^{5a} o R^{6a} es hidrógeno, y/o al menos uno de R^{5a} o R^{6a} es (a) hidrógeno o (b) metilo.

10. El polímero de una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en donde las unidades repetitivas de fórmula (IIIa) también están representadas por (IIIa1), (IIIa2) o (IIIa3):



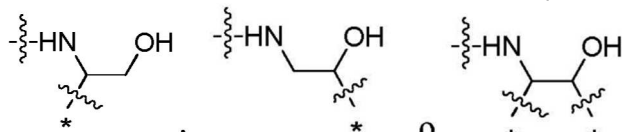
11. El polímero de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde las unidades repetitivas de fórmula (IIIb) también están representadas por (IIIb1):



12. Un sustrato que tiene una primera superficie que comprende un polímero de una cualquiera de las reivindicaciones

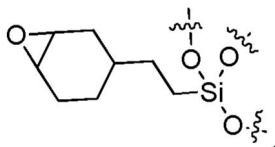
1 a 11 unido covalentemente a la misma.

13. El sustrato de la reivindicación 12, en donde la unión covalente entre el polímero y la primera superficie comprende



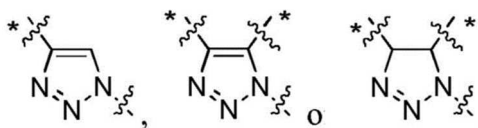
el resto de estructura , o combinaciones de los mismos, en donde el amino sustituido deriva de la unidad repetitiva de fórmula (II) y * indica el punto de conexión del polímero con la primera superficie del sustrato.

14. El sustrato de la reivindicación 12, en donde el sustrato se prepara haciendo reaccionar el polímero con una primera pluralidad de grupos funcionales unidos covalentemente a la primera superficie, en donde la primera pluralidad de grupos funcionales comprende vinilo, acrililo, alqueno, cicloalqueno, heterocicloalqueno, alquino, cicloalquino, heterocicloalquino, nitreno, aldehído, hidrazinilo, éter de glicidilo, epoxi, carbeno, isocianato o maleimida, o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de los mismos, incluyendo grupos funcionales que comprenden la estructura:



15. Un polímero injertado que comprende oligonucleótidos funcionalizados unidos covalentemente a un polímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

16. El sustrato de la reivindicación 12 o el polímero injertado de la reivindicación 1, en donde el enlace covalente entre el oligonucleótido funcionalizado y el polímero comprende el resto de estructura



, o combinaciones de los mismos, en donde * indica el punto de conexión del polímero con el oligonucleótido funcionalizado.

17. El polímero injertado de la reivindicación 15, preparado haciendo reaccionar uno o más restos funcionales del oligonucleótido funcionalizado con el polímero, en donde dichos uno o más restos funcionales comprenden alquinos, cicloalquenos, cicloalquinos, heterocicloalquenos, heterocicloalquinos, o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de los mismos.

18. El polímero injertado de la reivindicación 17, en donde dichos uno o más restos funcionales comprenden norborneno, ciclooctino o biclonoeno, o variantes opcionalmente sustituidas o combinaciones de los mismos, incluyendo en donde el biclonoeno es biclo[6.1.0]non-4-ino.

19. Un método para inmovilizar un polímero en una primera superficie de un sustrato, que comprende:

proporcionar un sustrato que tiene una primera superficie que comprende una primera pluralidad de grupos funcionales unidos covalentemente a la misma;

proporcionar un polímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11; y

hacer reaccionar la primera pluralidad de grupos funcionales de la primera superficie con el polímero de modo que el polímero se une covalentemente a la primera superficie del sustrato.

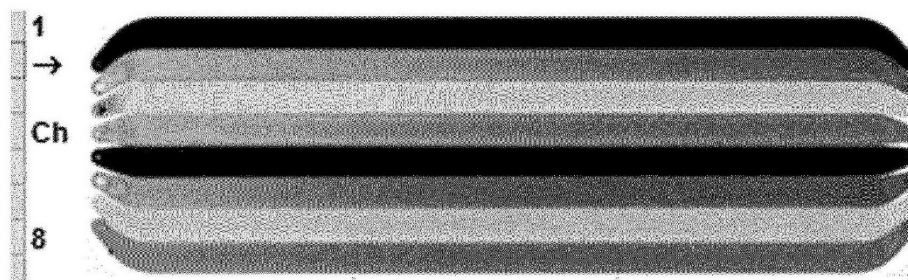


FIG. IA

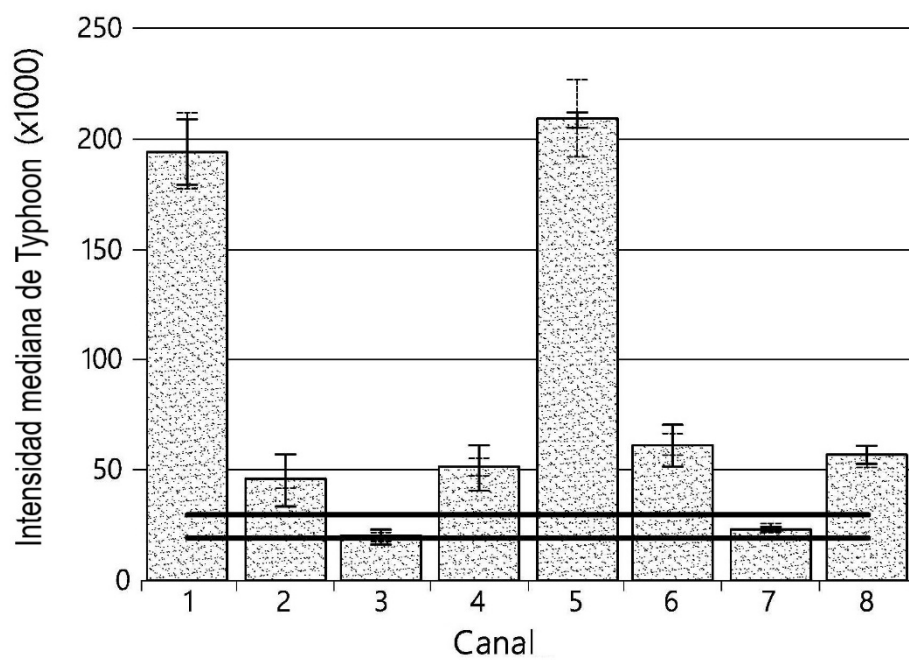


FIG. IB

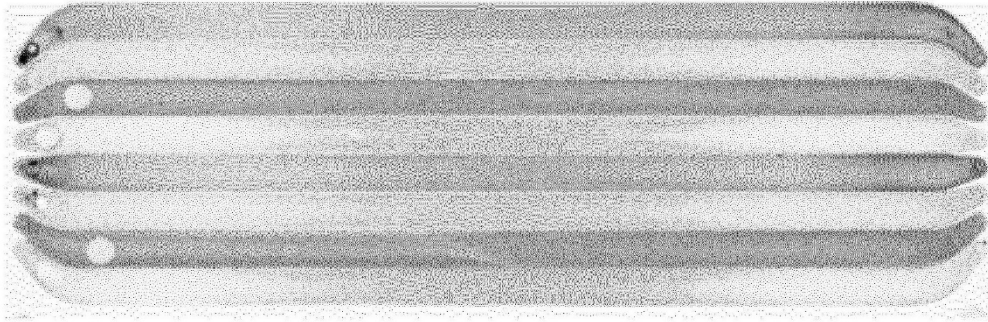


FIG. IC

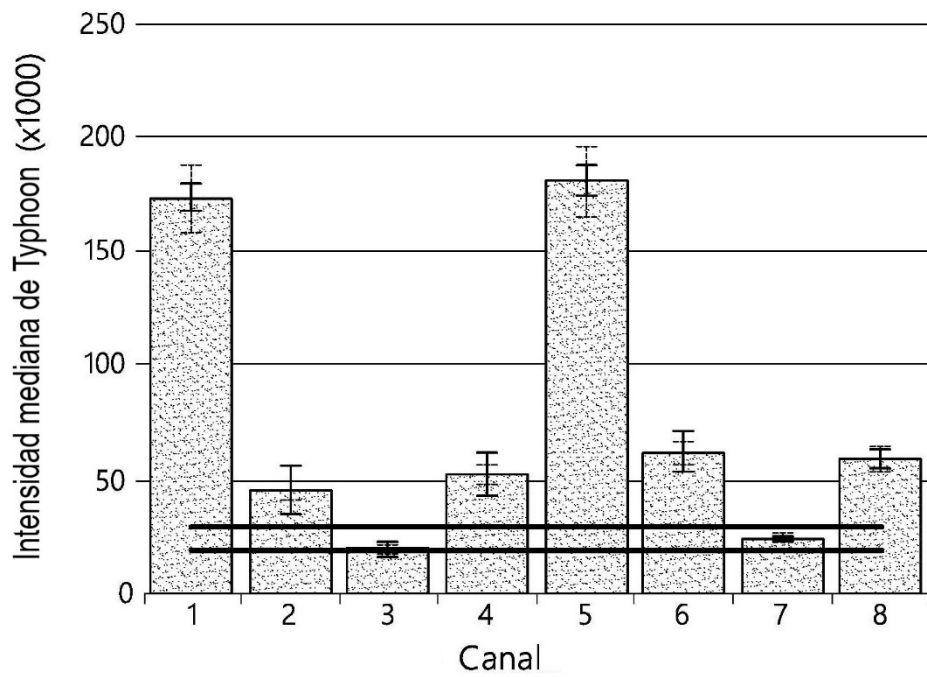


FIG. ID

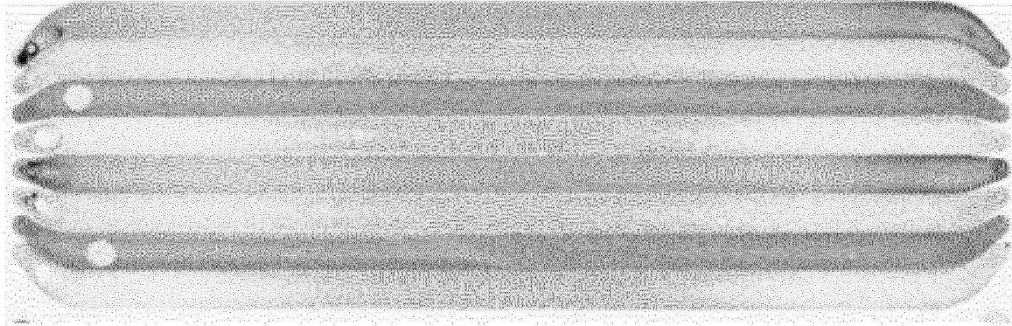


FIG. 2A

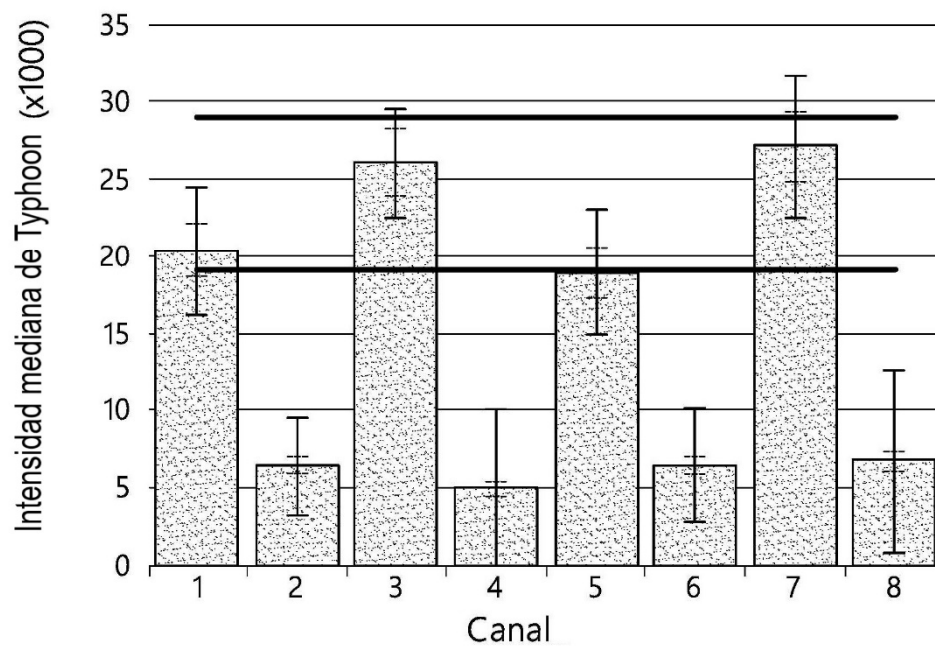


FIG. 2B

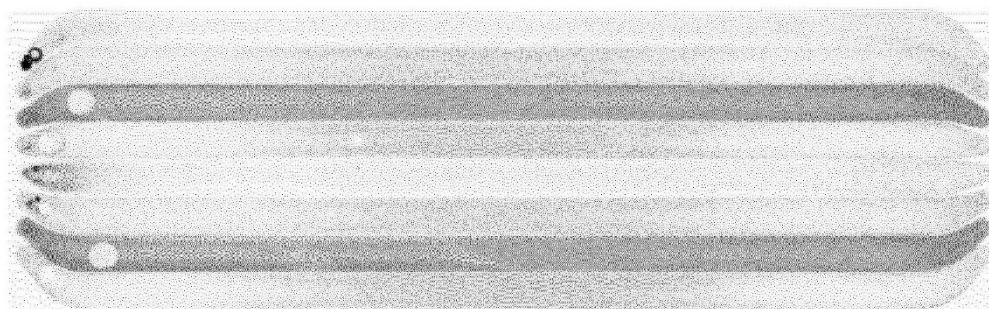


FIG. 2C

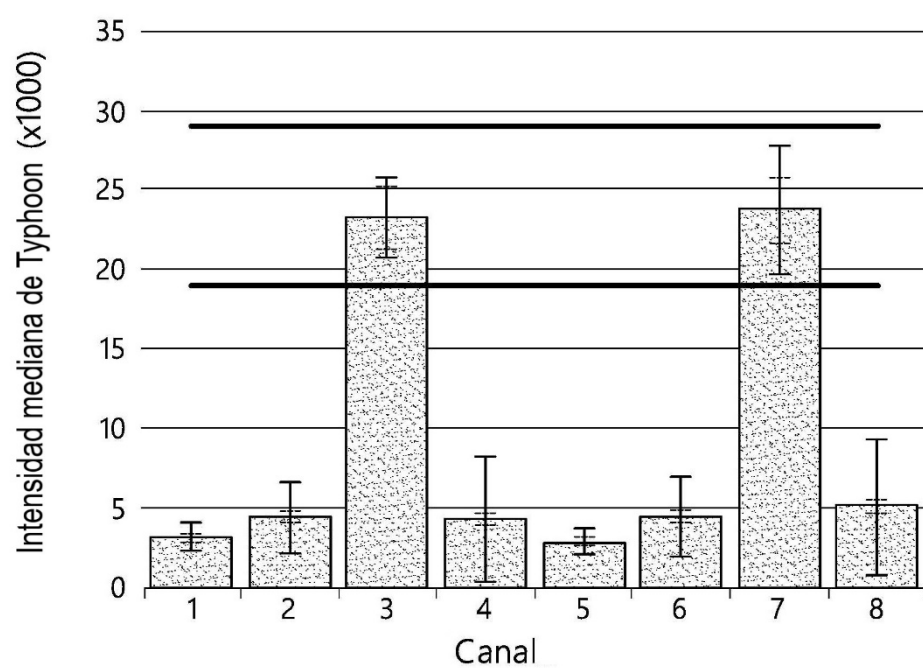


FIG. 2D

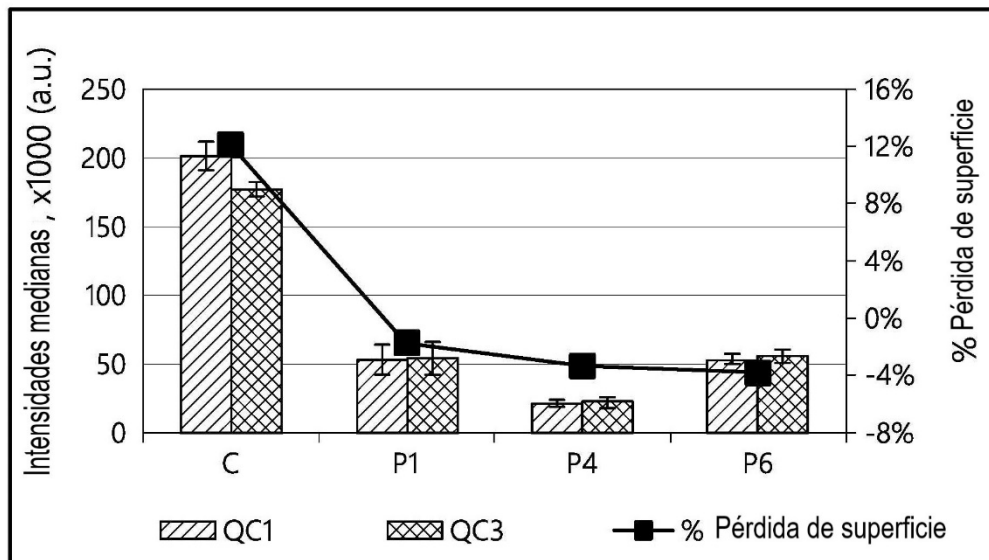


FIG. 3A

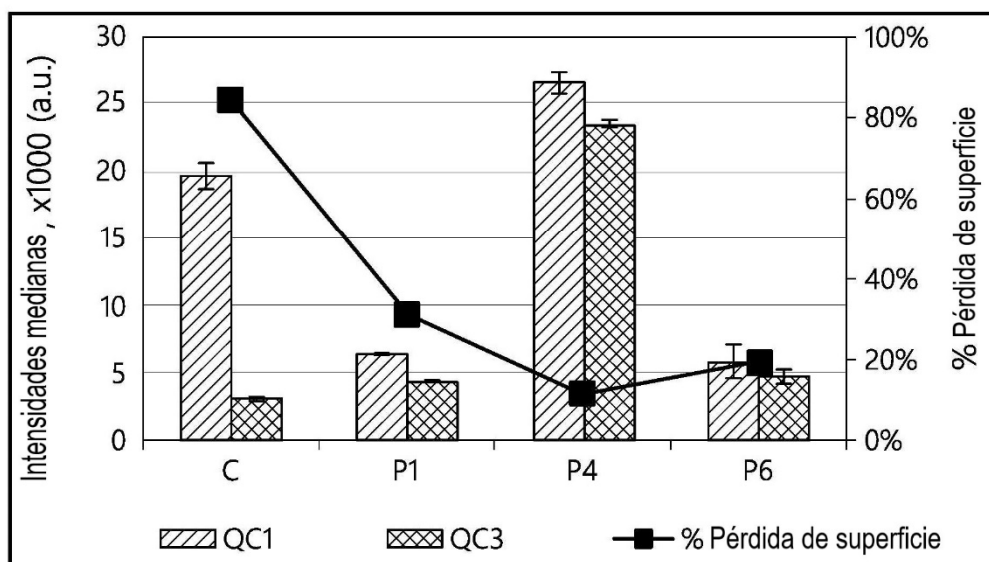


FIG. 3B

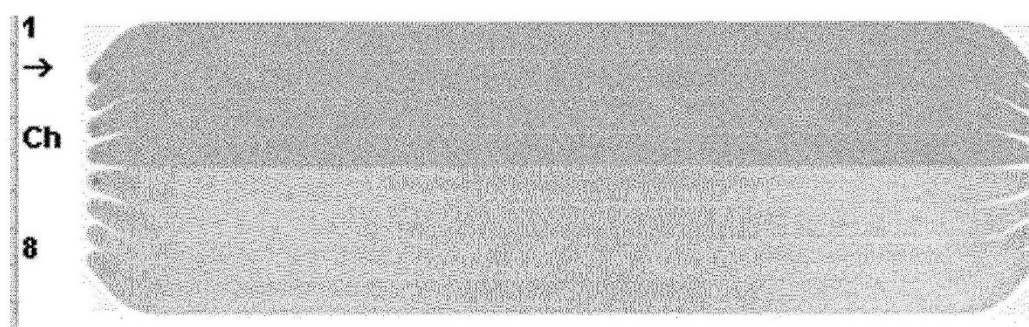


FIG. 4A

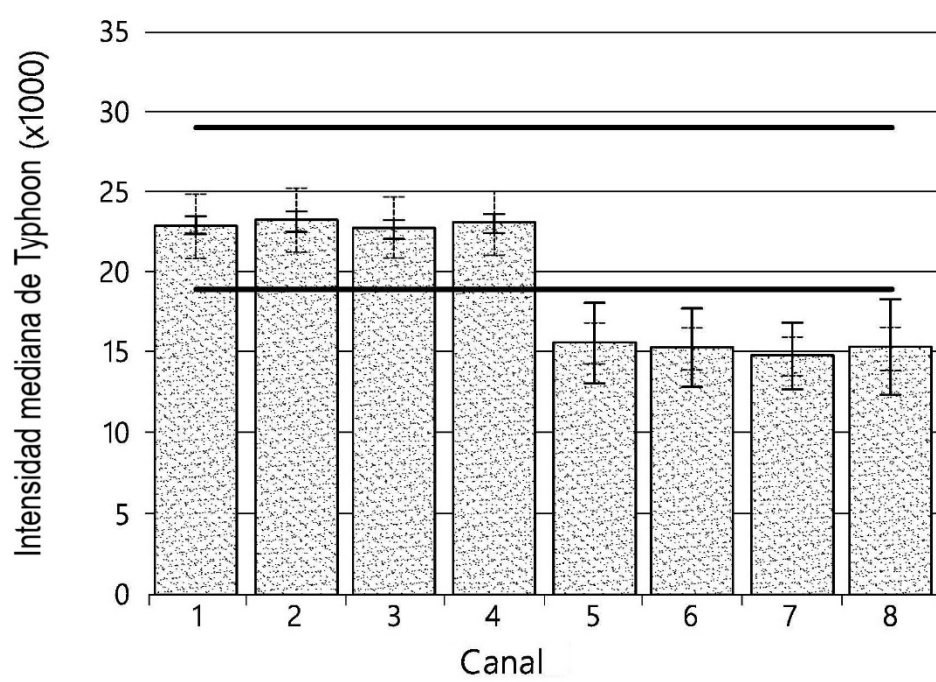


FIG. 4B

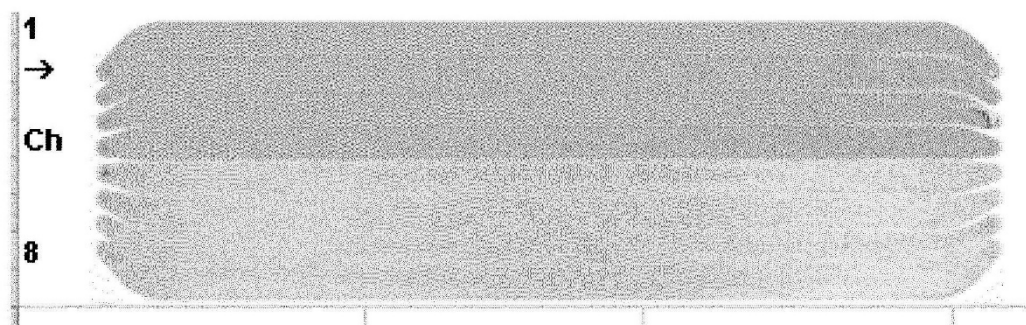


FIG. 4C

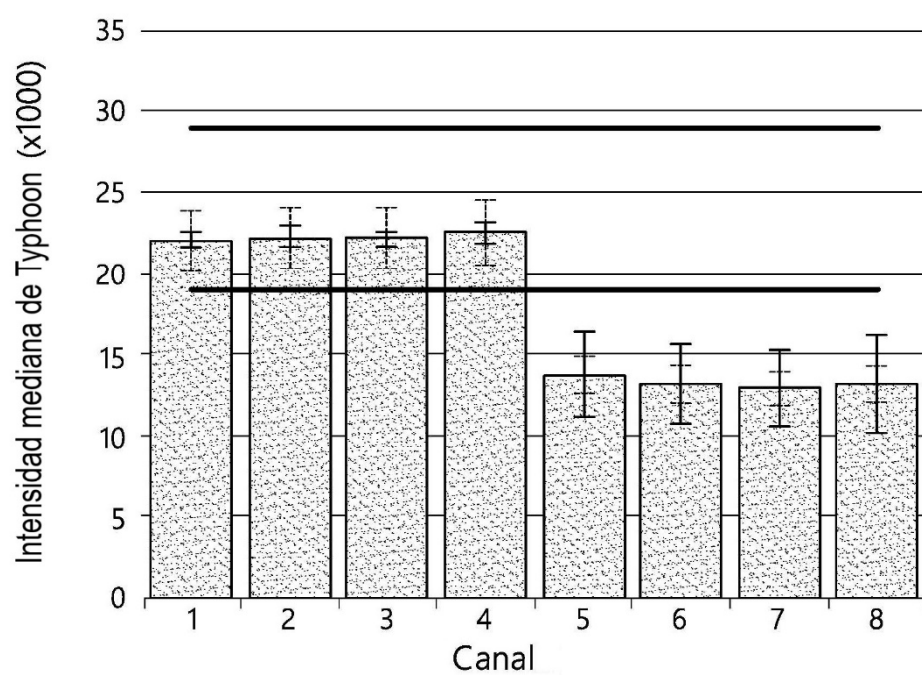


FIG. 4D

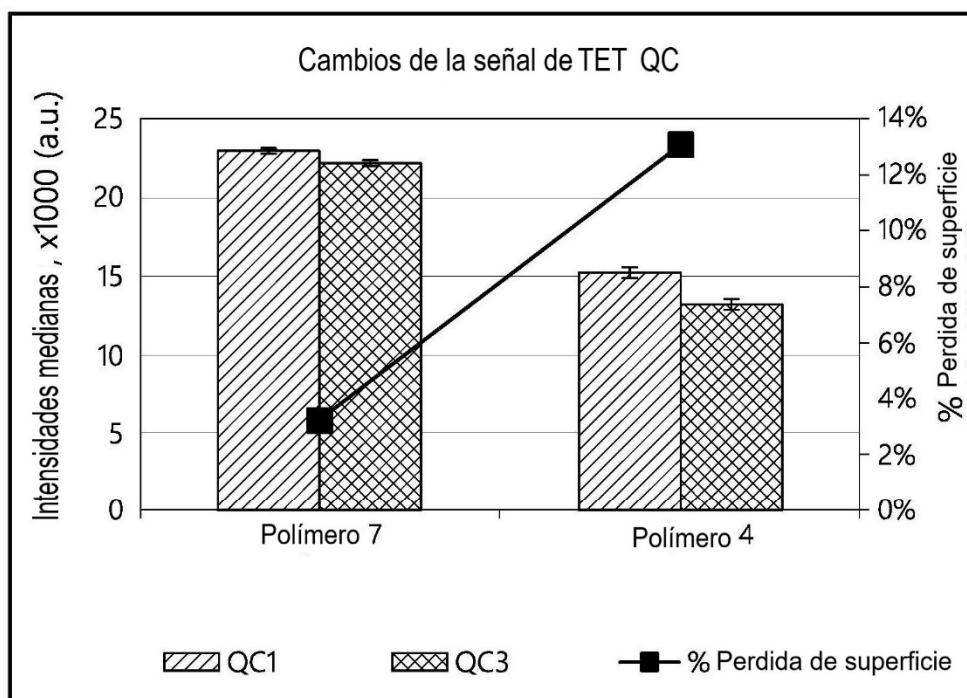


FIG. 4E

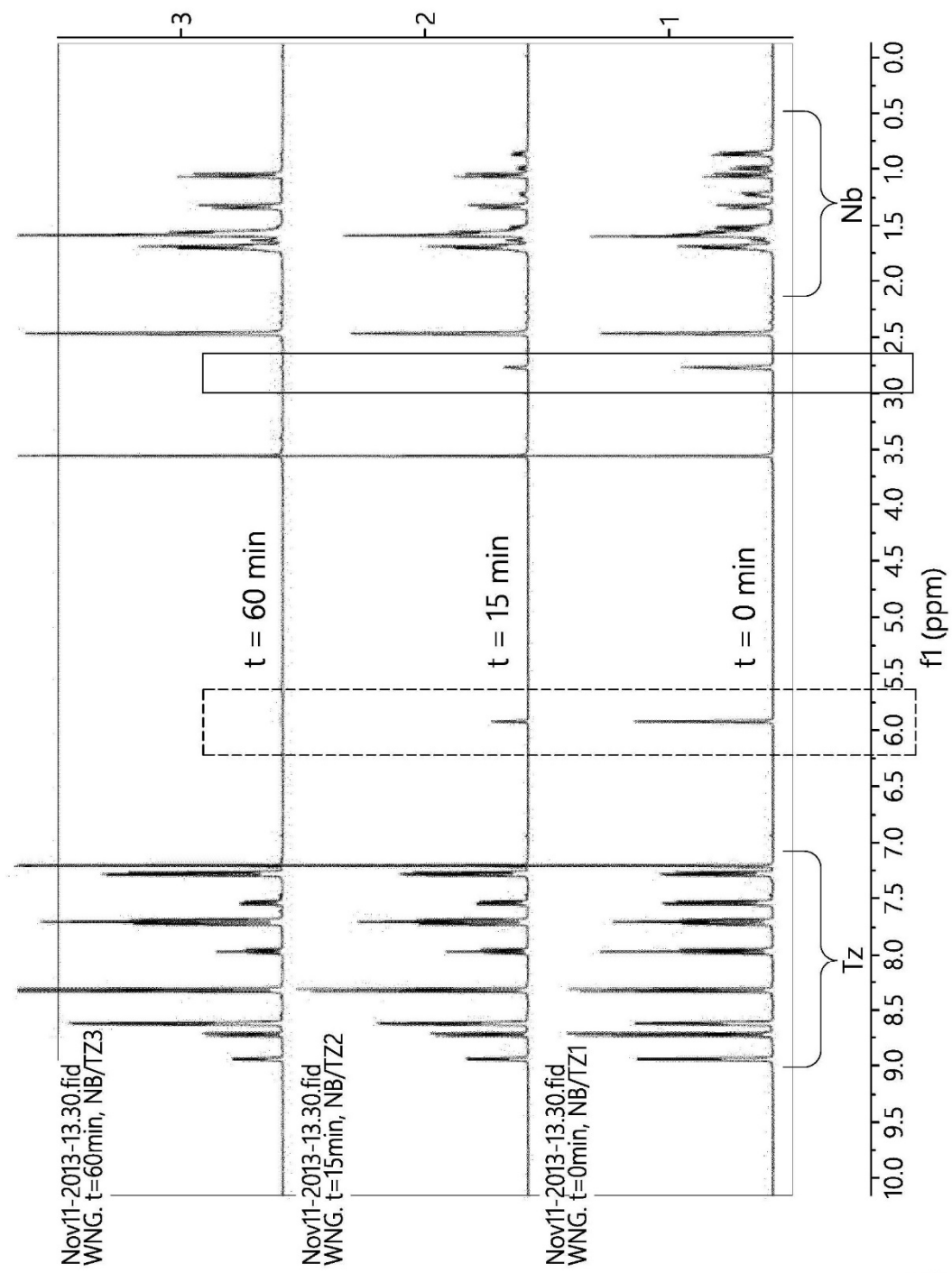


FIG. 5

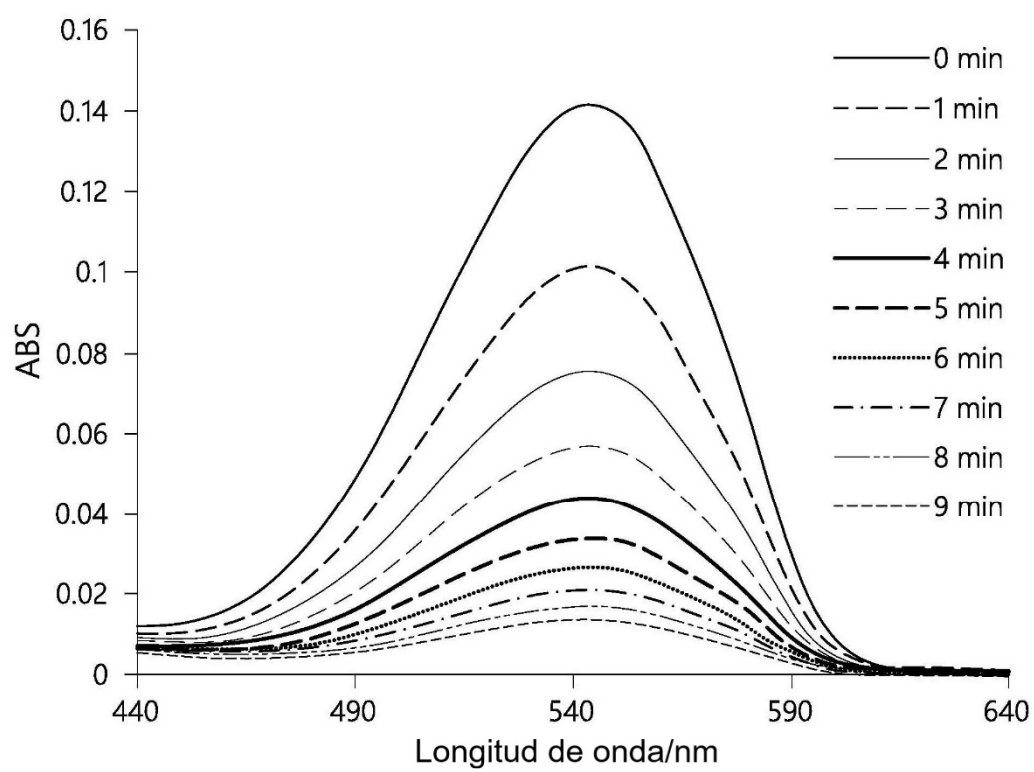


FIG. 6

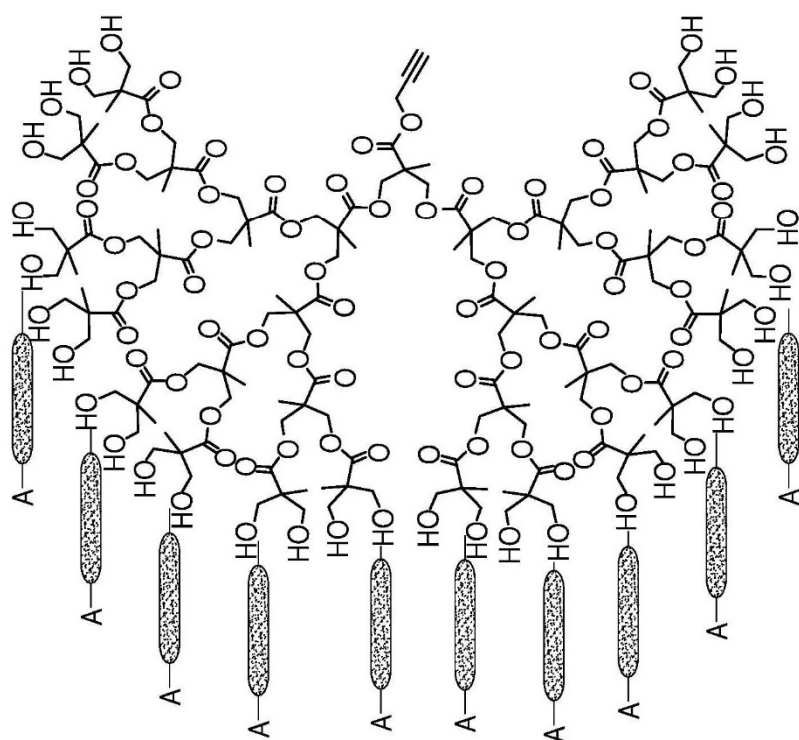
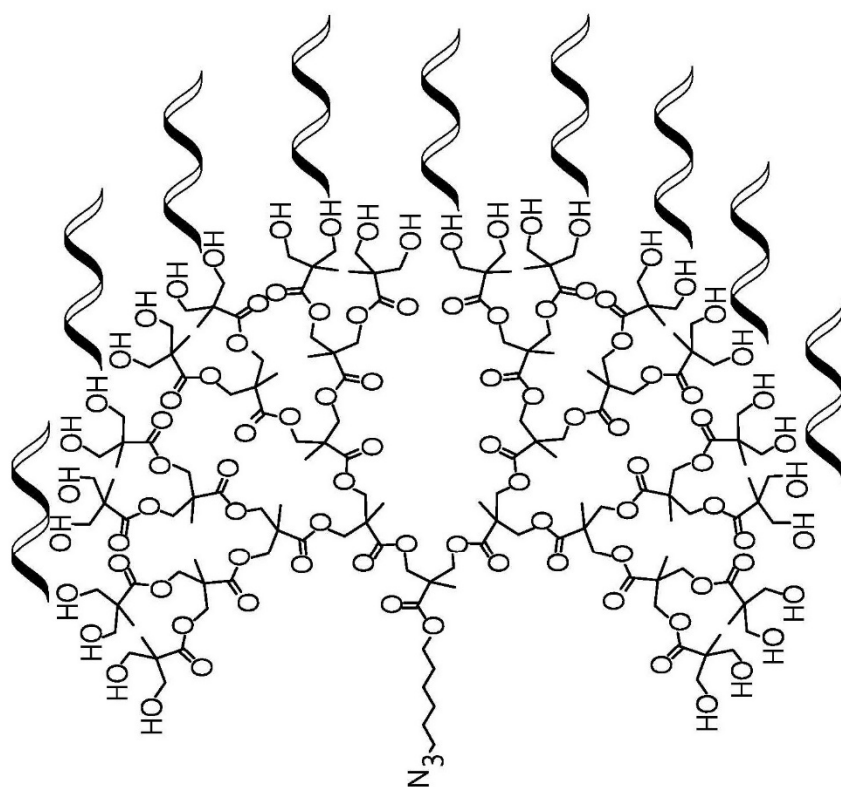


FIG. 7