

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 391**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/548 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.10.2011 PCT/IB2011/054472**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2012 WO12052874**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2011 E 11776563 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 2630494**

54 Título: **Procedimiento de funcionalización de superficies para la detección de analitos**

30 Prioridad:

28.03.2011 FR 1152558

18.10.2010 FR 1058469

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.12.2020

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (25.0%)**

**3, rue Michel Ange
75794 Paris Cedex 16, FR;**

INNOBIOCHIPS (25.0%);

**UNIVERSITÉ DE LILLE 2 DROIT ET SANTÉ
(25.0%) y**

**UNIVERSITÉ DE LILLE 1 SCIENCES ET
TECHNOLOGIES (25.0%)**

72 Inventor/es:

MELNYK, OLEG;

EBRAN, JEAN-PHILIPPE, GEORGES, BERNARD;

DHEUR, JULIEN, PHILIPPE;

DENDANE, NABIL;

SOUPLET, VIANNEY y

OLIVIER, CHRISTOPHE

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 797 391 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

Procedimiento de funcionalización de superficies para la detección de analitos

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a un método de funcionalización de la superficie para la detección de analitos. Este proceso de funcionalización de la superficie en particular permite obtener dispositivos para detectar analitos que pueden usarse para llevar a cabo diversas pruebas químicas, biológicas y de diagnóstico. La invención también proporciona polímeros específicos que son adecuados para implementar dicho método para funcionalizar superficies.

ANTECEDENTES

[0002] La prueba de diagnóstico de referencia es la llamada prueba "ELISA". Esta prueba permite detectar o medir un analito en un líquido biológico. En general, los pocillos de una placa de microtitulación están revestidos (por interacción esencialmente hidrófoba) con un elemento de captura (por ejemplo, un anticuerpo) capaz de unirse específicamente a un analito (en particular un antígeno) buscado. La solución de prueba se deposita en los pocillos de la microplaca, y si la molécula buscada está presente, se une específicamente al elemento de captura.

[0003] Un elemento traza, también capaz de unirse a la molécula diana, se añaden a los pocillos. Este elemento traza puede ser, por ejemplo, una enzima que cataliza la formación de un producto coloreado, de modo que este elemento traza puede cuantificarse por colorimetría.

[0004] La prueba "ELISA" se adapta bien a la automatización. Sin embargo, las superficies utilizadas convencionalmente para esta prueba (hechas de poliestireno) no permiten inmovilizar moléculas fácilmente hidrofílicas, como los polisacáridos cargados negativamente, o de bajo peso molecular. Además, se ha propuesto, por ejemplo, conjugar un polisacárido con una polilisina para poder fijarlo a una superficie de poliestireno, usando las capacidades de adsorción de la polilisina (Leinonen & Frasch, Infect Immun., 38 (3): 1203-7, 1982).

[0005] La prueba de "ELISA" también tiene limitaciones relacionadas con la carga superficial, debido a que las interacciones son generalmente más específicas con superficies cargadas negativamente (Graves, J. Immunol Methods, 111 (2): 157-66, 1988), mientras que las superficies plásticas son hidrófobas.

[0006] Además, la prueba de "ELISA" estándar se limita a los análisis mono paramétricos, es decir que información sólo está disponible por prueba y por muestra. Cuando se necesitan varios análisis en la misma muestra, es necesario llevar a cabo varias pruebas de tipo "ELISA", preferiblemente en paralelo, ya sea convencionalmente o en miniatura, en un dispositivo conocido como "biochip". Muy pocos biochips están disponibles en el mercado hoy en día, y los dispositivos que se ofrecen actualmente utilizan principalmente portaobjetos de microscopio de vidrio. Tal soporte es apenas adecuado para uso masivo.

[0007] Por otra parte, los sustratos de plástico no son susceptibles a la fabricación de biochips. Las relaciones señal/ruido insatisfactorias generalmente se obtienen por adsorción directa en el soporte, debido a la adsorción no específica significativa de los analitos. Las superficies plásticas hidrófobas también tienen la desventaja de desnaturalizar las proteínas y, por lo tanto, no pueden usarse sin modificación.

[0008] Sin embargo las posibilidades de funcionalización de plástico por modificación química de los polímeros en cuestión son muy limitadas y pueden ser introducidos pocos grupos químicos. Además, un cambio menor en la composición de los polímeros, o incluso variaciones en la composición de un lote a otro, conduciría a diferencias en las propiedades de los sustratos funcionalizados.

[0009] Por otra parte, se manifiestan altas tensiones cuando tenga lugar la impresión de microarrays, porque es difícil depositar de forma reproducible nanogotas (con el fin de obtener depósitos bien definidas y regulares) sobre dichos medios. El método más práctico para depositar gotas en este contexto, la impresión con aguja de contacto, es un desafío técnico, por lo que generalmente se utiliza la técnica de deposición de tipo piezoeléctrico sin contacto. Sin embargo, dada su lentitud, este último apenas permite la producción industrial.

[0010] Se han propuesto ejemplos de funcionalización de 96 pocillos de plástico. Por lo tanto, la técnica de plasma se ha sugerido en Marson, Robinson et al., Glycobiology 19 (2): 1537-46 (2009), para la preparación de chips de azúcar. Esta técnica plantea la dificultad de retener la funcionalidad del azúcar después de la inmovilización. Otro ejemplo se basa en el uso de estreptavidina para recubrir superficies plásticas (Gehring, Albin et al., Anal. Bioanal. Chem., 5 de abril de 2008).

[0011] El documento EP 1953555 describe un dispositivo que comprende un sustrato plástico recubierto con una película metálica sobre la que se inmoviliza una sustancia fisiológicamente activa y un compuesto para crear enlaces de hidrógeno.

[0012] El documento EP 2030677 describe un biosensor que comprende un sustrato cubierto por una película metálica a través de la cual se fija un polímero aniónico.

[0013] Estos documentos no dan a conocer una interacción directa entre el polímero y un sustrato de plástico.

[0014] Por tanto, existe todavía una necesidad de proporcionar dispositivos de detección de analitos fáciles de fabricar, robustos, fáciles de utilizar, y/o permitiendo muchos analitos de detección en paralelo.

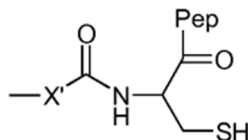
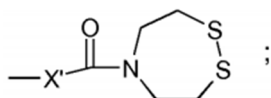
RESUMEN DE LA INVENCION

[0015] La invención se refiere en primer lugar a un dispositivo de detección de analito que comprende un material de sustrato de plástico cubierto al menos en parte por polímeros de unión unidos al sustrato de forma no covalente, comprendiendo dichos polímeros de enlace una cadena principal de polisacárido provista de:

- grupos aromáticos de la forma -X-CONH-Z, donde X representa una cadena alquilo lineal o ramificada, sustituida o no, que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, y Z representa una función arilo; y
- grupos de ácido carboxílico de la forma -X-COOH, donde X representa una cadena alquilo lineal o ramificada, sustituida o no, que comprende de 1 a 6 átomos de carbono;

dicho dispositivo se caracteriza porque el esqueleto de polisacárido está provisto además de grupos reactivos F, siendo dichos grupos reactivos de la forma -X-CONH-Z', donde X representa una cadena de alquilo lineal o ramificada, sustituida o no, que comprende 1 a 6 átomos de carbono, y Z' representa un grupo capaz de unirse a otra molécula, eligiéndose Z' entre:

- X'-N₃;
- NH₂;



donde X' representa una cadena de alquilo, sustituida o no sustituida, que comprende de 1 a 6 átomos de carbono y Pep representa un fragmento peptídico.

[0016] De acuerdo con una realización, la cadena principal de polisacárido es una estructura de dextrano, en donde el peso molecular está preferiblemente entre 15.000 y 100.000 y más preferiblemente entre 30.000 y 60.000.

[0017] De acuerdo con una realización, los grupos ácido carboxílico son de la forma -X-COOH, donde X es CH₂.

[0018] De acuerdo con una realización, los grupos aromáticos son de la forma -X-CONH-Z, en donde X es CH₂, y Z representa una función arilo que comprende de 6 a 30 átomos de carbono, Z es preferiblemente una función opcionalmente sustituido bencilo, tales como -CH₂-Ph o -CH₂-Ph-paraOH.

[0019] De acuerdo con una realización, los polímeros de unión comprenden:

- de 0,4 a 0,8 restos aromáticos, preferiblemente de 0,4 a 0,6 grupos aromáticos, preferiblemente 0,45 a 0,6 grupos aromáticos por unidad de sacárido de la cadena principal de polisacárido; y/o
- de 0 a 0,8 grupos reactivos, preferiblemente de 0 a 0,6 grupos reactivos, por unidad de sacárido de la cadena principal de polisacárido; y/o
- de 0,5 a 1,5 grupos aromáticos, ácidos carboxílicos y reactivos en total, preferiblemente de 0,9 a 1,3 grupos aromáticos, ácidos carboxílicos y reactivos en total, por unidad de sacárido de la cadena principal de polisacárido.

[0020] Según una realización, el sustrato es un sustrato de poliestireno, policarbonato, polimetacrilato de metilo o de polipropileno, de preferencia poliestireno.

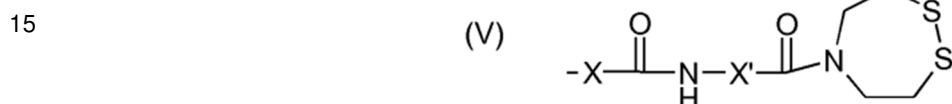
[0021] De acuerdo con una realización, el dispositivo comprende elementos de captura inmovilizados en los polímeros de unión, siendo dichos miembros de enganche seleccionados preferiblemente a partir de polipéptidos, eventualmente modificados, y/o conjugados, sacáridos, oligosacáridos o lipopolisacáridos, virus o fragmentos de virus y las células,

la inmovilización de los elementos de captura en los polímeros de unión se llevan a cabo preferiblemente mediante adsorción o mediante unión covalente a los grupos reactivos F.

5 [0022] Según una realización, el dispositivo comprende una pluralidad de zonas de detección, comprendiendo las zonas de detección preferiblemente diferentes elementos de captura.

[0023] De acuerdo con una realización, el sustrato es una placa opaca o transparente, una placa de microtitulación, un conjunto de perlas, una placa de cultivo, una tira o una varilla.

10 [0024] También se describe un polímero que comprende una cadena principal de polisacárido proporcionado con grupos aromáticos de grupos de ácido carboxílico y grupos reactivos de la fórmula (V):



20 [0025] X y X' que representan cada uno una cadena alquilo, sustituida o no sustituida, que tiene de 1 a 6 átomos de carbono.

[0026] También se describe un polímero que comprende una cadena principal de polisacárido proporcionado con grupos aromáticos de grupos de ácido carboxílico y los grupos reactivos de la fórmula (V'):

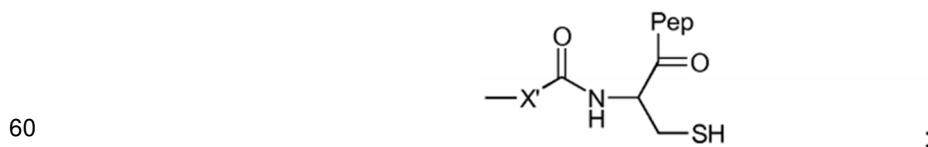


30 [0027] X y X' que representan cada uno una cadena alquilo, sustituida o no sustituida, que comprende de 1 a 6 átomos de carbono y Pep que representa un fragmento peptídico.

35 [0028] La invención también tiene por objeto un polímero aglutinante capaz de ser utilizado en el ciavant descrito dispositivo que comprende una cadena principal de polisacárido provista de:

- 0,4 a 0,8 grupos aromáticos por unidad de sacárido de la forma -X-CONH-Z, donde X representa una cadena de alquilo lineal o ramificada, sustituida o no, que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, y Z representa una función arilo;
- grupos de ácido carboxílico de la forma -X-COOH, donde X representa una cadena alquilo lineal o ramificada, que comprende de 1 a 6 átomos de carbono,
- grupos reactivos F de la forma -X-CONH-Z', donde X representa una cadena alquilo lineal o ramificada, sustituida o no, que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, y Z' se elige de:

- X'-N₃;
- NH₂;

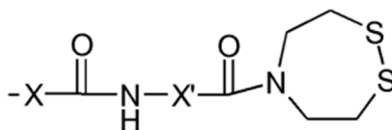


60 donde X' representa una cadena de alquilo, sustituida o no sustituida, que comprende de 1 a 6 átomos de carbono y Pep representa un fragmento peptídico.

65 [0029] De acuerdo con una realización de los dos polímeros anteriores, X es CH₂ y/o X' es (CH₂)₂.

[0030] También se describe un método de fabricación del polímero anterior con grupos reactivos a la fórmula (V):

5

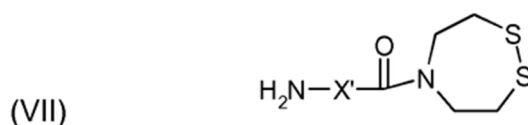


comprendiendo dicho procedimiento:

- 10
- proporcionar un polisacárido;
 - el injerto de grupos de ácido carboxílico en el polisacárido; luego
 - la modificación de parte de los grupos de ácido carboxílico injertado para proporcionar grupos aromáticos; seguido o precedido por
 - 15 - la modificación de otra parte de los grupos de ácido carboxílico injertado para proporcionar grupos reactivos de fórmula (V),

comprendiendo dicha modificación la reacción del polisacárido con el compuesto de fórmula (VII):

20



25

en la que X' representa una cadena de alquilo, sustituida o no, que contiene de 1 a 6 átomos de carbono.

[0031] También se describe un método de fabricación del polímero anterior con grupos reactivos de la fórmula (V'), comprendiendo dicho método:

- 30
- proporcionar un polímero de fórmula (V) anterior; y
 - la reacción de este polímero con el polipéptido H-Cys-Pep, donde Pep representa un fragmento de péptido y Cys representa el residuo de cisteína.

35 [0032] De acuerdo con una realización del dispositivo descrito anteriormente, los polímeros de unión son los polímeros antes mencionados (con grupos reactivos de la fórmula (V) o (V')).

40 [0033] La invención también se refiere al uso de un dispositivo para la detección de analitos como se describe anteriormente, para la detección y, opcionalmente, cuantificación de moléculas químicas, moléculas orgánicas, células o los organismos vivos.

[0034] También se describe un método de fabricación de un dispositivo para la detección de analitos como se describe anteriormente, que comprende:

- 45
- proporcionar un sustrato de plástico;
 - poner el sustrato en contacto con al menos una solución que comprende polímeros de unión.

[0035] De acuerdo con una realización, este método comprende además poner en contacto el sustrato con una o más soluciones que comprenden los elementos de captura.

50

[0036] También se describe un método de fabricación de un dispositivo para la detección de analitos como se describe anteriormente, que comprende:

- 55
- proporcionar un sustrato de plástico;
 - poner el sustrato en contacto con una o más soluciones que comprenden polímeros de unión unidos a elementos de captura.

60 [0037] La presente invención supera las desventajas de la técnica anterior. Más particularmente, proporciona dispositivos de detección de analitos que son fáciles de fabricar, robustos y fáciles de usar. Según un modo de realización, estos dispositivos permiten la detección de muchos analitos en paralelo. En particular, la invención hace posible inmovilizar moléculas hidrofílicas y/o pequeñas (pero también anticuerpos o proteínas).

65 [0038] Esto se logra a través de funcionalización de la superficie por medio de polímero de unión que tiene una cadena principal de polisacárido. Los polímeros de unión incluyen grupos aromáticos, que promueven la unión no covalente de los polímeros de unión a superficies relativamente hidrofobas, así como grupos de ácido carboxílico, lo que hace posible cargar negativamente los polímeros de unión y así limitar los fenómenos de adsorción no específicos entre los

polímeros de unión y los analitos a detectar (que a menudo están cargados negativamente).

[0039] El uso de plástico y, en particular superficies de poliestireno en los dispositivos de la invención, permite evitar los problemas de vidrio: el riesgo de rotura del vidrio y el riesgo asociado para el personal, los costes relacionados con la eliminación de desperdicio, heterogeneidad de funcionalización vinculada a la naturaleza química del vidrio, alto costo del sustrato y de la caracterización, dificultad para efectuar la compartimentación en el sustrato.

[0040] En algunas formas de realización particular, la invención también tiene uno o preferiblemente varios características ventajosas se enumeran a continuación.

- Los polímeros aglutinantes se sintetizan fácilmente en grandes cantidades y se pueden caracterizar por técnicas analíticas convencionales (RMN, medición de pH, microanálisis), lo que permite controlar rigurosamente la fabricación.
- Los polímeros de unión se fijan a las superficies mediante adsorción simple (unión no covalente), en particular por medio de grupos aromáticos de los polímeros de unión. Es un método de fijación particularmente sencillo de implementar, robusto y poco sensible a variaciones moderadas en las propiedades fisicoquímicas de las superficies. En cualquier caso, también es posible ajustar la densidad de los grupos aromáticos en los polímeros de unión, de acuerdo con la naturaleza de las superficies.
- La invención se puede implementar a partir de sustratos ampliamente disponibles hoy y de bajo costo: placas de microtitulación hechas de poliestireno, placas de Petri, etc.
- La invención también permite producir biochips, es decir, dispositivos para detectar analitos miniaturizados que permiten una detección paralela de una gran cantidad de analitos, a partir de soportes plásticos y en particular de poliestireno.
- La funcionalización de las superficies de acuerdo con la invención se lleva a cabo mediante la fijación de elementos de captura (o sondas) en los polímeros de unión, ya sea covalentemente (a través de grupos reactivos presentes en los polímeros de unión), en particular cuando los elementos de captura son moléculas pequeñas, es decir, no covalentemente (por adsorción). Por lo tanto, la invención tiene una gran flexibilidad de implementación.
- Los grupos funcionales son ventajosamente estables (conservan sus propiedades) en presencia de humedad o aire.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0041]

La **Figura 1** muestra la relación entre el grado de sustitución en restos aromáticos (de forma ordenada) en el polímero **PsAcAr1** del Ejemplo 3, basado en el número de equivalentes de bencilamina (abscisas). Se hará referencia al Ejemplo 4 sobre este tema.

La **Figura 2** muestra la relación entre el grado de sustitución con grupos azida (de forma ordenada) en el polímero **PsAcF1** del Ejemplo 7, en comparación con el número de equivalentes de amina azida (abscisa). Se hace referencia al Ejemplo 8 sobre este tema.

La **Figura 3** es un histograma que muestra medidas de ángulos de caída (en grados) en placas de poliestireno funcionalizadas o no. Se hace referencia al Ejemplo 22 sobre este tema.

Las **Figuras 4, 5 y 6** ilustran la especificidad de unión de la concanavalina A (en relación con otras lectinas) en un polímero de acuerdo con la invención. Se hace referencia a los Ejemplos 23 y 24 sobre este tema.

La **Figura 7** es un histograma que ilustra el efecto de la velocidad de sustitución aromática en el ángulo de caída (en grados) en placas de poliestireno funcionalizadas. Se hace referencia al Ejemplo 25 sobre este tema.

La **Figura 8** es un histograma que ilustra el enlace quimioselectivo de un aldehído a una superficie funcionalizada con un polímero peptídico según la invención. Se hace referencia al Ejemplo 26 sobre este tema.

Las **Figuras 9 y 10** son histogramas que muestran la funcionalización de superficies con péptidos y la detección de anticuerpos apropiados (incubación con anti-HA o anti-FLAG). Se hace referencia al Ejemplo 27 sobre este tema.

La **Figura 11** es un histograma que ilustra la unión quimioselectiva de un péptido que tiene una cisteína N-terminal a una superficie funcionalizada con un polímero de acuerdo con la invención. Se hace referencia al Ejemplo 33 sobre este tema.

Las **Figuras 12 y 13** son gráficos que ilustran una detección colorimétrica en una placa de anticuerpos de microarrays con fondo de poliestireno de 96 pocillos. Se hace referencia al Ejemplo 34 sobre este tema.

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES DE LA INVENCION

[0042] La invención se describe ahora con más detalle y no se limita a la descripción siguiente.

Polímeros de unión y producción de los mismos

[0043] Los polímeros de unión utilizados en el contexto de la invención comprenden una cadena principal de polisacárido (abreviatura "P" en la siguiente) provista de grupos ácido carboxílico (abreviatura "Ac" a continuación) de grupos aromáticos (abreviatura "Ar" a continuación) y de grupos reactivos distintos de los grupos de ácido carboxílico mencionados anteriormente (abreviatura "F" a continuación).

[0044] Por "esqueleto polisacárido" se quiere decir una estructura formada por un conjunto de azúcares (o unidades de sacárido), unidos entre sí por enlaces O-glucosídico. Esta estructura puede ser lineal o ramificada. Preferiblemente comprende de 80 a 600 unidades de sacárido, y más particularmente de 150 a 350 unidades de sacárido.

[0045] Las unidades de sacárido son preferentemente cíclicas. Pueden ser triosas, tetraosas, pentosas, hexosas o heptosas, y preferiblemente son hexosas.

[0046] El término "grado de sustitución" o "medida de sustitución" significa el número medio de sustituyente (Ac, Ar o F) por unidad de sacárido. Los métodos para determinar las tasas de sustitución se proporcionan en la sección de ejemplos.

[0047] Todos los grupos Ac, Ar y F se injertan preferiblemente en la totalidad o parte de las funciones hidroxilo de las unidades de sacárido.

[0048] El peso molecular de la cadena principal de polisacárido es preferiblemente entre 15.000 y 100.000 y más preferiblemente entre 30.000 y 60.000.

[0049] La cadena principal de polisacárido puede ser de tipo homopoliosídico (unidades de sacárido idéntico) o heteropoliosídico (diferentes unidades de sacárido).

[0050] Ejemplos de homopoliosídicos incluyen: los glucosanos o glucanos (alfa-glucanos o beta-glucanos), tales como almidón, glucógeno, celulosa, dextrano, pululano, ácido hialurónico, quitina o quitosano (forma desacetilada de quitina); arabanos, xilanos y pectinas. Se pueden mencionar, como ejemplos de heteropoliosídicos, de gomas que son estructuras ramificadas que comprenden D-galactosa, L-arabinosa, L-ramnosa y ácido D-glucurónico, así como hemicelulosas.

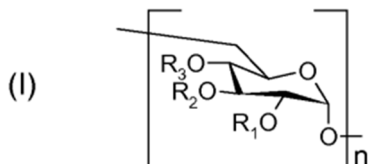
[0051] De acuerdo con una realización preferida, las unidades de sacárido son unidades de glucosa (o dextrosa). Y preferiblemente, el esqueleto de polisacárido es una molécula de dextrano, es decir que tiene una cadena principal de glucosas unidas por enlaces glucosídicos α -1,6 con ramificaciones posiblemente unidas a la cadena principal por enlaces α -1,2 y/o α -1,3 y/o α -1,4. El dextrano está disponible en grandes cantidades, económicas y bien solubles en agua.

[0052] En la siguiente descripción, la referencia a un tipo de dextrano esqueleto de polisacárido entendiéndose que esta descripción se aplica de forma análoga a otros tipos de esqueletos polisacáridos.

[0053] Los polímeros de unión que no están provistos de grupos reactivos F (polímeros del tipo "PsAcAr") no son parte de la invención. Estos polímeros de unión pueden obtenerse:

- proporcionando un polisacárido Ps (cadena principal de polisacárido no sustituido);
- injertar grupos Ac en este polisacárido para obtener un polímero de tipo "PsAc";
- modificación de parte de los grupos Ac del polímero PsAc para obtener el polímero PsAcAr.

[0054] Por lo tanto, con referencia a la fórmula general (I) siguiente:



el polímero de partida Ps es un polímero de fórmula (I) en el que todos los grupos R^1 , R^2 y R^3 representan un átomo hidrógeno; el polímero intermedio PsAc es un polímero de fórmula (I) en el que parte de los grupos R^1 , R^2 y R^3 representan un átomo de hidrógeno y la otra parte de los grupos R^1 , R^2 y R^3 representan un grupo que lleva una función de ácido carboxílico; y el polímero de unión PsAcAr es un polímero de fórmula (I) en el que parte de los grupos R^1 , R^2 y R^3 representan un átomo de hidrógeno, otra parte de los grupos R^1 , R^2 y R^3 representan un grupo que lleva una función de ácido carboxílico y la tercera y última parte de los grupos R^1 , R^2 y R^3 representan un grupo que lleva un anillo aromático.

[0055] Los grupos ácido carboxílico Ac son la forma -X-COOH, en donde X representa una cadena de alquilo lineal o

ramificada que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, eventualmente provista de uno o más sustituyentes seleccionados entre cloro, bromo, un grupo cetona, flúor, un grupo alcohol, un grupo ácido carboxílico y un grupo aromático (en particular fenilo). Preferiblemente, esta cadena es lineal y no sustituida y/o comprende como máximo 5 átomos de carbono, como máximo 4 átomos de carbono, como máximo 3 átomos de carbono o como máximo 2 átomos de carbono. Según una realización preferida, en la que se evitan posibles problemas de reactividad en exceso, los grupos Ac son de la forma $-\text{CH}_2\text{-COOH}$ (grupos de ácido metilcarboxílico).

[0056] Se entiende que los grupos Ac pueden ionizarse (COOH sustituido por COO^- asociado a un contra-ion) o estar en forma salificada (COOH sustituido por ejemplo por COONa) en función del contexto.

[0057] Preferiblemente, los grupos Ac son todos idénticos, pero también es posible proporcionar un injerto de diferentes grupos Ac.

[0058] Los restos aromáticos Ar son de la forma $-\text{Y-Z}$, donde Y es un grupo de unión y Z una función de arilo, que comprende preferiblemente de 6 a 30 átomos de carbono, preferiblemente de 6 a 24 átomos de carbono, más preferiblemente 6 a 12 átomos de carbono, y uno o más sustituyentes elegidos entre halógenos, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NO}_2$, $-\text{OR}'$, $-\text{COOR}'$, $-\text{CONHR}'$ donde R' es un grupo alquilo que comprende de 1 a 6 átomos de carbono. Z puede ser monocíclico o policíclico, y opcionalmente heterocíclico. Preferiblemente, Z es un derivado de benceno, y en particular un grupo fenilo, bencilo o fenol.

[0059] Y es un grupo amida de la forma $-\text{X-CONH-}$, en el que X tiene el mismo significado expuesto anteriormente en relación con los grupos Ac.

[0060] De acuerdo con una realización preferida, los restos Ar son $-\text{CH}_2\text{-CONH-CH}_2\text{-Ph}$ (en donde Ph es fenilo), o $-\text{CH}_2\text{-CONH-CH}_2\text{-Ph-paraOH}$.

[0061] Preferiblemente, los grupos Ar son idénticos, pero también es posible proporcionar un injerto de diferentes grupos Ar.

[0062] El paso de injerto de los grupos Ac en el polisacárido para obtener el polímero SCP puede ser llevado a cabo haciendo que el polisacárido Ps reaccione con un compuesto de ácido carboxílico que comprende una función halógena, y preferiblemente una función de cloro.

[0063] Por ejemplo, el injerto de los grupos Ac preferiblemente de forma $-\text{CH}_2\text{-COOH}$ se pueden obtener haciendo reaccionar el polisacárido con el ácido monocloroacético Ps. Preferiblemente, la reacción se lleva a cabo en presencia de isopropanol.

[0064] El paso de modificar una porción de los grupos Ac del polímero PsAc para obtener el polímero PsAcAr se puede llevar a cabo haciendo reaccionar el polímero PsAc con un compuesto de tipo R-Z, en donde Z tiene el mismo significado que anteriormente, y R es una función reactiva con la función carboxílica. Preferiblemente, R es una función amina, capaz de establecer un enlace amida con los grupos Ac.

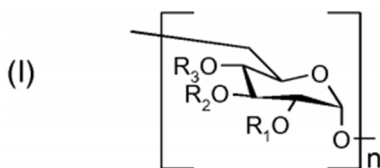
[0065] Por ejemplo, grupos Ar preferidos del tipo $-\text{CH}_2\text{-CONH-CH}_2\text{-Ph}$ se pueden obtener por reacción del polisacárido PsAc con bencilamina. Por ejemplo, los grupos Ar preferidos del tipo $-\text{CH}_2\text{-CONH-CH}_2\text{-Ph-paraOH}$ se pueden obtener haciendo reaccionar el polisacárido PsAc con *para*-hidroxibencilamina. Preferiblemente, la reacción se lleva a cabo en presencia de 1-ciclohexilo-3-(2-morfolinoetilo)carbodiimida.

[0066] Los polímeros de unión de la invención que se proporcionan con grupos reactivos F (polímeros "PsAcArF") se pueden obtener a partir de los polímeros SCP (como se ha obtenido anteriormente), mediante la modificación de una parte de los grupos Ac por un lado en grupos F y por otro lado en grupos Ar. Estos dos pasos de modificación se pueden llevar a cabo en cualquier orden.

[0067] En otras palabras, primero se puede producir un polímero de tipo PsAcAr a partir de un polímero PsAc (como se ha descrito anteriormente), entonces modificar este polímero de tipo PsAcAr para obtener el polímero de tipo PsAcArF. Y también podemos producir primero un polímero de tipo "PsAcF" a partir de un polímero PsAc, luego modificar este polímero de tipo PsAcF para obtener el polímero de tipo PsAcArF (el método utilizado para esta segunda modificación es el mismo que el usado para modificar el polímero de tipo PsAc en polímero de tipo PsAcAr).

[0068] La ventaja de estas diversas estrategias consiste en modular el grado de sustitución de acuerdo a si se quiere una mayor tasa de grupos Ar, o una tasa más alta en el grupo F.

[0069] En referencia a la fórmula general (I) a continuación:



5

10

15

el polímero PsAcF es un polímero de fórmula (I) en el que parte de los grupos R¹, R² y R³ representan un átomo de hidrógeno, otra parte de los grupos R¹, R² y R³ representan un grupo de ácido carboxílico y la tercera y última parte de los grupos R¹, R² y R³ representan un grupo reactivo (diferente del grupo de ácido carboxílico); y el polímero PsAcArF es un polímero de fórmula (I) en el que parte de los grupos R¹, R² y R³ representan un átomo de hidrógeno, otra parte de los grupos R¹, R² y R³ representan un grupo ácido carboxílico, otra parte de los grupos R¹, R² y R³ representan un grupo aromático y la cuarta y última parte de los grupos R¹, R² y R³ representan un grupo reactivo (diferente del grupo ácido carboxílico).

20

[0070] Los grupos reactivos F son de las formas -Y-Z, donde Y es un grupo de unión (mismo significado que anteriormente) y Z' representa un grupo capaz de unirse, en particular de forma covalente con un miembro de captura, como se describe con más detalle a continuación. Según una realización preferida, el grupo Z' es capaz de establecer un enlace covalente con un polipéptido.

25

30

[0071] Y es un grupo amida de la forma -X-CONH-, en el que X tiene el mismo significado que el establecido anteriormente en relación con los grupos de Ac (y X es preferiblemente CH₂).

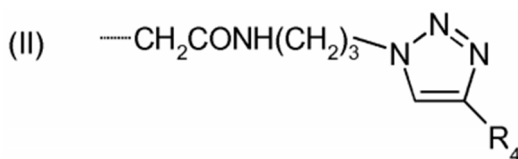
[0072] De acuerdo con una primera realización preferida, los grupos Z' son grupos azidas (particularmente alquilazidas), y los grupos F son preferiblemente grupos de la forma -X-CONH-X'-N₃ en donde X y X' representan una cadena de alquilo, sustituida o no sustituida, que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, los grupos F pueden ser, por ejemplo, grupos -CH₂-CONH-(CH₂)₃-N₃. Dichos grupos son particularmente útiles como grupos intermedios, lo que hace posible, por ejemplo, obtener grupos del tipo triazol (véase la tercera realización a continuación). También pueden vincular ciertos elementos de captura.

35

[0073] De acuerdo con una segunda realización preferida, los grupos Z' son grupos hidrazida, y los grupos F son preferiblemente grupos de la forma -X-CONH-NH₂ donde X representa una cadena de alquilo, sustituidos o no sustituidos, que comprende de 1 con 6 átomos de carbono, los grupos F pueden ser, por ejemplo, grupos -CH₂-CONH-NH₂. Estos grupos F son capaces de unirse con una función aldehído de péptidos, por ejemplo. También pueden promover la adsorción de polipéptidos (inmovilización no covalente).

40

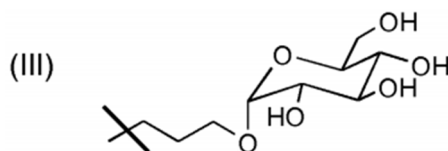
[0074] También se describe que los grupos Z' son grupos triazoles, preferiblemente sustituidos por una o más cadenas de alquilo lineales o ramificadas, sustituidas o no, que contienen de 1 a 6 átomos de carbono, y los grupos F pueden, por lo tanto, ser grupos de la fórmula (II):



45

50

en donde R⁴ representa el grupo de fórmula (III):



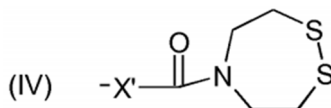
55

60

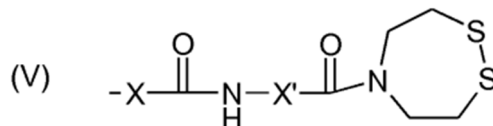
[0075] Este tipo de grupos F permite unir elementos de captura específicos. Los grupos F de fórmula (II) anteriores donde R⁴ representa -(CH₂)₃OH se usan como controles negativos en los ejemplos.

65

[0076] Según una tercera forma de realización preferida, los grupos Z' son de fórmula (IV):



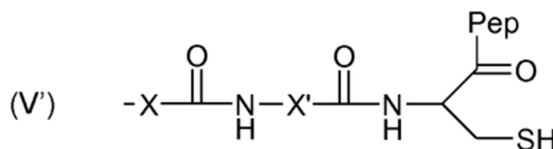
en donde X' representa una cadena alquilo lineal o ramificada que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, opcionalmente provista de sustituyentes halógeno (incluyendo Cl o Br). Preferiblemente X' es (CH₂)₂. De acuerdo con esta tercera realización, los grupos F son, por lo tanto, preferiblemente de la siguiente fórmula (V):



en donde X y X' tienen el significado mencionado anteriormente. Según un modo particularmente preferido, X representa CH₂ y X' representa (CH₂)₂.

[0077] Los grupos F correspondientes a esta cuarta realización pueden reaccionar con moléculas que tienen una función beta-amino tiol o gamma-amino tiol, tales como polipéptidos que tienen una cisteína o una homocisteína en la posición N-terminal, para formar un enlace de amida. Por lo tanto, los polímeros de unión correspondientes a esta cuarta realización pueden unirse a elementos de captura formados por polipéptidos que tienen una cisteína o una homocisteína en la posición N-terminal.

[0078] Por lo tanto, se obtiene en el caso de cisteína un polímero aglutinante, en el que los Grupos F unidos a los elementos de recogida son de la fórmula (V'):



X y X' tienen el significado arriba y Pep representa un fragmento de péptido, es decir, una porción de polipéptido que comprende al menos un residuo de aminoácido (preferiblemente una sucesión de varios residuos de aminoácido), provisto de una función C-terminal (por ejemplo COOH o CONH₂).

[0079] Los grupos F pueden ser todos idénticos, o se puede proporcionar el injerto de diversos grupos de F.

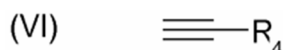
[0080] El paso de modificar una porción de los grupos Ac del polímero PsAc (respectivamente del polímero PsAcAr) para dar el polímero PsAcF (respectivamente el polímero PsAcArF) se puede llevar a cabo haciendo reaccionar el polímero PsAc (respectivamente el polímero PsAcAr) con un compuesto de tipo R-Z' donde Z' tiene el mismo significado que el anterior, y R es una función reactiva con la función carboxílica. Preferiblemente, R es una función amina, capaz de establecer un enlace amida con los grupos Ac.

[0081] Algunos grupos F pueden injertarse por injerto primero de los grupos reactivos F' intermedios, a continuación, modificando químicamente los grupos F' para dar los grupos F después de un paso de reacción separado.

[0082] Por ejemplo, los grupos F del tipo -CH₂-CONH-NH₂ se pueden obtener haciendo reaccionar el polisacárido PsAc (o polímero PsAcAr) con hidrazina (preferiblemente en la presencia de 1-ciclohexilo-3-(2-morfolinoetilo).

[0083] Los grupos F del tipo -CH₂-CONH-(CH₂)₃-N₃ se pueden obtener haciendo reaccionar el polisacárido PsAc (o polímero PsAcAr) con la sal de hidrocloreto de 3-azidopropilamonio (preferiblemente en presencia de 1-ciclohexilo-3-(2-morfolinoetilo)carbodiimida.

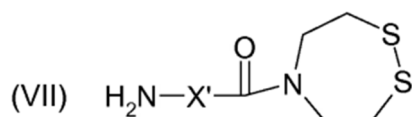
[0084] Los grupos F de fórmula (II) pueden obtenerse por reacción de un polímero PsAcF anteriormente (o un polímero PsAcArF) provisto de grupos reactivos del tipo -CH₂-CONH-(CH₂)₃-N₃ con el compuesto de fórmula (VI):



(preferiblemente en presencia de iones de cobre (II) y ascorbato de sodio).

[0085] En este caso, se obtiene un polímero PsAcF (o un polímero PsAcArF) en donde o bien todos los grupos F son de fórmula (II) anterior, o una parte de los grupos F son de fórmula (II) anterior y una parte de los grupos F son del tipo -CH₂-CONH-(CH₂)₃-N₃ (en caso de sustitución incompleta por los compuestos de fórmula (VI)).

[0086] Los grupos F de fórmula (V) arriba se pueden obtener haciendo reaccionar el polisacárido PsAc (o polímero PsAcAr) con el compuesto de fórmula (VII)



5 (preferentemente en presencia de 1-ciclohexilo-3-(2-morfolinoetilo)carbodiimida) en donde X' tiene el significado mencionado anteriormente. El compuesto de fórmula (VII) puede fabricarse como se indica en los ejemplos a continuación.

10 **[0087]** En general, la tasa de sustitución con Ac, Ar y F se puede ajustar en función de una parte del orden en el que se realiza el injerto de los grupos (Ac luego Ar luego F o Ac luego F luego Ar), y por otro lado, adaptando las condiciones de injerto y, en particular, la relación molar entre el polisacárido y el reactivo responsable del injerto del grupo considerado.

15 **[0088]** Polímeros derivados de dextranos y respondiendo a la fórmula general de los anteriores polímeros de unión con los grupos reactivos F sulfatos o grupos sulfonato, y el uso para fines terapéuticos de estos polímeros han sido descritos en WO 99/29734, WO 00/76452, WO 00/76562, WO 01/91742 y FR 2891149.

20 **[0089]** Preferiblemente, los polímeros de unión de la invención están desprovistos de funciones de sulfato o sulfonato. En efecto, tales funciones pueden interactuar con muchas proteínas, lo que es perjudicial para la detección óptima. Además, la ausencia de funciones de sulfato o sulfonato es particularmente útil cuando los elementos de captura están sulfatados (oligosacáridos en particular).

25 Funcionalización de superficies

[0090] Los polímeros de unión de la invención (tipo PsAcArF) pueden ser depositados sobre un sustrato con el fin de funcionalizar la superficie del sustrato. El sustrato está hecho de plástico (un material sólido de naturaleza polimérica, generalmente conformado bajo calor y bajo presión) que se elige preferiblemente de poliestireno, policarbonato, polimetacrilato de metilo y polipropileno.

30 **[0091]** Así, la invención permite, por ejemplo para funcionalizar la superficie de láminas en plástico transparente u opaco, o placas de microtitulación de poliestireno (por ejemplo, 96 pocillos), perlas magnéticas (o no), placas de cultivo de poliestireno (por ejemplo con 96 pocillos), tiras o barras de poliestireno.

35 **[0092]** La funcionalización generalmente comprende dos pasos: un primer paso de unir los polímeros que se unen a la superficie del sustrato y un segundo paso de unir elementos de captura en los polímeros de unión. Alternativamente, los polímeros de unión pueden unirse a los elementos de captura antes de fijar los polímeros de unión a la superficie del sustrato (particularmente cuando la unión entre los polímeros de unión y los elementos de captura es de tipo covalente).

40 **[0093]** La unión de polímero de unión a la superficie del sustrato se lleva a cabo, en particular para superficies planas, por inmersión de la superficie a tratar en una solución que comprende el polímero PsAcAr o PsAcArF. Para superficies moldeadas que pueden contener un líquido (por ejemplo, placas de titulación de 96 pocillos), la funcionalización puede llevarse a cabo mediante un simple llenado. El lavado y el secado generalmente se planifican más tarde. En general, la solución de polímero está a una concentración de 0,1 a 50 µg/ml, y preferiblemente de 1 a 10 µg/ml.

45 **[0094]** Sin desear estar ligado por ninguna teoría, los inventores creen que los polímeros de unión a no covalente se unen a la superficie del sustrato (adsorción), en particular a través de los grupos Ar.

50 **[0095]** Los elementos de la captura unidos a los polímeros de unión pueden ser opcionalmente polipéptidos, sacáridos, oligosacáridos o lipopolisacáridos, virus o fragmentos de virus modificados y/o conjugados, o incluso células. Por ejemplo, los elementos de captura pueden ser anticuerpos.

55 **[0096]** El término "polipéptido" en el contexto de la presente solicitud abarca las cadenas de residuos de aminoácidos (en número mayor que o igual a dos) unidos por enlaces peptídicos. Por lo tanto, los "polipéptidos" dentro del significado de la presente solicitud pueden ser oligopéptidos, péptidos o proteínas de acuerdo con el significado convencional de estos términos. Los residuos de aminoácidos presentes en los polipéptidos según la invención se pueden elegir entre los residuos de aminoácidos proteinógenos o no. Preferiblemente, se eligen entre los veinte residuos de aminoácidos proteinógenos.

60 **[0097]** La fijación de los elementos de captura a los polímeros de unión puede ocurrir por adsorción si se utilizan polímeros de unión sin grupos reactivos F. También puede ocurrir mediante el establecimiento de enlaces covalentes con los grupos reactivos F. Puede ocurrir de nuevo por adsorción favorecida por grupos reactivos F. Es el caso, por ejemplo, de la adsorción de anticuerpos favorecida por grupos de tipo hidrazida.

65 **[0098]** También es posible proporcionar elementos sensores que comprenden varias partes. Por ejemplo, se puede

usar un elemento de captura intermedio (por ejemplo, un polipéptido o un compuesto sacárido o un glucopéptido) capaz de unirse a los polímeros de unión, y un elemento de captura final (por ejemplo, un virus o un fragmento de virus o una célula) capaz de unirse al elemento de captura intermedio.

5 **[0099]** Cuando el dispositivo de detección de analitos está destinado a la detección individual de un analito (o un tipo de analitos), es suficiente colocar los polímeros de unión (y uno o más elementos sensores) en toda la superficie útil del sustrato.

10 **[0100]** Cuando el dispositivo para detectar analitos está diseñado para detectar varios analitos con elementos de captura distintos, se deben formar varias zonas de detección distintas. Las placas de microtitulación de 96 pocillos son un ejemplo de sustrato particularmente útil para este propósito.

15 **[0101]** En este caso, se puede depositar el polímero aglutinante en toda la superficie útil del sustrato, y luego depositar los diversos elementos sensores en las áreas delimitadas del sustrato (por ejemplo, depositando pequeñas gotas de varias soluciones que contienen los elementos de captura en ubicaciones determinadas en el sustrato); deposite diferentes soluciones de polímeros de unión unidos a los elementos de captura directamente en áreas delimitadas del sustrato (por ejemplo, en los pocillos de una placa de microtitulación); o bien deposite una o más soluciones de polímeros de unión directamente en áreas delimitadas del sustrato (por ejemplo, en los pocillos de una placa de microtitulación) y luego deposite diferentes soluciones que contienen los elementos de captura en las mismas áreas delimitadas del sustrato.

20 **[0102]** Las áreas de la superficie del sustrato cubiertas con polímeros de unión son preferiblemente hidrófilas, caracterizadas por un ángulo de gota de agua inferior o igual a 70°, preferiblemente menos de o igual a 65° e, idealmente, menos de o igual a 60°. La hidrofilia de la superficie del sustrato cubierta con polímeros de unión permite minimizar las interacciones no específicas de numerosos analitos (en particular proteínas) con el sustrato. También permite el depósito de nanogotas para la preparación de biochips, mientras que este tipo de depósito es complejo y poco reproducible cuando se lleva a cabo directamente sobre sustratos plásticos no tratados.

25 **[0103]** Los analitos que se pueden detectar usando la invención pueden ser de todo tipo de materiales químicos u orgánicos: partículas inorgánicas, moléculas orgánicas (incluyendo pesticidas u otros contaminantes), biomoléculas (incluyendo compuestos de sacáridos, polipéptidos, modificados o no, conjugados o no), virus o fragmentos de virus, células u organismos (unicelulares o multicelulares).

30 **[0104]** En particular, la invención permite la producción de chips de polipéptidos útiles para serotipos, cribado de epítomos, cuantificación de proteínas en muestras biológicas, o el análisis de las relaciones entre las moléculas de péptidos del tipo ligando-receptor.

35 **[0105]** En general, el uso de dispositivos de detección de la invención implica poner en contacto la superficie del sustrato recubierto de los polímeros de unión y de los elementos de captura con una o más soluciones o suspensiones pueden comprender analitos de interés (por ejemplo, una muestra de agua del entorno, una muestra de un producto alimenticio, una muestra biológica como orina, sangre o un producto derivado de la sangre, etc.).

40 **[0106]** La detección de analitos posiblemente fijados específicamente a los elementos sensores pueden ser realizados por medio de elementos traza que pueden ser, por ejemplo fluorescentes, radioactiva o químicamente marcados, y pueden unirse a los analitos retenidos en los dispositivos según la invención o reaccionar con ellos de otra manera. Entonces, los elementos traza retenidos en el dispositivo de acuerdo con la invención pueden identificarse y posiblemente cuantificarse por medio de un dispositivo de detección de fluorescencia, colorimétrico o radiactividad.

45 **[0107]** También es posible confiar en un cambio en el entorno (por ejemplo, una coloración visible) debido a una reacción química entre el elemento traza y el analito, o entre el elemento traza (unido al analito) y un reactivo adicional.

50 **[0108]** Ilustrativamente, el elemento traza puede comprender una enzima que cataliza la formación de un producto coloreado. También se puede tratar de perlas recubiertas con moléculas capaces de unirse a los analitos retenidos. También es posible usar anticuerpos marcados (fluorescentes o radiactivos) capaces de unirse a los antígenos presentes en los analitos.

55 **[0109]** La detección y cuantificación de analitos posiblemente hechas posibles por la invención son particularmente aplicables en el diagnóstico médico (para medicina humana o veterinaria).

60 EJEMPLOS

[0110] Se preparan varios polímeros con una cadena principal de polisacárido de dextrano en los ejemplos que siguen:

- el polímero **PsAc1** que no es parte de la invención, incluye grupos Ac de tipo $-\text{CH}_2\text{COONa}$;
- 65 - el polímero **PsAcAr1** que no forma parte de la invención comprende grupos Ac del tipo $-\text{CH}_2\text{COONa}$ y grupos Ar del tipo $-\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{Ph}$;

- el polímero **PsAcF1**, que no forma parte de la invención, comprende grupos Ac del tipo $-\text{CH}_2\text{COONa}$ y grupos F del tipo $-\text{CH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{N}_3$;
- el polímero **PsAcArF1** que incluye grupos Ac tales como $-\text{CH}_2\text{COONa}$, grupos Ar tipo $-\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{Ph}$ y grupos F del tipo $-\text{CH}_2\text{CONHNH}_2$;
- 5 - el polímero **PsAcArF2** que comprende grupos Ac del tipo $-\text{CH}_2\text{COONa}$, grupos Ar del tipo $-\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{Ph}$ y grupos F del tipo $-\text{CH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{N}_3$;
- el polímero **PsAcF2** que no es parte de la invención, comprende grupos Ac de tipo $-\text{CH}_2\text{COONa}$ y grupos F de fórmula (II) anteriores, con R^4 que representa $-(\text{CH}_2)_3\text{OH}$;
- el polímero **PsAcF3** que no es parte de la invención, comprende grupos Ac de tipo $-\text{CH}_2\text{COONa}$ y grupos F de fórmula (II) anterior, con R^4 que tiene la fórmula (III) anterior;
- 10 - el polímero **PsAcArF3** que no forma parte de la invención incluye grupos Ac del tipo $-\text{CH}_2\text{COONa}$, grupos Ar del tipo $-\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{Ph}$ y los grupos F de fórmula (II) anteriores, con R^4 que representa $-(\text{CH}_2)_3\text{OH}$;
- el polímero **PsAcArF4** que no es parte de la invención, incluye Ac del tipo $-\text{CH}_2\text{COONa}$, grupos Ar de tipo $-\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{Ph}$ y grupos F de fórmula (II) anteriores, con R^4 que tiene la fórmula (III) anterior;
- 15 - el polímero **PsAcArF5** que incluye grupos Ac del tipo $-\text{CH}_2\text{COONa}$, grupos Ar del tipo $-\text{CH}_2\text{CONHCH}_2$, grupos Ph y F de la fórmula (V) anterior, con X que representa CH_2 y X' que representa $(\text{CH}_2)_2$.

[0111] Se observa en la(s) forma(s) de PsAc un polímero que comprende una velocidad de sustitución de grupos Ac igual a x.

[0112] Se observa en la forma PsAcAr (x, y) un polímero que comprende un grado total de sustitución con grupos Ac y Ar igual a x y grupos Ar en una tasa de sustitución igual a y.

[0113] Se observa en la forma PsAcF (x; z) un polímero que comprende un grado total de sustitución con grupos Ac y F igual a x y un grado de sustitución en grupos F igual a z.

[0114] Se observa en la forma PsAcArF (x; y; z) un polímero que comprende un grado total de sustitución con restos Ac, Ar y F iguales a x, grupos Ar en una tasa de sustitución igual a y un grado de sustitución en grupos F igual a z.

30 Ejemplo 1 - Preparación del polímero PsAc1 (protocolo general)

[0115] Dextrano T40 (2 g, 11,1 mmol, 1 eq) se disuelve en 6,4 ml de agua desionizada. Se agrega isopropanol (36 ml) lentamente a esta solución con agitación vigorosa, luego soda (2,4 g, 60 mmol, 5,4 eq), y la mezcla de reacción se agita durante 1 hora a 60°. Finalmente, agregue ácido monocloroacético (3 g, 31,7 mmol), luego agite durante la noche a 60°C. La pasta blanca obtenida se recupera y precipita tres veces en metanol y se centrifuga. El sólido obtenido se disuelve en agua desionizada y se liofiliza para proporcionar el polímero **PsAc1**. Típicamente, este protocolo hace posible obtener una tasa de sustitución para los grupos Ac de 1,2 a 1,4.

40 Ejemplo 2 - Medición del grado de sustitución con grupos de ácido carboxílico

[0116] La determinación de los grupos metilcarboxilato de tasa de sustitución se lleva a cabo por ^1H RMN después de la hidrólisis.

[0117] Para ello, el producto se hidrolizó como sigue:

45 El polímero **PsAc1** (200 mg) se disuelve en 2 ml de D_2O y después se añadió lentamente 666 μl de D_2SO_4 . La mezcla de reacción se calienta a 90°C durante 4 horas. La mezcla se analiza por ^1H RMN 300 MHz.

[0118] El grado de sustitución (DS) se calcula según la siguiente ecuación: $\text{DS} = \text{A}/\text{B}$, con A: $(1/2) \times$ integral de la señal de protón de $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ de 4 a 4,5 ppm; y B: integral de los protones transportados por los carbonos C_1 de las unidades de glucosa, o $(1/6) \times$ integral de los protones transportados por los carbonos C_{2-6} entre 3 y 4 ppm.

50 Ejemplo 3 - Preparación del polímero PsAcAr1

[0119] Se disuelven 100 mg de PsAc1 (1,1) en 2 ml de agua desionizada, después se ajustó a pH 4,74 con una solución de 1N HCl. Agregue 1-ciclohexilo-3-(2-morfolino-etilo)carbodiimida (CMC) (233 mg, 0,55 mmol, 1,1 eq), luego ajuste el pH nuevamente a 4,74 con una solución de 1N HCl. Se agrega bencilamina y la mezcla de reacción se agita durante la noche a temperatura ambiente. Luego, las muestras se dializan durante 70 horas en una solución de 2M NaCl y luego 100 horas en agua desionizada para proporcionar el polímero **PsAcAr1**.

60 Ejemplo 4 Medición de la velocidad de sustitución en grupos aromáticos

[0120] El grado de sustitución en grupos aromáticos se calcula usando espectros de ^1H RMN de 300 MHz de acuerdo con la siguiente ecuación: $\text{DS} = (\text{B}/\text{A})/5$, con A: integral de los protones transportados por C_1 ; B: integral de los protones aromáticos debido al grupo fenilo.

[0121] La **Figura 1** muestra la relación entre el grado de sustitución (y) en el grupo $\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{Ph}$, y el número de

equivalentes de bencilamina (eq) que participan en la reacción (0,3 eq, 0,6 eq, 1 eq, 2 eq, 5 eq y 15 eq en comparación con la tasa de sustitución de los grupos carboxílicos disponibles).

Ejemplo 5 - Síntesis de 2-(3-azidopropilo)isoindol-1,3-diona

[0122] A partir de *N*-(3-bromopropilo)ftalimida (15 g, 56,02 mmol) se disolvió en 200 ml de dimetilformamida, a continuación, se agrega azida de sodio (7,25 g, 112,05 mmol, 2 eq). La agitación continúa durante 2 horas a 70°C. El medio de reacción se evapora luego hasta sequedad y luego se evapora conjuntamente con tolueno para eliminar las trazas de dimetilformamida. El residuo obtenido se disuelve en éter dietílico (150 ml) y la fase orgánica se lava con agua (2 x 150 ml). La fase orgánica se seca sobre sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se evapora para dar 2-(3-azidopropilo)-isoindol-1,3-diona en forma de un polvo blanco (12,44 g, 54,1 mmol, 97%).

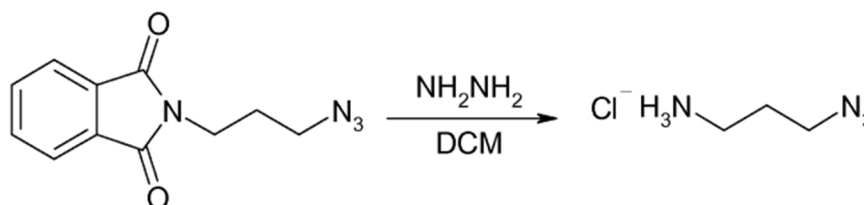


[0123] RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ ppm 7,78 (m, 2H), 7,65 (m, 2H), 3,72 (t, 2H, *J* = 6,9 Hz), 3,31 (t, 2H, *J* = 6,9 Hz), 1,90 (tt, 2H, *J* = 6,9 Hz).

¹³C RMN (75 MHz CDCl₃): δ ppm 168,28, 134,04, 131,96, 123,31, 49,0, 35,35, 28,0; MALDI-TOF: *M*_{calculado} = 230,08 (C₁₁H₁₀N₄O₂), encontrado (*m/z*) 231,1 [M+H]⁺, 253,1 [M + Na]⁺.

Ejemplo 6 - Síntesis de 3-azidopropilamine

[0124] 2-(3-azidopropilo)isoindol-1,3-diona (3 g, 12 mmol) se disuelve en 10 ml de diclorometano, después se añade hidrazina (9,6 ml, 32 mmol, 2,6 eq). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante la noche con agitación. Luego se agrega una solución acuosa de ácido clorhídrico 1N (100 ml). La fase orgánica se decanta y la fase acuosa se lava con diclorometano (3 x 50 ml). El pH de la fase acuosa se ajusta a 14 con una solución saturada de hidróxido de sodio. La fase acuosa se extrae luego con diclorometano (3 x 40 ml). Las fases de diclorometano se combinan y se extraen con una solución acuosa de ácido clorhídrico 1 N (3 x 50 ml). La solución acuosa ácida finalmente se congela y se liofiliza. El clorhidrato de 3-azidopropilamonio se obtiene en forma de un polvo blanco (1,49 g, 10,97 mmol, 84%).



[0125] RMN-¹H (D₂O, 300 MHz): δ ppm 3,52 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz), 3,11 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz), 1,96 (tt, 2H, *J* = 6,6 Hz). ¹³C RMN (D₂O 75 MHz): δ ppm 39,02, 26,48, 15,67.

MALDI-TOF: *M*_{calculado} = 100,07 (C₃H₈N₄): encontrado *m/z* 101,0 [M+H]⁺, 123,0 [M + Na]⁺, 139,0 [M + K]⁺, 107,1 [M+Li]⁺.

Ejemplo 7 - Preparación del polímero PsAcF1

[0126] Se disuelven 100 mg de **PsAc1 (1,4)** en 2 ml de agua desionizada, después se ajustó a pH 4,74 con una solución de 1N HCl. Luego se agrega 1-ciclohexilo-3-(2-morfolino-etilo)carbodiimida (CMC) (296,5 mg, 0,7 mmol, 1,1 eq) y el pH se ajusta nuevamente a 4,74 con una solución de 1N HCl. Se agrega 3-azidopropilamina en forma de hidrocloreto, luego el pH se ajusta a 8,4. La mezcla de reacción se agita durante la noche a temperatura ambiente. Luego, las muestras se dializan durante 70 horas en una solución de 2M NaCl y luego 100 horas en agua desionizada. Finalmente, el producto **PsAcF1** así obtenido se congela y se liofiliza.

Ejemplo 8 - Medición de la tasa de sustitución en grupos reactivos

[0127] El grado de sustitución en grupos azida se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación: DS=(B/A)/2, con A: integral de los protones transportados por los carbonos C₁; B: integral de los protones en el campo fuerte (debido a las señales de protones de 3-azidopropilamina).

[0128] La **Figura 2** muestra la relación entre el grado de sustitución con grupos azida (Y) y el número de equivalentes

de 3-azidopropilamina (Ec) que participan en la reacción, con respecto a la relación de sustitución de los grupos carboxílicos disponibles.

Ejemplo 9 - Preparación del polímero **PsAc1 (1,15)**

5 **[0129]** A una solución de 5 g (27,7 mmol, 1 eq) de dextrano T40 disuelto en 16 ml de agua se le agregan 90 ml de isopropanol gota a gota bajo fuerte agitación. Se añaden 6 g (150 mmol, 5,4 eq) de hidróxido de sodio al medio de reacción que luego se deja bajo agitación a 60°C durante 1 h.

10 **[0130]** A esta mezcla se le añadieron 7,5 g (79,36 mmol, 2,8 eq) de ácido monocloroacético. Este último se dejó agitar a 60°C durante la noche. Se obtiene una pasta blanquecina que se disuelve en 50 ml de agua. El producto se precipita luego en 500 ml de MeOH enfriado a 0°C con agitación vigorosa. Los gránulos obtenidos después de la centrifugación (2500 rpm, 10 min, 4°C) se disuelven en la cantidad mínima de agua y el producto se precipita por segunda vez en 500 ml de MeOH. Los gránulos, obtenidos después de la segunda precipitación, se lavan dos veces con MeOH, luego se solubilizan en un mínimo de agua y se liofilizan. Se obtiene 3 g (15,7 mmol) de **PsAc1** con un grado de sustitución de 1,15, es decir **PsAc1 (1,15)**.

Ejemplo 10 - Preparación del polímero **PsAcAr1 (1,15; 0,64)**

20 **[0131]** El pH de una solución que contiene 468 mg (2,44 mmol, 1 eq) de **PsAc1 (1,15)** disuelto en 9,4 mL de agua se ajusta a 4,74 mediante la adición de 1N HCl y 0,1N. A esta solución se le añaden 1,187 g (2,806 mmol) de CMC, el pH se ajusta nuevamente a 4,74. Luego se añaden 266 µl (2,44 mmol, 1 eq con respecto a x) de bencilamina al medio de reacción que se deja bajo agitación magnética durante la noche a temperatura ambiente. El pH final de la solución es 10,2.

25 **[0132]** El medio de reacción se introduce entonces en un tubo de diálisis (3.500 g/mol; 1 ml/cm) se sumerge en 3,5 L de una solución de NaCl a 2M para permanecer allí durante 5 días y luego en 3,5 L de agua para permanecer allí también durante 5 días.

30 **[0133]** El contenido del cordón se coloca en una olla para congelar y liofilizar. Se obtienen 477 mg (1,67 mmol) de **PsAcAr1 (1,15; 0,64)** (tasa de sustitución en el grupo bencilamino de 0,64).

Ejemplo 11 - Preparación del polímero **PsAcArF1 (1,15; 0,64; 0,26)**

35 **[0134]** El pH de una solución que contiene 256 mg (0,895 mmol, 1 eq) de **PsAcAr1 (1,15; 0,64)** disuelto en 2 ml de agua se ajusta a 4,74 mediante la adición de HCl a 1N y 0,1N. A esta solución se le agregan 212,5 mg (0,502 mmol) de CMC, el pH se ajusta nuevamente a 4,74. Luego se añaden 870 µl (4,56 mmol) de una solución de hidrazina al 24-26% en agua al medio de reacción que se deja bajo agitación magnética durante la noche a temperatura ambiente. El pH final de la solución es 10,28.

40 **[0135]** El medio de reacción se introduce entonces en un tubo de diálisis (3500 g/mol; 1 ml/cm) se sumerge en 3,5 L de una solución de 2M NaCl a permanecer allí durante 5 días y luego en 3,5 L de agua para permanecer allí también durante 5 días.

45 **[0136]** La pestaña del contenido se coloca luego en una olla para congelar y liofilizar. De este modo se obtienen 235 mg (0,81 mmol) de **PsAcArF1 (1,15; 0,64; 0,26)** (tasa de sustitución de hidrazida de 0,26).

Ejemplo 12 - Preparación del polímero **PsAcAr1 (1,2; 0,49)**

50 **[0137]** El pH de una solución de 513,3 mg de **PsAc1 (1,2)**, disuelto en 10 ml de agua desionizada, se ajusta a 4,74 utilizando una solución de ácido clorhídrico 1 N. Metilsulfonato de N-ciclohexilo-N'-(2-morfolinoetilo)-carbodiimida (931,85 mg, 2,2 mmol, 1,1 eq.) se agrega a temperatura ambiente, luego el pH de la solución se ajusta a 4,74 de la misma manera. Luego se agrega gota a gota bencilamina (428,6 mg, 4,0 mmol, 2 eq.) y la solución se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. El medio de reacción se purifica por diálisis en una solución de 2M NaCl durante 3 días, luego en agua desionizada durante 3 días. Después de la liofilización, se obtiene **PsAcAr1 (1,2; 0,49)** en forma de un polvo blanco amorfo (grado de sustitución de 0,49 por grupos bencilamino). ¹H RMN (D₂O, 300 MHz): δ (ppm): 7,21 (s, ls, H_{ar}), 5,09 (s, ls, H_{ano}), 4,89 (s, ls, H_{ano}), 4,53-3,39 (m, ls).

Ejemplo 13 - Preparación del polímero **PsAcF1 (1,2; 0,38)**

60 **[0138]** 513,3 mg de **PsAc1 (1,2)** se disuelven en 10 ml de agua desionizada. El pH de la solución se ajusta a 4,74 usando una solución de 1N HCl. Metilsulfonato de N-ciclohexilo-N'-(2-morfolinoetilo)-carbodiimida (931,85 mg, 2,2 mmol, 1,1 eq.) se agrega a la solución y el pH se ajusta nuevamente a 4,74. Se introduce clorhidrato de 3-azidopropilamonio (819,5 mg, 6 mmol, 3 eq.) en el medio de reacción, luego el pH se ajusta a 8,4 usando una solución de Na₂CO₃ 1 N. La reacción es agitada a temperatura ambiente durante 16 horas. El producto crudo se dializa durante 3 días en una solución de 2M NaCl y luego 3 días en agua desionizada. La liofilización permite obtener **PsAcF1 (1,2;**

65

0,38) en forma de un polvo blanco amorfo (grado de sustitución en grupos azido de 0,38). ¹H RMN (D₂O, 300 MHz): δ (ppm): 5,07 (s, 1s, H_{ano}), 4,88 (s, 1s, H_{ano}), 4,28-3,26 (m, 1s), 1,77 (s, 1s, CH₂).

Ejemplo 14 - Preparación del polímero **PsAcArF₂** (1,2; 0,34; 0,38)

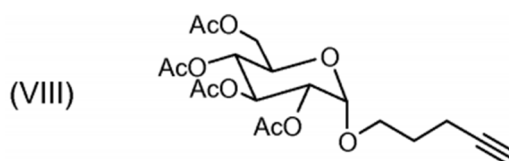
[0139] Una solución de 272,2 mg de **PsAcF₁** (1,2; 0,38) y se disolvió en 5 ml de agua desionizada se ajusta a pH 4,74 con una solución de 1N HCl. Se introduce metilsulfonato de *N*-ciclohexilo-*N'*-(2-morfolinoetilo)-carbodiimida (372,8 mg, 0,88 mmol, 1,1 eq.) y el pH del medio de reacción se ajusta nuevamente a 4,74 con una solución de 1N HCl. Se agrega bencilamina (171,4 mg, 4,6 mmol, 2 eq.) y la solución se mezcla a temperatura ambiente durante 18 horas. La diálisis en 2N NaCl durante 3 días, luego en agua desionizada durante 3 días, seguida de liofilización permite obtener el compuesto **PsAcArF₂** (1,2; 0,34; 0,38) (grado de sustitución de 0,34 por un grupo bencilamino). ¹H RMN (D₂O, 300 MHz): δ (ppm): 7,23 (s, 1s, Har), 5,05 (s, 1s, H_{ano}), 4,84 (s, 1s, H_{ano}), 4,33-3,26 (m, 1s), 1,68 (s, 1s, CH₂).

Ejemplo 15 Preparación del polímero **PsAcArF₂** (1,2; 0,49; 0,62)

[0140] A una solución de 224,2 mg de **PsAcAr₁** (1,2; 0,49) en 5 ml de agua desionizada a pH = 4,74, se agrega el metilsulfonato de *N*-ciclohexilo-*N'*-(2-morfolinoetilo)-carbodiimida (372,7 mg, 0,88 mmol, 1,1 eq.). El pH de la solución se ajusta a 4,74 con una solución de 1N HCl y luego se agrega clorhidrato de 3-azidopropilamonio (327,8 mg, 2,4 mmol, 3 eq.). El pH se ajusta a 8,4 y luego la solución se agita a temperatura ambiente durante 17 horas. La diálisis en 2N NaCl durante 3 días, luego en agua desionizada durante 3 días, y finalmente la liofilización, da el polímero **PsAcArF₂** (1,2; 0,49; 0,62) (grado de sustitución de 0,62 en el grupo azida). ¹H RMN (D₂O, 300 MHz): δ (ppm): 7,23 (s, 1s, Har), 5,05 (s, 1s, H_{ano}), 4,84 (s, 1s, H_{ano}), 4,33-3,26 (m, 1s), 1,68 (s, 1s, CH₂).

Ejemplo 16 - síntesis de pent-4-inilo-α-D-glucopiranosido

[0141] El producto de fórmula (VIII) se sintetiza como se indica a continuación:



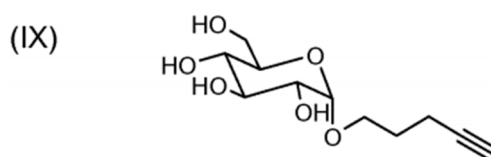
[0142] D-(+)-glucosa (360, 3 mg, 2,0 mmol) se disuelve en 4-pentin-1-ol (1,01 g, 12,0 mmol, 6,0 eq.) y la solución se calienta a 65°C. 120 mg de H₂SO₄-SiO₂ se añadió y la solución se mezcla a 65°C durante 10 horas. La solución se enfrió a temperatura ambiente y después el compuesto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice con un gradiente de CH₂Cl₂ a CH₂Cl₂-MeOH como eluyente; 9:1. El producto deseado se obtiene en forma de un aceite incoloro con un rendimiento del 79% y una relación anomérica α/β de 1,6/1. El residuo (405,0 mg, 1,63 mmol) se disuelve en piridina (5 mL) y anhídrido acético (1,33 g, 13,0 mmol, 8 eq.) A temperatura ambiente.

[0143] DMAP (20 mg) se añadió luego a 0°C y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. El medio de reacción se neutraliza mediante la adición gota a gota a 0°C de 5 ml de MeOH. Los disolventes se eliminan a presión reducida en un evaporador rotativo y los disolventes residuales se coevaporan 3 veces con tolueno. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice con la mezcla de eluyente pentano-AcOEt (8/2) permite obtener 190 mg de cristales blancos del producto tetraacetilado deseado de conformación α, así como 450 mg de la mezcla de los dos anómeros, que corresponde a un rendimiento 98% total:

¹H RMN (D₂O, 300 MHz): δ (ppm): 5,47 (dd, 1H, *J* = 10,0, 9,6 Hz), 5,06 (m, 2H), 4,87 (dd, 1H, *J* = 10,2, 3,7 Hz), 4,27 (dd, 1H, *J* = 12,3, 4,3 Hz), 4,07 (m, 2H), 3,85 (dt, 1H, *J* = 9,9, 5,9 Hz), 3,54 (dt, 1H, *J* = 9,9, 6,1 Hz), 2,34 (dt, 2H, 1H, *J* = 6,8, 2,7 Hz), 2,10 (s, 3H), 2,07 (s, 3H), 2,03 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 1,97 (t, 1H, *J* = 2,6 Hz), 1,82 (q, 2H, *J* = 6,5 Hz). ¹³C RMN (D₂O, 75 MHz): δ (ppm): 170,9, 170,4, 170,3, 169,8, 96,1, 83,3, 71,0, 70,4, 69,4, 68,9, 68,7, 67,4, 66,9, 62,1, 28,4, 20,9, 20,9, 20,8, 20,8, 15,2. HRMS calculado para C₁₉H₂₆O₁₀ [M+Na]⁺: 437,5; m/z encontrado: 437,1.

Ejemplo 17 - síntesis de pent-4-inilo-α-D-glucopiranosido

[0144] Se sintetizó como se muestra a continuación el producto de fórmula (IX):



[0145] A una solución del compuesto tetraacetilado obtenido en el Ejemplo 16 (180 mg, 0,434 mmol) disuelto en 3 ml de MeOH se añade a 0°C 4 ml de NaOMe 0,1 M en MeOH y el medio de reacción se mezcla a temperatura ambiente

durante 4 horas. La reacción se neutraliza a pH = 7 con una resina Dowex-50W. El medio de reacción se filtró a continuación, se evaporó a sequedad bajo presión reducida y se purificó por cromatografía en columna sobre sílice gel con CH₂Cl₂-MeOH; 9:1 como eluyente para dar el derivado de α-glucosa con un rendimiento cuantitativo como un aceite incoloro. ¹H RMN (D₂O, 300 MHz): δ (ppm): 5,12 (d, 1H, J = 3,9 Hz), 4,08 (m, 2H), 4,00 (m, ¹H), 3,92 (m, 2H), 3,82 (m, 1H), 3,76 (m, 1H), 3,62 (m, 1H), 2,55 (m, 3H), 2,03 (m, 2H). ¹³C RMN (D₂O, 75 MHz): δ (ppm): 100,0, 87,0, 75,1, 73,6, 73,3, 71,6, 71,4, 68,2, 62,4, 29,3, 16,5. HRMS calculado para C₁₁H₁₈O₆ [M+Na]⁺: 269,1; encontrado m/z: 269,0.

Ejemplo 18 - Preparación del polímero **PsAcF2 (1,2; 0,4)**

[0146] El polímero **PsAcF1 (1,2; 0,4)** (24,8 mg) y 4-pentin-1-ol (200 μl de una solución a 92,5 mg/ml en agua, 0,22 mmol, 2,2 eq.) se agitan en 150 μl de agua desionizada a temperatura ambiente. Ascorbato de sodio (50 μl de una solución recién preparada en agua a 200 mg/ml, 0,05 mmol, 0,5 eq.) y sulfato de cobre (II)-pentahidrato (50 μl de una solución a 25 mg/ml en agua, 0,005 mmol, 0,05 eq.) se añadió a continuación a la reacción de medio que se mezcla a temperatura ambiente durante 20 horas. La purificación por diálisis en una solución de 2M NaCl durante 3 días, luego en agua desionizada durante 3 días seguido de liofilización conduce a la producción del polímero **PsAcF2 (1,2; 0,4)** en la forma de polvo amorfo blanco. El grado de sustitución del triazol es 0,4 (es decir que esencialmente todos los grupos reactivos F se han convertido).

¹H RMN (D₂O, 300 MHz): δ (ppm): 7,65 (s, ls, H_{triazol}), 5,03 (s, ls, H_{ano}), 4,85 (s, ls, H_{ano}), 4,30-3,30 (m, ls), 3,13 (s, ls, CH₂), 2,61 (s, ls, CH₂), 2,01 (s, ls, CH₂), 1,75 (s, ls, CH₂).

Ejemplo 19 - preparación del polímero **PsAcF3 (1,2; 0,34)**

[0147] Ascorbato de sodio (50 μl de una solución recién preparada en agua a 200 mg/ml, 0,05 mmol, 0,5 eq.), Luego se añaden sucesivamente sulfato-pentahidrato de cobre (II) (50 μl de una solución de 25 mg/ml en agua, 0,005 mmol, 0,05 eq.) sucesivamente a una mezcla de **PsAcF1 (1,2; 0,34)** (24,8 mg) y pent-4-inilo-α-D-glucopiranosido (49,3 mg, 0,2 mmol, 2,0 eq.) en 900 μl de agua desionizada a temperatura ambiente. Después de 20 horas, el medio de reacción se purifica por diálisis en una solución de 2M NaCl durante 3 días, luego en agua desionizada durante 2 días. El polímero **PsAcF3 (1,2; 0,34)** se obtiene después de la liofilización en forma de un polvo blanco amorfo. El grado de sustitución en triazol es 0,26, es decir que solo parte de los grupos reactivos F se han convertido. ¹H RMN (D₂O, 300 MHz): δ (ppm): 7,74 (s, ls, H_{triazol}), 5,06 (s, ls, H_{ano}), 4,88 (s, ls, H_{ano}), 4,78 (s, ls, H_{ano}), 4,34-3,16 (m, ls), 2,71 (s, ls, CH₂), 2,05 (s, ls, CH₂), 1,89 (s, ls, CH₂).

Ejemplo 20 - preparación del polímero **PsAcArF3 (1,2; 0,42; 0,38)**

[0148] Ascorbato de sodio (50 μl de una solución recién preparada en agua a 200 mg/mL, 0,05 mmol, 0,5 eq.), luego sulfato de cobre (II)-pentahidrato (50 μl de una solución de 25 mg/mL en agua, 0,005 mmol, 0,05 eq.) se añadieron sucesivamente a una mezcla de **PsAcArF2 (1,2; 0,42; 0,38)** (28,7 mg) y 4-pentin-1-ol (200 μl de solución de 92,5 mg/ml en agua, 0,22 mmol, 2,2 eq.) en 700 μl de agua desionizada a temperatura ambiente. Después de 20 horas, el medio de reacción se purifica por diálisis en una solución de 2M NaCl durante 3 días, luego en agua desionizada durante 2 días. El polímero **PsAcArF3 (1,2; 0,42; 0,38)** se obtiene después de la liofilización en forma de un polvo blanco amorfo. El grado de sustitución con triazol es 0,28 (tasa de conversión del 74% de los grupos reactivos F).

¹H RMN (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 7,62 (s, ls, H_{triazol}), 7,21 (s, ls, H_{ar}), 5,04 (s, ls, H_{ano}), 4,89 (s, ls, H_{ano}), 4,29-3,50 (m, ls), 3,13 (s, ls, CH₂), 2,58 (s, ls, CH₂), 1,96 (s, ls, CH₂), 1,73 (s, ls, CH₂).

Ejemplo 21 - preparación del polímero **PsAcArF4 (1,2; 0,42; 0,38)**

[0149] A una solución de **PsAcArF2 (1,2; 0,42; 0,38)** (28,7 mg) y pent-4-inilo-α-D-glucopiranosido (43,8 mg, 0,178 mmol, 1,8 eq.) En 500 μl de agua desionizada y 400 μl de PBS 0,1 M se agrega ascorbato de sodio (100 μl a 200 mg/ml en PBS, 0,05 mmol, 1 eq.). Se agrega sulfato de cobre (II) pentahidratado (100 μl de 25 mg/ml en PBS, 0,005 mmol, 0,1 eq.) y el medio de reacción se agita a temperatura ambiente durante 20 h. El dextrano se recoge en una solución acuosa de EDTA-2Na 0,5 M (2 ml) antes de purificarse por diálisis en una solución de 2M NaCl durante 3 días, luego en agua desionizada durante 2 días. La liofilización permite obtener el **PsAcArF4 (1,2; 0,42; 0,38)** como un polvo blanco amorfo. El grado de sustitución con triazol es 0,34 (tasa de conversión del 89% de los grupos reactivos F).

¹H RMN (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 7,63 (s, ls, H_{triazol}), 7,21 (s, ls, H_{ar}), 5,00 (s, ls, H_{ano}), 4,90 (s, ls, H_{ano}), 4,85 (s, ls, H_{ano}), 4,23-3,22 (m, ls), 3,09 (s, ls, CH₂), 2,64 (s, ls, CH₂), 1,22 (s, ls, CH₂), 1,19 (s, ls, CH₂).

Ejemplo 22 - Funcionalización de placas de poliestireno y medición del ángulo de caída

[0150] Una placa de poliestireno (placa Goodfellow, 10 cm x 10 cm) previamente lavada con agua y etanol, se empapa hasta la mitad una solución de polímero en tampón PBS a una concentración de 10 μg/ml o en PBS solo (control) durante la noche a temperatura ambiente (una placa por tipo de polímero). Los polímeros probados son los descritos arriba y más particularmente **PsAc1 (1,2)**, **PsAcAr1 (1,2; 0,42)**, **PsAcArF2 (1,2; 0,42; 0,38)** y **PsAcArF4 (1,2; 0,42; 0,27)** (el valor de 0,27 representa aquí solo el grado de sustitución de triazol).

[0151] La superficie de contacto con la solución de poliestireno se empapa luego dos veces 5 minutos en un baño de agua. Se seca bajo nitrógeno durante 10 min.

5 [0152] Estas superficies se usan luego para soltar las mediciones de ángulo. El área del sustrato que no ha estado en contacto con la solución se usa como control.

[0153] 10 gotas de agua de 1 μ l se depositan en el medio de la superficie tratada y no tratada (control). Los resultados (ángulo medio y rango intercuartil) se muestran en la **Figura 3**.

10 [0154] Se observa que el tratamiento de la superficie de poliestireno por los polisacáridos **PsAcAr1**, **PsAcArF2** y **PsAcArF4** conduce a una disminución significativa en el ángulo de caída de agua en comparación con poliestireno el no tratado. Por lo tanto, estos polímeros permiten la funcionalización del poliestireno.

Ejemplo 23: funcionalización de poliestireno de 96 pocillos por ligandos

15 [0155] En este ejemplo, el fondo de los pocillos de poliestireno está completamente cubierto con una capa de PSac, PsAcAr o PsAcArF y luego se incuba con ligandos (lectinas). Luego se incuba una proteína con la superficie funcionalizada por los ligandos. Finalmente, un sistema de detección de fluorescencia permite identificar los pozos que han capturado la proteína diana.

20 [0156] Las placas de 96 pocillos utilizadas son del tipo MaxiSorp Immunoplate del fabricante Nunc.

25 1) Se incuban 100 μ l de una solución de polímero en PBS (pH = 7,4) (entre 50 μ g/ml y 0,1 μ g/ml) en los pocillos de la placa durante 16 a temperatura ambiente.

2) Los pocillos se lavan luego con 3 x 300 μ l de PBS (pH = 7,4) que contiene Tween 20 al 0,1% durante 3 x 5 minutos.

3) Los pocillos se incuban luego con 300 μ l de una solución de PBS (pH = 7,4) Tween 20 (0,1%) que contiene BSA (3%, 1% o 0,1%) o caseína (0,1%) durante 1 hora a temperatura ambiente.

4) Los pocillos se lavaron con 3 x 300 μ l de PBS (pH = 7,4) Tween 20 (0,1%) durante 3 x 5 minutos.

30 5) Los pocillos se incuban luego con 200 μ l de una solución de lectina biotinilada (por ejemplo, 10 μ g/ml, 5 μ g/ml o 1 μ g/ml) en PBS (pH = 7,4) Tween 20 (0,1%) que contiene $MnCl_2$ y $CaCl_2$ a una concentración final de 1 mM. La incubación dura 1 hora a temperatura ambiente con agitación.

Se usaron las siguientes lectinas (disponibles comercialmente): concanavalina A (ConA), aglutinina de germen de trigo (WGA) y lectina de *Erythrina Cristagalli*.

35 ConA interactúa con residuos terminales de alfa-D-glucosa o alfa-D-manosa. La WGA reconoce N-acetilo-D-glucosaminas. La ECL reconoce residuos terminales de alfa-D-galactosa.

6) Los pocillos se lavaron con 3 x 300 μ l de PBS (pH = 7,4) Tween 20 (0,1%) durante 3 x 5 minutos.

7) Los pocillos se incuban luego con 200 μ l de una solución de estreptavidina marcada con tetrametilrodamina (5 μ g/ml o 1 μ g/ml) en PBS (pH = 7,4) Tween 20 (0,1 %) durante 2 horas a temperatura ambiente.

40 8) Los pocillos se lavaron con 3 x 300 μ l de PBS (pH = 7,4) Tween 20 (0,1%) durante 3 x 5 minutos.

9) Los pocillos se lavaron con 3 x 300 μ l de agua desionizada durante 3 x 5 minutos.

10) La placa se seca en una centrífuga durante 10 minutos y luego se seca con nitrógeno durante 5 minutos.

11) La fluorescencia en el fondo de los pocillos se mide a 532 nm utilizando un escáner de fluorescencia confocal.

45 [0157] Los resultados se muestran en las **Figuras 4 y 5**.

50 [0158] La **Figura 4** es un gráfico de barras que representa la intensidad de fluorescencia obtenida con polímero **PsAcArF4 (1,2; 0,42, 0,34)** (la tasa de sustitución de 0,34 para sólo los grupos F triazoles) y las tres lectinas mencionadas. Las relaciones indicadas en el eje de abscisas son las relaciones lectina/estreptavidina.

[0159] Se observa que la **PsAcArF4** es reconocida selectivamente por ConA como se esperaba, que muestra la calidad de la funcionalización de la placa de poliestireno y la disponibilidad de ligando frente a la proteína diana.

55 [0160] La **Figura 5** es un histograma representativo de la intensidad de fluorescencia obtenida con el mismo polímero **PsAcArF4 (1,2; 0,42, 0,34)** y ConA. Las relaciones indicadas en el eje de abscisas son las relaciones lectina/estreptavidina. El último resultado (T) es un control sin el polisacárido.

60 [0161] Este experimento ilustra la relación entre la intensidad de la señal de fluorescencia y la concentración de ConA utilizada en los pocillos. La fluorescencia asociada con los pocillos que no han recibido ConA, estreptavidina o **PsAcArF4** es muy débil.

Ejemplo 24 - Formación de microparcels en el fondo de los pocillos de una placa de 96 pocillos mediante impresión de polisacáridos, interacción con lectinas

65 [0162] En este experimento, se imprimen diferentes polímeros en el fondo de una placa de 96 pocillos no tratada.

[0163] Los biochips así producidos se incuban luego con proteínas (lectinas).

[0164] Las placas de 96 pocillos utilizadas son del tipo MaxiSorp Immunoplate del fabricante Nunc. Se depositan 300 µL de solución de polímero (a concentraciones de 10 µg/mL, 7,5 µg/mL, 5 µg/mL y 1 µg/mL en PBS) en la placa usando un aparato Packard BioChipArrayer BCA-1 de acuerdo con la siguiente disposición:

PsAcArF4 (1,2; 0,42; 0,27)	○○○	○○○	PsAc1 (1,2)
PsAcF1 (1,2; 0,38)	○○○	○○○	PsAcAr1 (1,2; 0,42)
PsAcArF2 (1,2; 0,42; 0,38)	○○○	○○○	PsAcArF3 (1,2; 0,42; 0,28)

[0165] Para el polímero **PsAcArF4**, la tasa de sustitución de 0,27 corresponde solo a grupos triazoles. Para el polímero **PsAcArF3**, la tasa de sustitución de 0,28 corresponde solo a grupos triazoles.

- 1) Los pocillos se incuban con 100 µl de una solución de PBS (pH = 7,4) Tween 20 (0,1%) que contiene BSA (3%) durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- 2) Los pocillos se lavan luego con 3 x 100 µl de PBS (pH = 7,4) que contiene Tween 20 al 0,1% durante 3 x 5 minutos.
- 3) Los pocillos se incuban con 100 µl de una solución de lectina biotilada (por ejemplo, 20 µg/ml, 10 µg/ml o 5 µg/ml) en PBS (pH = 7,4) Tween 20 (0,1%) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación orbital. Para lectinas (ConA, ECL y WGA), se añaden sales de MnCl₂ y CaCl₂ para una concentración final de 1 mM.
- 4) Los pocillos se lavan con 3 x 100 µl de PBS (pH = 7,4) Tween 20 (0,1%) durante 3 x 5 minutos.
- 5) Los pocillos se incuban luego con 100 µl de una solución de estreptavidina tetrametilrodamina (5 µg/ml) en PBS (pH = 7,4) Tween 20 (0,1%) durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 6) Los pocillos se lavan con 3 x 100 µl de PBS (pH = 7,4) Tween 20 (0,1%) durante 3 x 5 minutos.
- 7) Los pozos se lavan con 3 x 100 µl de agua desionizada durante 3 x 5 minutos.
- 8) La placa se seca en una centrifuga durante 10 minutos y luego se seca con nitrógeno durante 5 minutos.
- 9) La detección se lleva a cabo con un escáner a 532 nm.

[0166] La **Figura 6** resume los resultados. Se encuentra que ConA se une selectivamente al polímero **PsAcArF4**, sin que ninguna de las otras dos lectinas sea fijada.

Ejemplo 25 - Funcionalización de placas de poliestireno y medición del ángulo de caída, influencia de la velocidad de sustitución aromática

[0167] Para este experimento, se usan los polímeros **PsAc1 (1,27)**, **PsAcAr1 (1,27; 0,03)**, **PsAcAr1 (1,27; 0,39)** y **PsAcAr1 (1,27; 0,54)**.

[0168] 5 placas de poliestireno (placas Goodfellow, 10 cm x 10 cm) previamente lavadas con agua y etanol, se sumergen a la mitad en las soluciones de **PsAc1** o **PsAcAr1** solubilizadas en PBS a una concentración de 10 µg/ml o en PBS solo durante la noche a temperatura ambiente.

[0169] La superficie de poliestireno en contacto con la solución se empapa luego dos veces 5 minutos en un baño de agua. Luego se seca bajo nitrógeno durante 10 min.

[0170] Estas superficies se usan luego para soltar las mediciones de ángulo. El área del sustrato que no ha estado en contacto con la solución se usa como control.

[0171] 10 gotas de agua de 1 µl se depositan en el medio de la superficie tratada y no tratada (control).

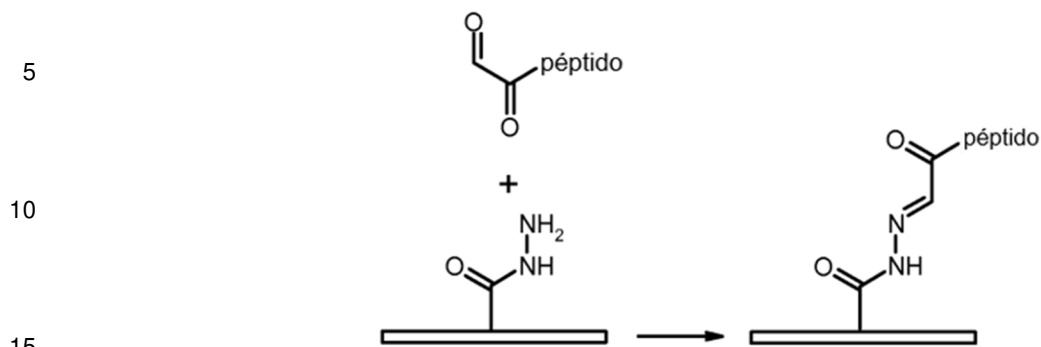
[0172] Los resultados (ángulo medio y rango intercuartil) se muestran en la **Figura 7**. La primera barra es el resultado de la medición directa, y la segunda barra después de 24 horas de almacenamiento bajo vacío parcial (desecador).

[0173] Se hace notar que **PsAcAr1 (1,27; 0,54)** permite una disminución significativa del ángulo de contacto, que pasó de 86°C para el poliestireno no tratado a 56°C para el poliestireno tratado. Las funciones injertadas en la superficie del poliestireno usando **PsAcAr1 (1,27; 0,54)** hacen que la superficie sea más hidrófila, lo que resulta en una reducción en el ángulo de contacto del agua en estas superficies, en comparación con el poliestireno no tratado. El polímero **PsAcAr1 (1,27; 0,54)** permite así la funcionalización química del poliestireno.

Ejemplo 26 - Funcionalización de placas de poliestireno de 96 pocillos y ligadura de hidrazona con péptidos fluorescentes

[0174] Para este experimento, se usan los polímeros **PsAcArF1 (1,1; 0,75; 0,03)** y **PsAcAr 1 (1,1; 0,75)**. El polímero **PsAcArF 1 (1,1; 0,75; 0,03)** permite funcionalizar el fondo de los pocillos mediante una función hidrazida. El polímero **PsAcAr1 (1,1; 0,75)**, que no tiene esta función, sirve como control. Se sabe que la función hidrazida reacciona con moléculas que tienen una función aldehído. El enlace formado es una hidrazona. El principio de la reacción es el

siguiente:



[0175] Se utilizan dos péptidos: el péptido 1 (SEQ ID NO: 1) de fórmula Rho-KR-NH(CH₂)₃-NH-CHOCO (funcionalizado con tetrametilrodamina y por una función CHOCO) y el péptido 2 (SEQ ID NO: 2) de fórmula RhoKR-NH₂ (funcionalizado por tetrametilrodamina y por una función amida). La síntesis de estos péptidos se describe en Ollivier et al., Alpha-oxo semicarbazone peptide or oligodeoxynucleotide microarrays, Bioconjug. Chem 14, 430-9 (2003).

Protocolo:

[0176] Los pocillos de una microplaca de 96 pocillos hecha de poliestireno (Maxisorp, Nunc) se trataron con 100 µl de una solución de **PsAcArF1 (1,1; 0,75; 0,03)** o **PsAcAr1 (1,1; 0,75)** a una concentración de 5 µg/ml en PBS. El tratamiento se lleva a cabo a temperatura ambiente con agitación durante la noche.

[0177] La placa se lava entonces con PBS/Tween 20 0,05% usando un lavador de placas (300 µL/pocillo, 6 lavados).

[0178] Dos conjuntos de péptidos de las soluciones 1 y 2 se prepararon a concentraciones de 10⁻⁶, 5 x 10⁻⁷, 2,5 x 10⁻⁷, 1,25 x 10⁻⁷ y 6,25 x 10⁻⁸ M en tampón de acetato pH 5,5/0,1% BSA. Se depositan 60 µl de cada solución en el fondo de los pozos tratados con **PsAcArF1 (1,1; 0,75; 0,03)** o **PsAcAr1 (1,1; 0,75)** (2 pozos/condición). La reacción de ligadura se lleva a cabo con agitación durante 2 h a temperatura ambiente.

[0179] La placa se lava con PBS/Tween 20 (0,05%) (300 µL/pocillo, 6 lavados), después con agua desionizada (300 µL/pocillo, 3 lavados). El secado por centrifugación se lleva a cabo (2500 rpm, 5 min, 20°C). La placa se lee con el escáner de fluorescencia Tecan.

[0180] El resultado se muestra en la **Figura 8**. Las barras grises corresponden al péptido 1 y las barras blancas al péptido 2. C_n corresponde a las diferentes concentraciones de **PsAcArF1 (1,1; 0,75; 0,03)** y C'_n corresponde a las diferentes concentraciones de **PsAcAr1 (1,1; 0,75)** con 1 = 10⁻⁶ M; 2 = 5 x 10⁻⁷ M; 3 = 2,5 x 10⁻⁷ M; 4 = 1,25 x 10⁻⁷ M; 5 = 6,25. 10⁻⁸ M.

[0181] La intensidad de las señales (de forma ordenada) que están asociadas con los pocillos tratados por **PsAcArF1 (1,1; 0,75; 0,03)** a continuación, se incubaron con el aldehído péptido 1 es alta (C_n, péptido 1). En comparación, la intensidad de las señales asociadas con los pocillos tratados con **PsAcAr1 (1,1; 0,75)** (pocillos de control que no tienen la función hidrazida reactiva con respecto a la función aldehído del péptido 1) es muy baja. (C'_n, péptido 1).

[0182] En todos los casos, la intensidad de las señales asociadas con los pocillos incubados con el péptido de control 2 que no tiene la función aldehído es muy baja (C_n o C'_n, péptido 2).

[0183] Este ejemplo demuestra el péptido de unión quimioselectivo aldehído 1 a pozos tratados con **PsAcArF1 (1,1; 0,75; 0,03)** y que tienen funciones hidrazidas disponibles.

[0184] Se llevaron a cabo experimentos adicionales variando el pH de la reacción de ligadura. El pH preferido para la reacción es 5 como se esperaba para este tipo de reacción química.

Ejemplo 27 - funcionalización de placas de 96 pocillos en poliestireno, preparación de microarrays mediante impresión de péptidos y reacción *in situ*

[0185] En este experimento, los pocillos se funcionalizan con un polímero de polisacárido. Los péptidos se imprimen para formar un biochip, los péptidos se unen a la superficie a través de la formación de un enlace covalente de hidrazona.

[0186] La síntesis de péptidos utilizados en este experimento se describe en: Carion et al, Chemical Micropatterning of Polycarbonate for Site-Specific Peptide Immobilization and Biomolecular

Interactions. Chembiochem 8, 315-322 (2007).

[0187] Los péptidos utilizados son:

- 5 - Ser-HA: H-SGYPDVDPYAGYPYDVPDYAGYPYDVPDYAS-NH₂ (SEQ ID NO: 3);
 - Ser-FLAG: H-SDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGGG-NH₂ (SEQ ID NO: 4);
 - CHOCO-HA: CHOCO-GYPYDVPDYAGYPYDVPDYAGYPYDVPDYASNH₂ (SEQ ID NO: 5);
 - CHOCO-FLAG: CHOCO-DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGGG-NH₂ (SEQ ID NO: 6).

10 Protocolo:

[0188] Impresión de péptidos Ser-HA, CHOCO-HA, Ser-FLAG y CHOCO-FLAG, a una concentración de 10⁻⁴ M en PBS o tampón de acetato a pH 5,5, en placas de tipo 96 pocillos funcionalizadas con el polímero **PsAcArF1** (10 µg/ml), el polímero **PsAcAr1** (10 µg/ml), el tampón PBS o sin tratar.

[0189] La saturación de los pocillos se realiza con 300 µl de PBS+1% de BSA durante 30 min con agitación.

[0190] Los pocillos se lavaron manualmente con PBS/0,1% de Tween 20.

20 [0191] La incubación se lleva a cabo con anti-HA y anti-FLAG a una concentración de 1 µg/ml en PBS/0, BSA al 1% durante 1 h 30 min con agitación (100 µL/pocillo). Los pocillos se lavaron manualmente con PBS/Tween 20 al 0,1%.

[0192] La incubación se lleva a cabo con anticuerpo IgG anti-murino marcado con tetrametilrodamina a una concentración de 2 µg/ml en PBS/BSA al 0,1% durante 1 hora con agitación (100 µL/pocillo).

25 [0193] Los pocillos se lavaron manualmente con PBS/Tween 20 al 0,1%, 3 veces con agua, se secaron por centrifugación (2500 rev/min, 5 min, 20°C).

30 [0194] Las placas se leen en el escáner Tecan (compensación de enfoque: -1000 / ganancia MTP: 90 / resolución: 4 µM).

[0195] Los resultados de la incubación con el anticuerpo anti-HA se muestran en la **Figura 9** y los resultados de la incubación con anticuerpo anti-FLAG se muestran en la **Figura 10** (intensidad de fluorescencia en forma ordenada).

35 Ejemplo 28 - Preparación de bis({2-[trifenilmetilo]sulfanilo}etilo)amina

[0196] 1,50 g de bis(2-cloroetilo)amina (8,4 mmol) y 4,65 g de trifenilmetanotiol (2 equivalente, 16,80 mmol) se introducen en un matraz y se colocan bajo una atmósfera inerte. Con agitación magnética, se añaden 25 ml de dimetilformamida anhidra (DMF) y la mezcla de reacción se enfría en un baño de hielo. Se añaden gota a gota 4 equivalentes de 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno (DBU). La mezcla se deja bajo agitación a temperatura ambiente durante 3 horas y la reacción es seguida por cromatografía en capa fina (TLC) (eluyente: ciclohexano/acetato de etilo/trietilamina: 8 / 2 / 0,1). Después de este tiempo, el disolvente se evapora en un evaporador rotativo. El sólido blanco obtenido se disuelve en 50 ml de diclorometano (DCM) y el producto se extrae tres veces con una solución acuosa de KH₂PO₄ al 5%. El producto luego se purifica por cromatografía en una columna de gel de sílice (eluyente: ciclohexano/AcOEt/trietilamina (TEA): 8 / 2 / 0,1) para obtener 1,46 g de sólido blanco amorfo (rendimiento 28%).

[0197] El análisis del producto es como sigue.

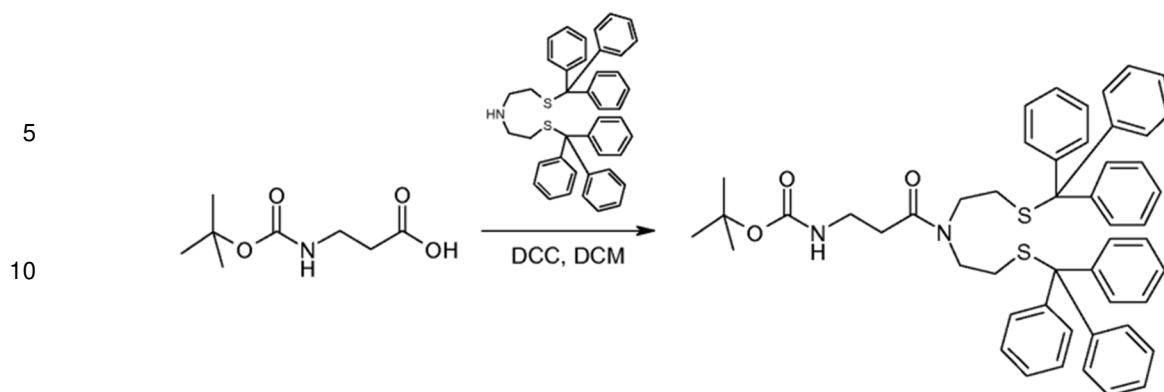
R_f = 0,37 (gel de sílice, ciclohexano/AcOEt/TEA: 8 / 2 / 0,1).

50 ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,41 - 7,37 (m, 12H, Trt), 7,15 - 7,29 (m, 18H, Trt), 2,23 - 2,36 (m, 8H, CH₂), 1,26 (s, 1H, NH). ¹³C (75 MHz, CDCl₃) 154,1; 129,8; 128,1; 126,9; 47,9; 32,6; MALDI-TOF: 243,1 [Trt⁺], 622,3 [M+H⁺]⁺, 644,3 [M⁺ + Na⁺].

Ejemplo 29 - Síntesis de Boc-βAla-N(CH₂CH₂STrt)₂

55 [0198] Boc-β Alanina (1,908 g, 10,1 mmol) se disuelve en 50 ml de diclorometano, a continuación, la solución se enfrió a 0°C y se agrega N,N-diciclohexilo-carbodiimida (5 mmol). La agitación continúa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la filtración, se agrega bis({2-(trifenilmetilo)sulfanilo}etilo)amina (2,5 g, 4 mmol). La mezcla de reacción se deja bajo agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. El medio de reacción se evapora a sequedad. Al residuo obtenido, se añaden 100 µl de una solución acuosa de hidróxido de sodio (1 N) y la extracción se lleva a cabo con diclorometano (3 x 100 ml). La fase orgánica se seca sobre sulfato de magnesio anhidro y se evapora. El producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (ciclohexano/acetato de etilo/trietilamina, 80/20/0,1, v/v/v). El producto Boc-βAla-N(CH₂CH₂STrt)₂ se obtiene en forma de un polvo blanco (3,1 g, 3,9 mmol, 97%).

65 [0199] El esquema de la reacción es el siguiente:



15

[0200] Punto de fusión: 53°C.
 ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ ppm 1,43 (9 H, s, CH_3); 1,94 (2 H, t, $J = 4$ Hz, CH_2S); 2,14 (2 H, t, $J = 4$ Hz, CH_2S); 2,31 (2 H, t, $J = 4$ Hz, CH_2CON); 2,73 (4H, m, CONCH_2); 3,23 (2H, m, OCONCH_2); 5,23 (H, m, CONH); 7,10-7,50 (30 H_{Ar} , m). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ ppm 28,50 (CH_3); 29,50 (CH_2); 30,0 (CH_2); 33,0 (CH_2); 36,0 (CH_2); 45,0 (CH_2); 47,0 (CH_2); 126,7 (CH); 127,0 (CH); 128,0 (CH); 129,5 (CH); 130,0 (CH); 143,0 (Cquat); 144,5 (Cquat); 145,0 (Cquat); 156,0 (Cquat); 171,0 (Cquat).
 MALDI-TOF (matriz DHB): Mcalc = 792,3 ($\text{C}_{50}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$); $m/z = 815,4$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; $m/z = 831,3$ [$\text{M}+\text{K}$] $^+$.

25

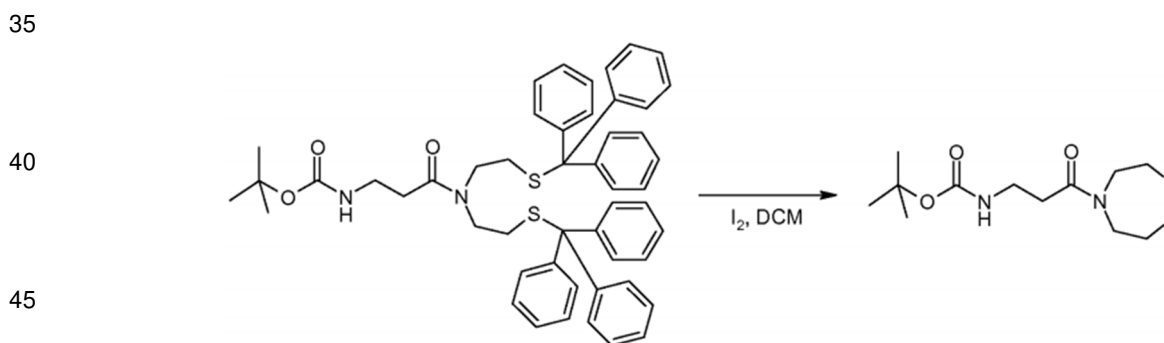
Ejemplo 30 - Síntesis de Boc- β Ala-ditiazepano

30

[0201] El producto Boc- β Ala-ditiazepano (3 g, 3,78 mmol) se disolvió en diclorometano (50 ml) y se añadió yodo (2,87 g, 11,3 mmol). La agitación continúa durante 30 minutos a temperatura ambiente. El exceso de yodo se neutraliza con una solución acuosa de tiosulfato de sodio (3 M, 100 ml). Se extrae con diclorometano (4 x 100 ml). La fase orgánica se seca sobre sulfato de magnesio anhidro y se evapora. El producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (hexano/acetato de etilo/trietilamina, 40 / 60 / 0,1, v/v/v). El producto Boc- β Ala-ditiazepano se obtiene en forma de una pata blanca (1,1 g, 3,6 mmol, 95%).

35

[0202] El esquema de reacción es como sigue:



50

[0203] ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ ppm 1,39 (9H, s, CH_3); 2,48 (2 H, t, $J = 4$ Hz, CH_2CON); 2,87 (2 H, t, $J = 4$ Hz, CH_2S); 3,04 (2 H, t, $J = 4$ Hz, CH_2S); 3,39 (2H, m, OCONCH_2); 3,76 (2 H, t, $J = 4$ Hz, CONCH_2); 3,86 (2 H, t, $J = 4$ Hz, CONCH_2); 5,25 (H, m, NH).
 ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ ppm 28,5 (CH_3); 33,0 (CH_2); 36,0 (CH_2); 37,0 (CH_2); 39,5 (CH_2); 50,0 (CH_2); 53,0 (CH_2); 143,0 (Cquat); 156,0 (Cquat); 172,0 (Cquat) MALDI-TOF (matriz DHB): Mcalc = 306,1 ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{OS}_2$); $m/z = 307,1$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; $m/z = 329,1$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; $m/z = 345,1$ [$\text{M}+\text{K}$] $^+$.

55

Ejemplo 31 - síntesis de NH_2 - β Ala-ditiazepano

60

[0204] El producto Boc- β Ala-ditiazepano (1 g, 3,26 mmol) se disuelve en diclorometano (5 ml) y se agrega ácido trifluoroacético (5 ml). La agitación se continúa durante 30 minutos a temperatura ambiente. El medio de reacción se evapora hasta sequedad. Al residuo obtenido, se agrega una solución acuosa de hidróxido de sodio (1 N) y la mezcla se extrae con diclorometano (3 x 100 ml). La fase orgánica se seca sobre sulfato de magnesio anhidro y se evapora. El producto NH_2 - β Ala-ditiazepano se obtiene como un aceite claro (628 mg, 3,04 mmol, 94%).

65

[0205] El diagrama de la reacción es como sigue:



5

[0206] ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ ppm 2,44 (2 H, t, $J = 4$ Hz, CH_2CON); 2,60 (H, m, NH_2); 2,90 (2 H, t, $J = 4$ Hz, NH_2CH_2); 3,0 (4H, m, CH_2S); 3,77 (2 H, t, $J = 4$ Hz, CONCH_2); 3,84 (2 H, t, $J = 4$ Hz, CONCH_2).

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ ppm 35,0 (CH_2); 35,5 (CH_2); 37,5 (CH_2); 39,0 (CH_2); 50,0 (CH_2); 52,0 (CH_2); 172,0 (Cquat).

MALDI-TOF (matriz DHB): Mcalc = 206,05 ($\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_2\text{OS}_2$); $m/z = 207,0$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; $m/z = 229,0$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

10

Ejemplo 32 - síntesis del polímero **PsAcArF5**

[0207] Se disolvió en un matraz 50 mg de polímero **PsAcAr1** (**1,1**; **0,49**) (0,20 mmol) en 1 ml de agua desionizada, luego el pH se ajustó a 4,74 con una solución de 1N HCl. Se agrega 1-ciclohexilo-3-(2-morfolino-etilo)carbodiimida (CMC) (100 mg, 0,22 mmol, 1,1 eq), luego el pH se ajusta a 4,74. Se agrega la amina $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S})_2$ (75 mg, 0,36 mmol, 1,8 eq). La mezcla de reacción se agita durante la noche a temperatura ambiente.

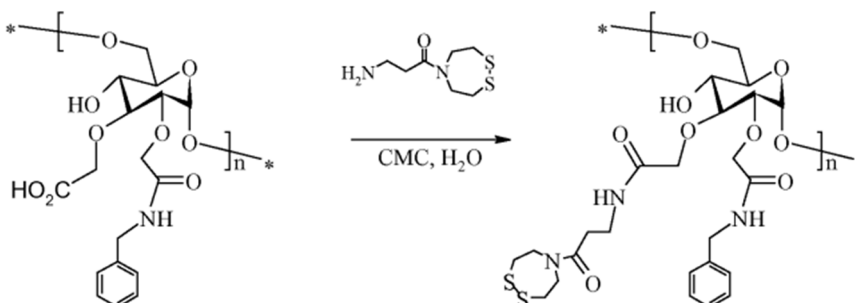
15

[0208] El medio de reacción se coloca entonces en un tubo de diálisis (3500 g/mol; 1 ml/cm), luego se sumerge en 2,5 L de una solución de 2M NaCl para permanecer allí durante 5 días y luego en 2,5 L de agua para permanecer allí también durante 5 días.

20

[0209] El contenido del cordón se pone luego en una olla para liofilizar para dar 47 mg de **PsAcArF5**. El esquema de reacción es el siguiente:

25



30

35

Ejemplo 33 - funcionalización química de placas de poliestireno de 96 pocillos. ligadura de amida con péptidos fluorescentes

40

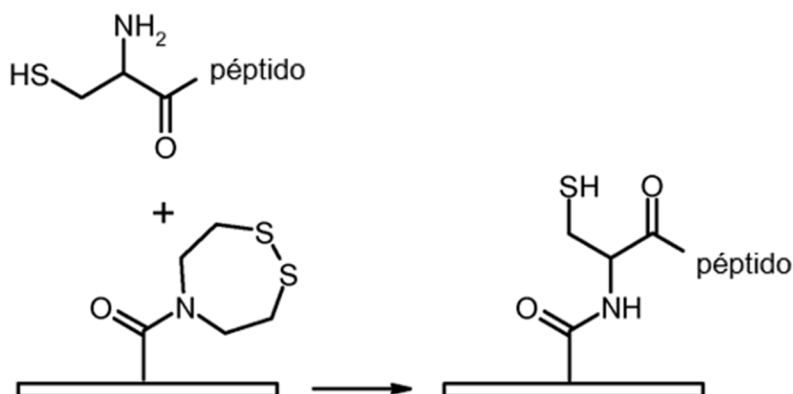
[0210] En este ejemplo, se usaron los polímeros **PsAcAr1** y **PsAcArF5**.

[0211] El polímero **PsAcArF5** permite funcionalizar el fondo de los pocillos mediante una función $\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S})_2$. El polímero **PsAcAr1**, que no tiene esta función, sirve como control. La función $\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S})_2$ puede reaccionar con moléculas que llevan una función beta-amino-tiol, como por ejemplo una cisteína presente en la posición N-terminal de los péptidos. El enlace formado es un enlace amida.

45

[0212] La química de inmovilización para el polímero **PsAcArF5** se describe en el siguiente esquema:

50



55

60

65

[0213] En el presente ejemplo, se usan dos péptidos:

- 1) H-CILK (rodamina) EPVHGV-NH₂ (SEQ ID NO: 7);
- 2) H-SILK (rodamina) EPVHGV-NH₂ (SEQ ID NO: 8).

[0214] Ambos péptidos se sintetizaron usando el siguiente protocolo:

el péptido H-ILK(Mtt)E(tBu)PVH(Trt)GV-NH₂ (SEQ ID NO: 9) se ensambla en una resina Novasyn TGR® (Novabiochem, 0,25 mmol, 0,23 mmol/g) usando el *Sintetizador de Péptidos de Microondas* (CEM) y la estrategia Fmoc/*terc*-butilo. La desprotección del grupo Mtt se lleva a cabo con una solución de TFA al 1% en CH₂Cl₂ (17 x 15 ml). La resina se neutraliza con una solución de DIEA al 5% en CH₂Cl₂ (5 x 2 min), luego se lava con CH₂Cl₂ (3 x 2 min), luego DMF (3 x 2 min). Luego se hace reaccionar la resina durante 2 h con 5(6)-carboxitetrametilrodamina (150,6 mg, 0,35 mmol), HOBT (47 mg, 0,35 mmol), HBTU (132,7 mg, 0,35 mmol) y DIEA (217,8 µl, 1,75 mmol, 5 eq) en DMF. La resina se lava luego con DMF (4 x 2 min). El grupo final Fmoc se desprotege con una solución de piperidina al 20% en DMF (5 y 15 min). La resina se lava con DMF (4 x 2 min). La resina se divide en dos porciones y reacciona con Fmoc-Cys(Trt)-OH o Fmoc-Ser(tBu)-OH respectivamente. El acoplamiento se lleva a cabo manualmente usando 4 equivalentes de aminoácidos protegidos, 4 equivalentes de HBTU y HOBT y 12 equivalentes de DIEA. La resina se lava con DMF (4 x 2 min). El grupo final Fmoc se desprotege con una solución de piperidina al 20% en DMF (5 y 15 min). La resina se lava luego con DMF (4 x 2 min), CH₂Cl₂ (6 x 2 min), éter etílico y luego se seca a presión reducida. La desprotección y la escisión de los péptidos se llevan a cabo con una solución de TFA/H₂O/EDT/TIS: 94/2,5/2,5/1 en volumen para el péptido 1) y TFA/H₂O/TIS: 95/2,5/2,5 en volumen para el péptido 2) durante 1 hora. Los péptidos se precipitaron entonces en una solución Et₂O/*n*-heptano: 1/1 en volumen, se disolvió en agua y se liofilizó. La purificación se lleva a cabo mediante RP-HPLC y se obtienen 41 mg (20%) y 28 mg (14%) para los péptidos 1) y 2) respectivamente.

MALDI-TOF (matriz DHB) Péptido 1): M_{calc} = 1505,7 (C₇₄H₁₀₄N₁₆O₁₆S); m/z = 1506,8 [M+H]⁺; m/z = 1528,8 [M+Na]⁺.

MALDI-TOF (matriz DHB) Péptido 2): M_{calc} = 1488,7 (C₇₅H₁₀₅N₁₅O₁₇); m/z = 1489,7 [M+H]⁺; m/z = 1511,7 [M+Na]⁺.

[0215] Los polímeros **PsAcAr1** y **PsAcArF5** se incuban en una placa de 96 pocillos hecha de poliestireno a una concentración de 10 µg/ml en PBS durante la noche a temperatura ambiente con agitación (100 µL/pocillo).

[0216] Los pocillos se lavaron 6 veces con PBS/Tween 20 al 0,1%. La placa se secó en la centrífuga.

[0217] Los péptidos 1) y 2) se solubilizan en una concentración de 10⁻⁴ M en tampón de fosfato 200 mM en presencia de ácido mercaptofenilacético 200 mM (MPAA), tris(carboxietilo)fosfina 80 mM, a pH 7,6. Estas soluciones se incuban durante 10 minutos con agitación a 37°C (60 µL/pocillo) en los pocillos funcionalizados.

[0218] Los pocillos se lavaron 6 veces con PBS/0,1% de Tween 20 y 3 veces con agua desionizada. La placa se seca en una centrífuga (2500 rpm, 5 min, 20°C). La placa se analiza con un escáner de fluorescencia Tecan.

[0219] Los resultados se muestran en la **Figura 11** (intensidad de fluorescencia en forma ordenada). Este ejemplo demuestra que los pocillos de la placa de poliestireno funcionalizados usando el polímero **PsAcArF5** permiten la unión del péptido de cisteína 1) y no del péptido de serina de control 2). La señal muy débil obtenida con el polímero de control **PsAcAr1** para los dos péptidos muestra la importancia de tener una función de 2,5-ditiazepano en la superficie de poliestireno para una unión del péptido de cisteína 1).

Ejemplo 34 - preparación de un microchip de anticuerpo en el fondo de placas de poliestireno de 96 pocillos

[0220] En este ejemplo, los pocillos se funcionalizan usando un polisacárido, luego los anticuerpos se imprimen para formar un biochip. Estas proteínas se unen a la superficie a través de la formación de enlaces no covalentes. Los biochips se incuban con proteínas diana.

[0221] 8 pocillos de una microplaca de poliestireno de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc-Immuno Plate) fueron tratados con 100 µl de **PsAcArF1 (1,15; 0,64; 0,26)** a una concentración de 10 µg/ml en tampón (condiciones A). Se tratan 8 pocillos con el tampón solo (condiciones B). El tratamiento se lleva a cabo a temperatura ambiente con agitación durante la noche.

[0222] La placa se lavó luego con tampón usando un lavador de placas (200 µl/pocillo, 3 lavados, agitación) y luego con agua desionizada usando un lavador de placas (200 µl/pocillo, 3 lavados, agitación).

[0223] El anticuerpo anti-estreptavidina (anti-estreptavidina policlonal de conejo, Anticuerpos en línea, referencia ABIN107091) se imprime en la parte inferior de los pocillos solubilizada en el tampón (3 puntos por pozo, 8 pozos, un total de 24 puntos).

[0224] La saturación de los pocillos se realiza con 200 µl de tampón con BSA al 2% durante 2 h.

[0225] Los pocillos se lavan en lavadora automática (3 ciclos, agitación) con tampón suplementado con Tween 20 al 0,05%.

[0226] A continuación, se incubó con estreptavidina-HRP (estreptavidina-HRP, Referencia Thermo-Pierce 21130) con una dilución 1:10,000 en tampón suplementado con Tween 20 al 0,05% y BSA al 0,2% durante 1 h (100 µL/pocillo).

5 [0227] Se realizó un experimento adicional con una proteína de control: conjugado HRP IgG anti-ratón de cabra, Southern Biotech, ref 103105, diluido 1:6000 en la misma solución.

10 [0228] Los pocillos se lavan en lavadora automática (3 ciclos) con tampón que contenía 0,05% de Tween 20. Se incubó a continuación con una solución de TMB (3,3', 5,5"-tetrametilbenzidina) insoluble durante 12 minutos a temperatura ambiente. Los pozos se lavan con 200 µl de agua desionizada.

[0229] Se obtiene una imagen del fondo de cada pozo usando una cámara CCD (resolución: 3 µm) que permite generar imágenes en escala de grises. Los puntos luego se cuantifican usando un software de cuantificación de microarrays estándar.

15 [0230] Los resultados de las intensidades para todos los puntos después de la incubación con estreptavidina-HRP se informan en el **Figura 12** (intensidad en unidades arbitrarias en forma ordenada; A: pocillos tratados con **PsAcArF1 (1,15; 0,64; 0,26)**; B: pocillos de control no tratados) Incubación con la proteína de control de IgG anti-ratón de cabra El conjugado HRP no dio señal detectable.

20 [0231] Esta figura muestra que la intensidad media obtenida para las manchas de anticuerpos anti-estreptavidina dentro de los pocillos A es significativamente mayor que la de los pozos B.

25 [0232] Los resultados de la desviación estándar de los píxeles para cada punto (círculos vacíos), con la mediana y la desviación intercuartil para todos los puntos son informados en la **Figura 13**. Esta desviación estándar dentro de las manchas, que caracteriza la calidad de las manchas, es mucho menor para la condición A en comparación con la condición B.

[0233] En general, estos resultados muestran la superioridad del tratamiento A para preparación de biochips.

30 LISTADO DE SECUENCIAS

[0234]

35 <110> Centre national de la recherche scientifique Innobiochips université Lille 1 sciences et technologies
Université Lille 2

<120> Proceso de funcionalización de superficie para la detección de analitos

40 <110> 31389

<160> 9

<170> RatentIn versión 3,5

45 <210> 1

<211> 2

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> obtenido por síntesis

<220>

55 <221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Grupo de rodamina en el extremo N-terminal

<220>

60 <221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> NH(CH₂)₃-NH-CHOCO

<400> 1

65

ES 2 797 391 T3

Lys Arg
1

5 <210> 2
 <211> 2
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Obtenido por síntesis

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo de rodamina en el extremo N-terminal

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> grupo NH2 en el extremo C-terminal

<400> 2

Lys Arg
1

25 <210> 3
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Obtenido por síntesis

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> Grupo NH2 en el extremo C-terminal

<400> 3

40 Ser Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Tyr Pro Tyr Asp
 1 5 10 15

45 Val Pro Asp Tyr Ala Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser
 20 25 30

50 <210> 4
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> obtenido por síntesis

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(26)
 <223> grupo NH2 en el extremo c-terminal

60 <400> 4

Ser Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp
 1 5 10 15

65 Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Gly Ser
 20 25
 26

ES 2 797 391 T3

<210> 5
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Obtenido por síntesis
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> grupo CHOCO en el extremo N terminal
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 <223> Grupo NH2 en el extremo C-termico
 15
 <400> 5
 20
 Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Tyr Pro Tyr Asp Val
 1 5 10 15
 25
 Pro Asp Tyr Ala Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser
 20 25 30
 <210> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Obtenido por síntesis
 35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> grupo CHOCO en el extremo N terminal
 40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (25)..(25)
 <223> Grupo NH2 en el extremo C-terminal
 45
 <400> 6
 50
 Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr
 1 5 10 15
 Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Gly Ser
 20 25
 <210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Obtenido por síntesis
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Rodamina
 65

ES 2 797 391 T3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Grupo NH2 en el extremo C-terminal
 5
 <400> 7

 Cys Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val
 1 5 10
 10
 <210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Obtenido por síntesis

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Rhodamina
 20

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Grupo NH2 en el extremo C-terminal
 25

 <400> 8
 30
 Ser Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val
 1 5 10

 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35

 <220>
 <223> Obtenido por síntesis
 40

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Mtt
 45

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Tbu
 50

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Trt
 55

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> grupo NH2 en el extremo del terminal C
 60

 <400> 9

 Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val
 1 5
 65

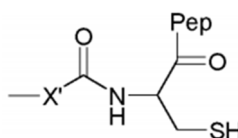
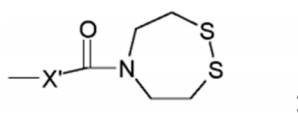
REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para detectar analitos, que comprende un sustrato de plástico cubierto al menos parcialmente con un polímero de unión directa fijado a los sustratos de forma no covalente, comprendiendo dicho polímero de unión un esqueleto de polisacárido provisto de:

- grupos aromáticos de la forma X-CONH-Z, donde X representa una cadena alquílica lineal o ramificada, sustituida o no sustituida, que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, y Z representa una función arilo;
- grupos de ácido carboxílico de la forma -X-COOH, donde X representa una cadena alquílica lineal o ramificada, sustituida o no sustituida, que comprende de 1 a 6 átomos de carbono,

caracterizándose dicho dispositivo **porque** el esqueleto de polisacárido comprende además grupos F reactivos, dicho los grupos reactivos tienen la forma -X-CONH-Z', donde X representa una cadena alquílica lineal o ramificada, sustituida o no sustituida, que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, y Z' representa un grupo capaz de unirse a otra molécula, siendo Z' seleccionado entre:

- X'-N₃;
- NH₂;



donde X' representa una cadena de alquilo sustituida o no sustituida que comprende de 1 a 6 átomos de carbono y Pep representa un fragmento peptídico.

2. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que el esqueleto de polisacárido es un esqueleto de dextrano, cuyo peso molecular está preferiblemente entre 15.000 y 100.000 Da, y más particularmente preferiblemente entre 30.000 y 60.000 Da.

3. Dispositivo según la reivindicación 1 o 2, en los que:

- X es CH₂; y/o
- Z es -CH₂-Ph o -CH₂-Ph-*para*OH.

4. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los polímeros de unión comprenden:

- de 0,4 a 0,8 grupos aromáticos, preferiblemente de 0,4 a 0,6 grupos aromáticos, preferiblemente de 0,45 a 0,6 grupos aromáticos por unidad de sacárido del esqueleto de polisacárido; y/o
- de 0 a 0,8 grupos reactivos, preferiblemente de 0 a 0,6 grupos reactivos, por unidad de sacárido del esqueleto de polisacárido; y/o
- de 0,5 a 1,5 grupos aromáticos, ácido carboxílico y reactivos en total, preferiblemente de 0,9 a 1,3 grupos aromáticos, ácido carboxílico y reactivos en total, por unidad de sacárido del esqueleto de polisacárido.

5. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el sustrato es un sustrato de poliestireno, policarbonato, poli(metilo metacrilato) o polipropileno, y preferiblemente de poliestireno.

6. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende elementos de captura inmovilizados en los polímeros de unión, dichos elementos de captura se inmovilizan preferiblemente en los polímeros de unión por adsorción o por unión covalente a los grupos F reactivos.

7. Dispositivo según la reivindicación 6, en el que los elementos de captura se seleccionan de:

- polipéptidos, opcionalmente modificados y/o conjugados;

- sacáridos, oligosacáridos y lipopolisacáridos;
- virus o fragmentos de virus y células.

5 **8.** Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende una pluralidad de zonas de detección, comprendiendo las zonas de detección preferiblemente diferentes elementos de captura.

9. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el sustrato es un portaobjetos opaco o transparente, una placa de microtitulación, una colección de perlas, una placa de cultivo, una tira o una barra.

10 **10.** Uso de un dispositivo para detectar analitos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, para detectar y opcionalmente cuantificar moléculas químicas, moléculas biológicas, células u organismos vivos.

15 **11.** Polímero de unión que se puede usar en el dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende un esqueleto de polisacárido provisto de:

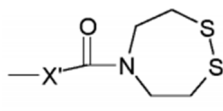
- 0,4 a 0,8 grupos aromáticos por unidad de sacárido de la forma -X-CONH-Z, donde X representa una cadena de alquilo lineal o ramificada, sustituida o no sustituida, que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, y Z representa una función arilo;

20 - grupos de ácido carboxílico de la forma -X-COOH, donde X representa una cadena de alquilo lineal o ramificada, que comprende de 1 a 6 átomos de carbono;

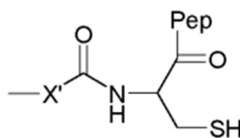
- los grupos F reactivos tienen la forma -X-CONH-Z', donde X representa una cadena alquílica lineal o ramificada, sustituida o no sustituida, que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, y Z' se selecciona entre:

- X'-N₃;
- NH₂;

25



30



35

40 donde X' representa una cadena de alquilo sustituida o no sustituida que comprende de 1 a 6 átomos de carbono y Pep representa un fragmento peptídico.

40

45 **12.** Polímero de unión según la reivindicación anterior, en el que el esqueleto de polisacárido es un esqueleto de dextrano, cuyo peso molecular es preferiblemente entre 15.000 y 100.000 Da, y más particularmente preferiblemente entre 30.000 y 60.000 Da.

45

13. Polímero de unión según una de las reivindicaciones 11 a 12, en el que:

- X y/o X' es CH₂; y/o
- X y/o X' es (CH₂)₂; y/o
- Z es -CH₂-Ph o -CH₂-Ph-*para*OH.

50

14. Polímero de unión según una de las reivindicaciones 11 a 13, que comprende:

55 - de 0,4 a 0,6 grupos aromáticos, preferiblemente de 0,45 a 0,6 grupos aromáticos, por unidad de sacárido del esqueleto de polisacárido; y/o

- de 0 a 0,8 grupos reactivos, preferiblemente de 0 a 0,6 grupos reactivos, por unidad de sacárido del esqueleto de polisacárido; y/o

- de 0,5 a 1,5 grupos aromáticos, ácido carboxílico y reactivos en total, preferiblemente de 0,9 a 1,3 grupos aromáticos, ácido carboxílico y reactivos en total, por unidad de sacárido del esqueleto de polisacárido.

60

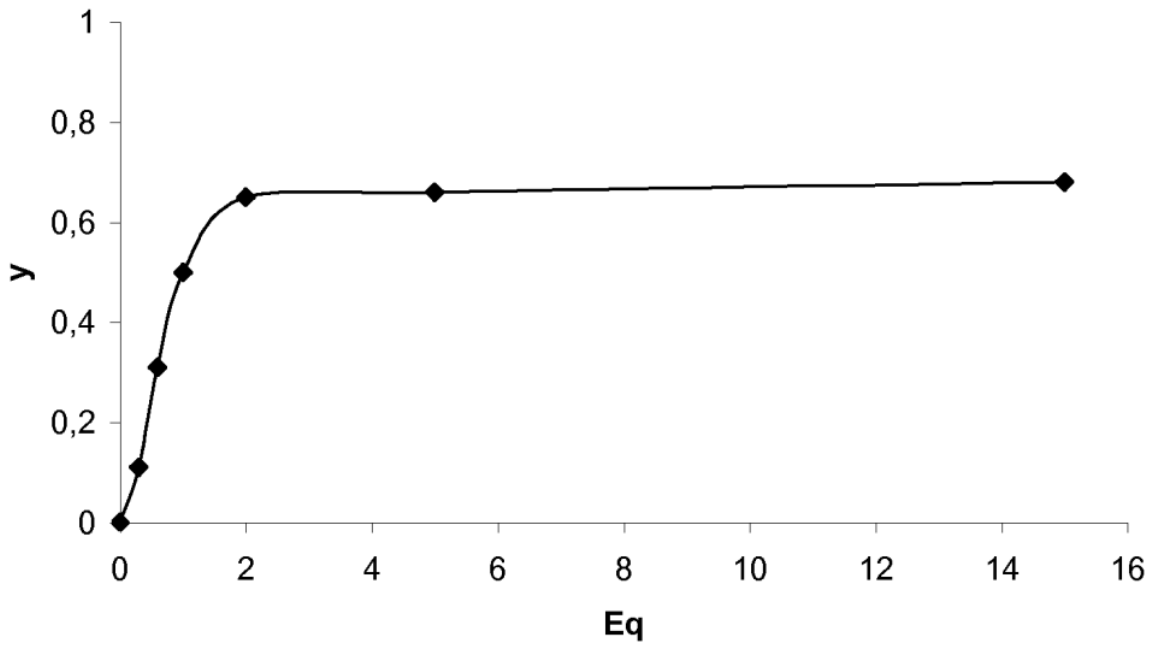


Fig. 1

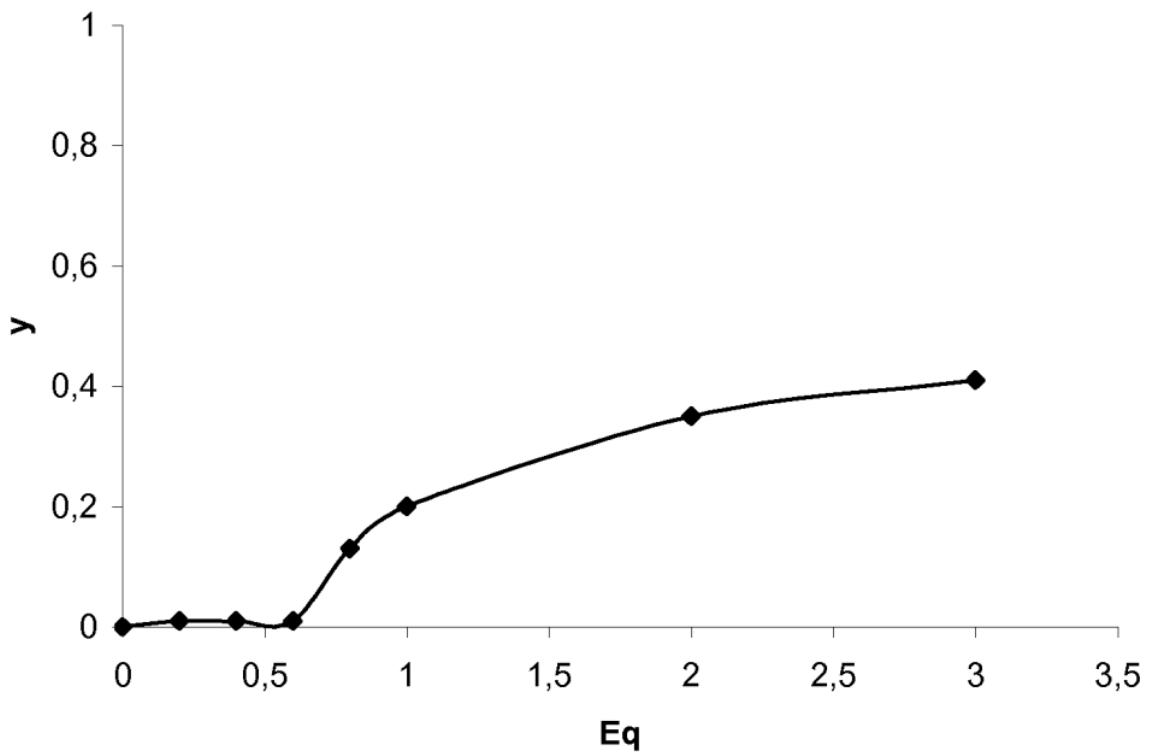


Fig. 2

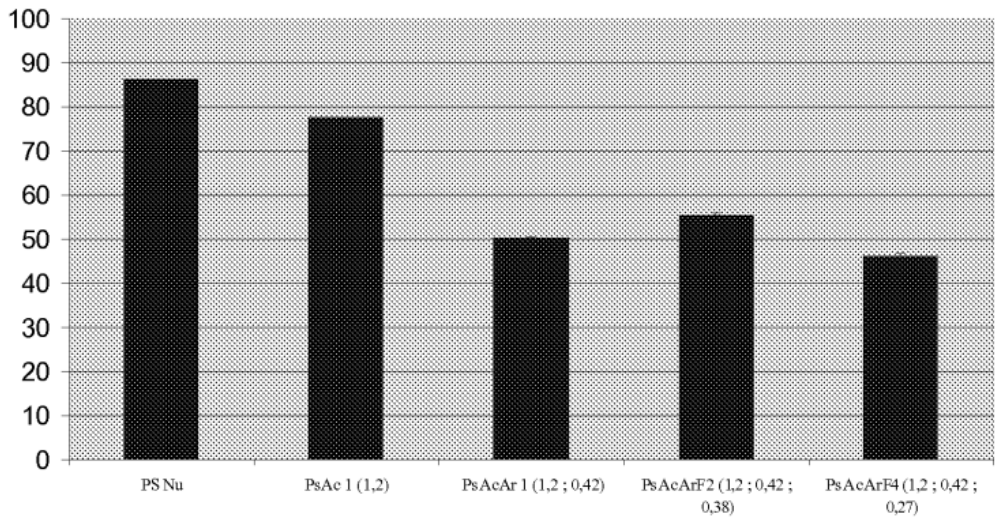


Fig. 3

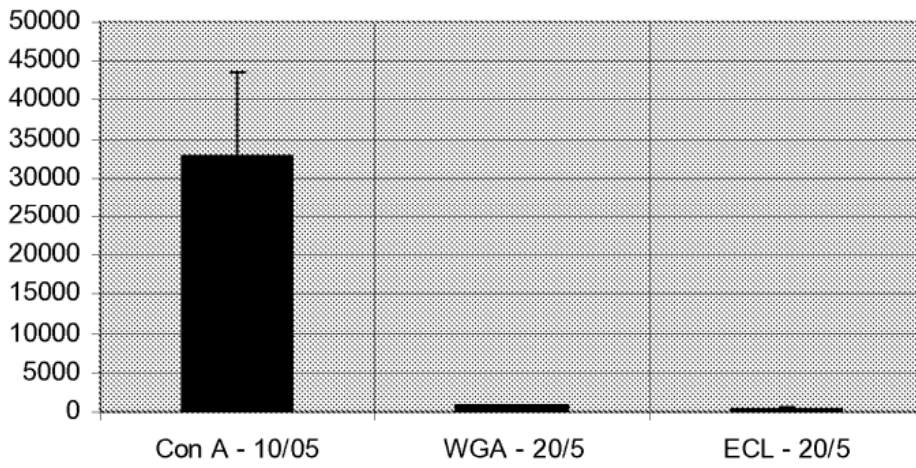


Fig. 4

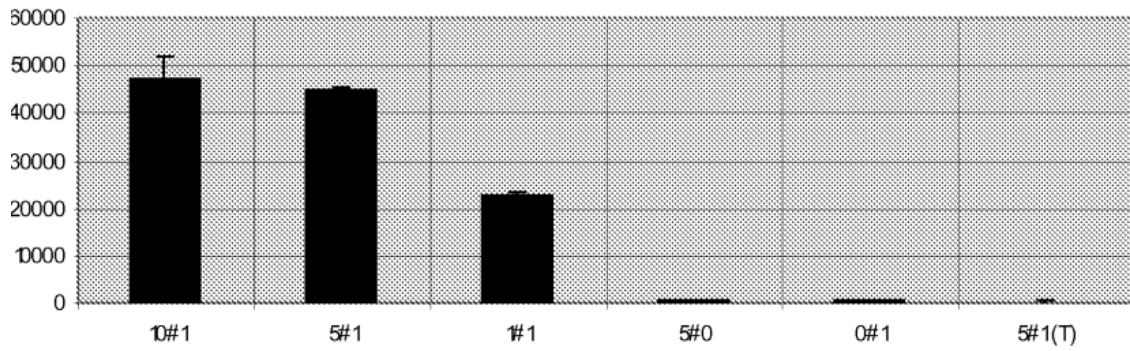


Fig. 5

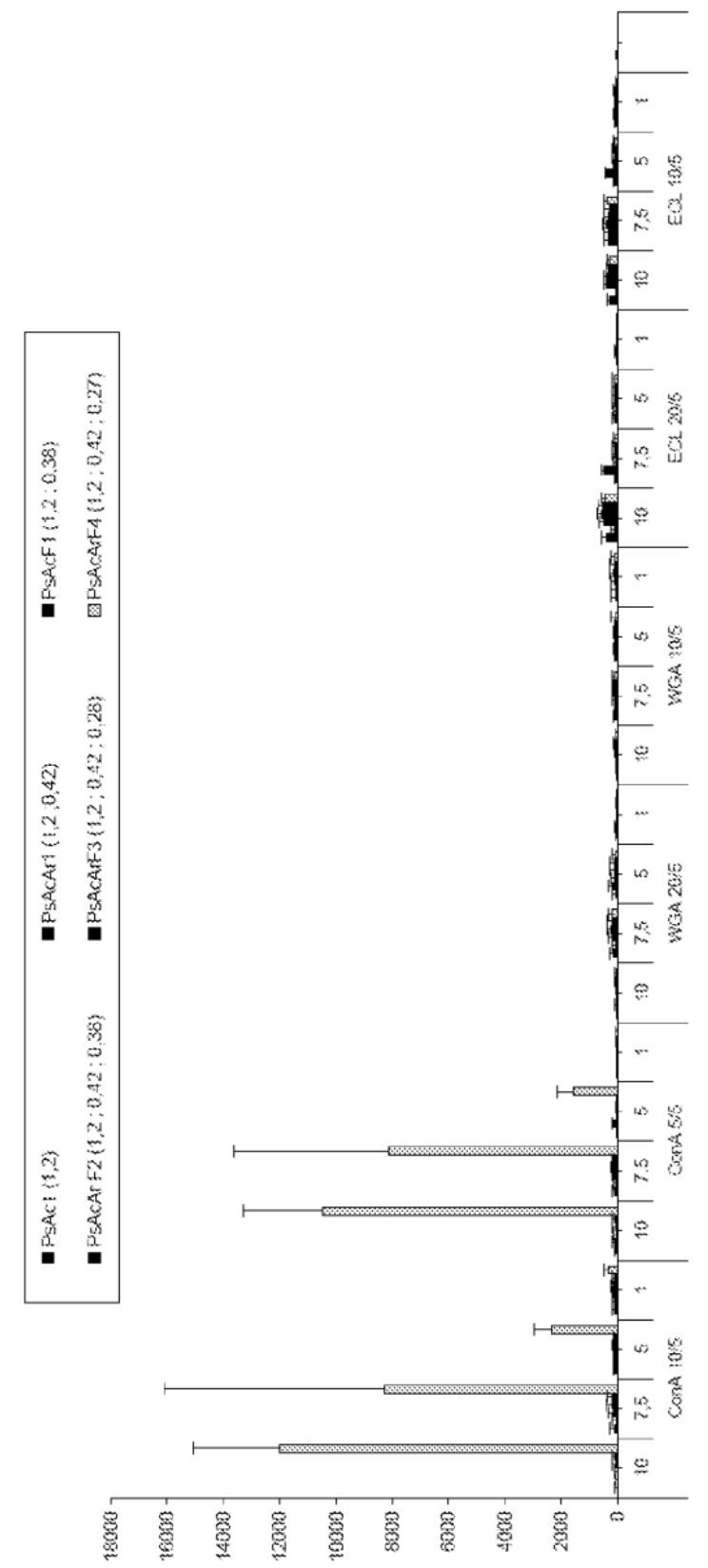


Fig. 6

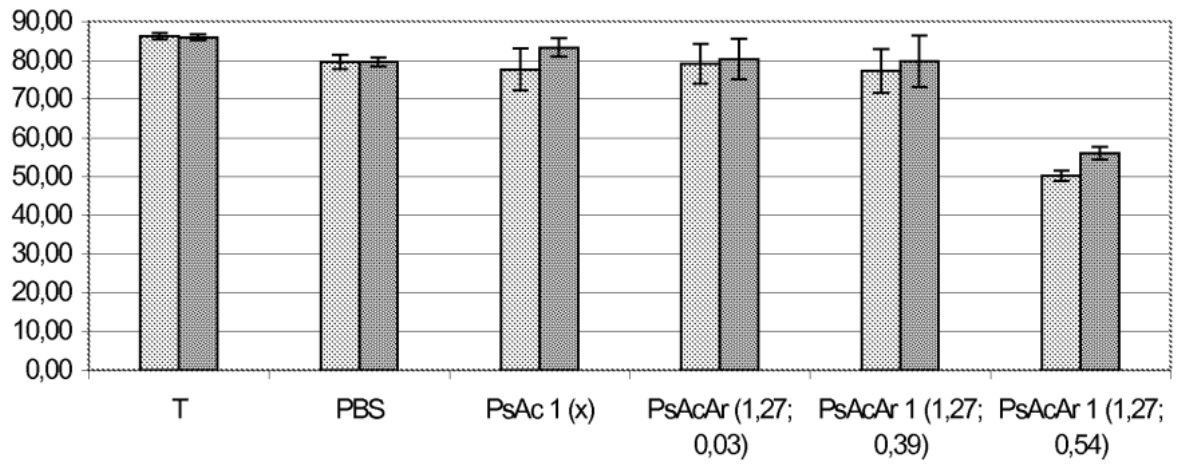


Fig. 7

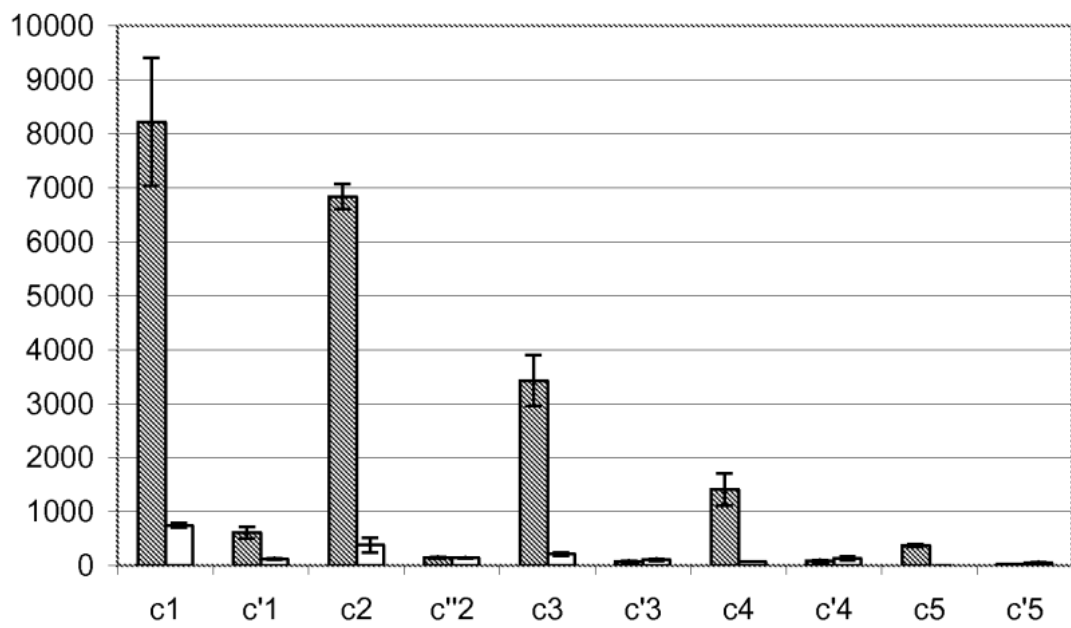


Fig. 8

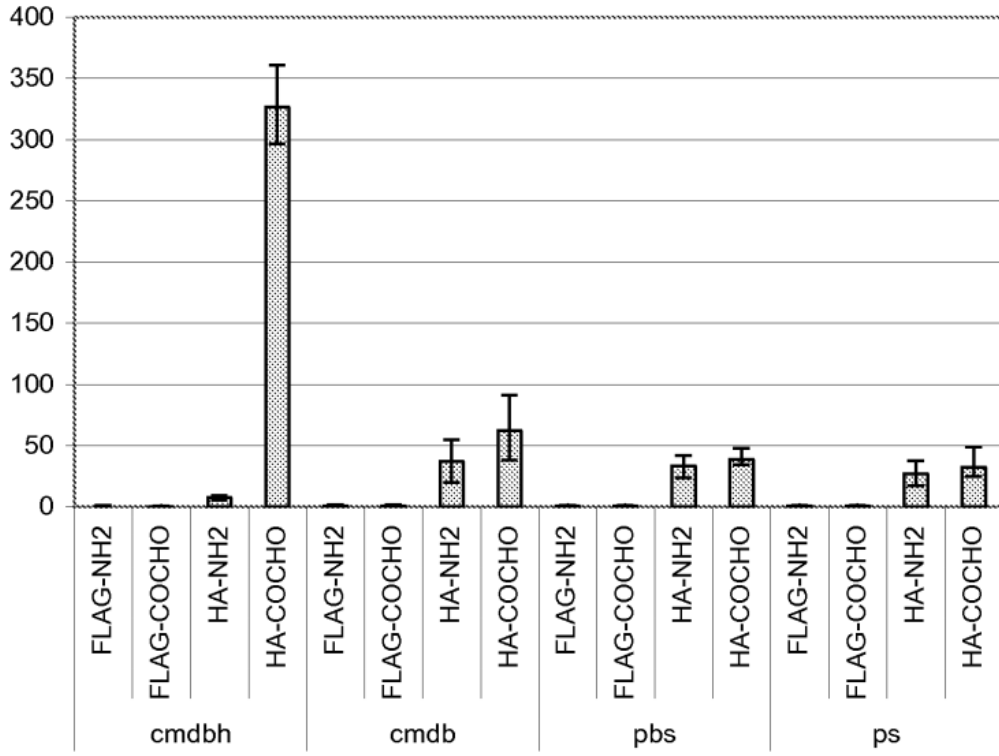


Fig. 9

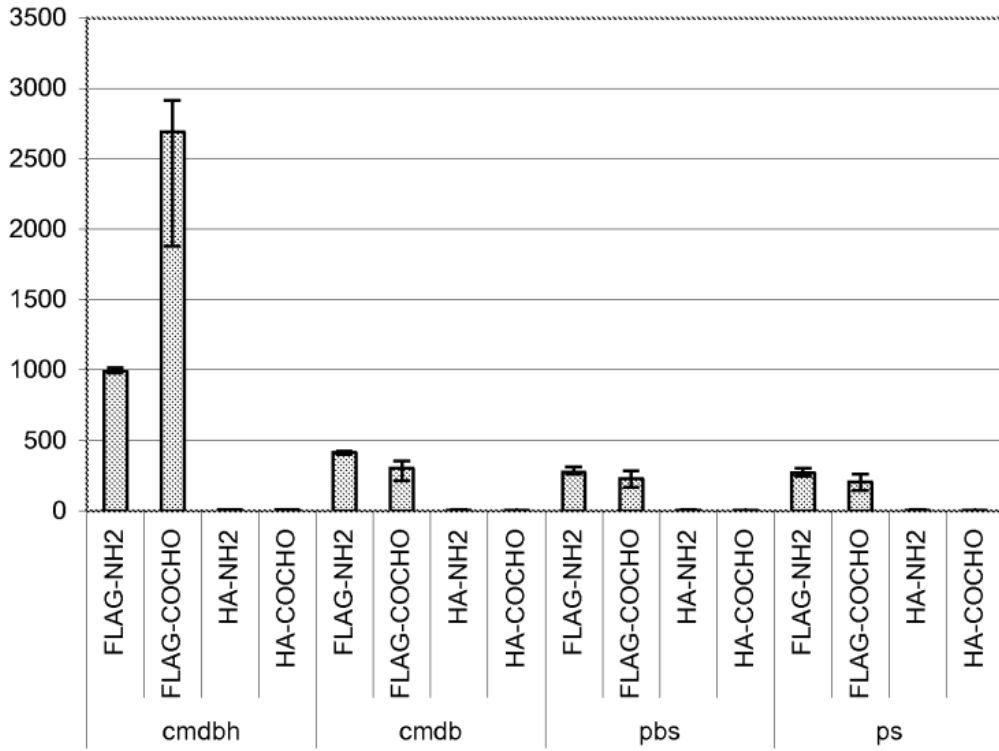


Fig. 10

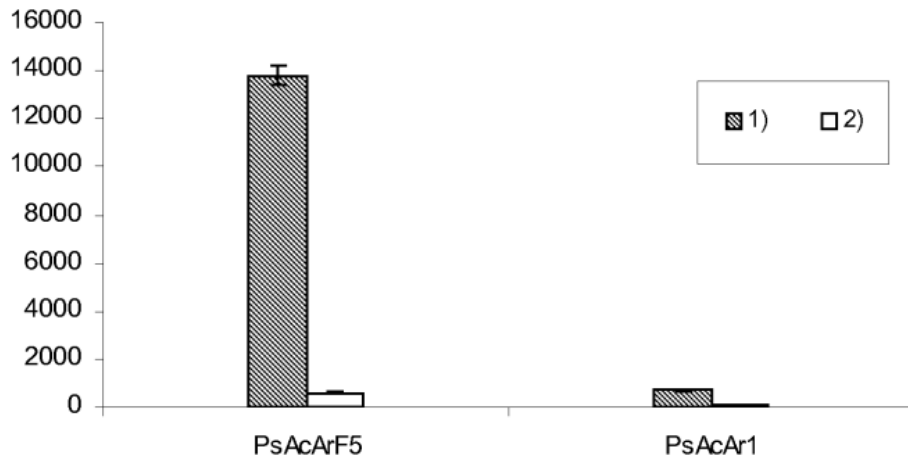


Fig. 11

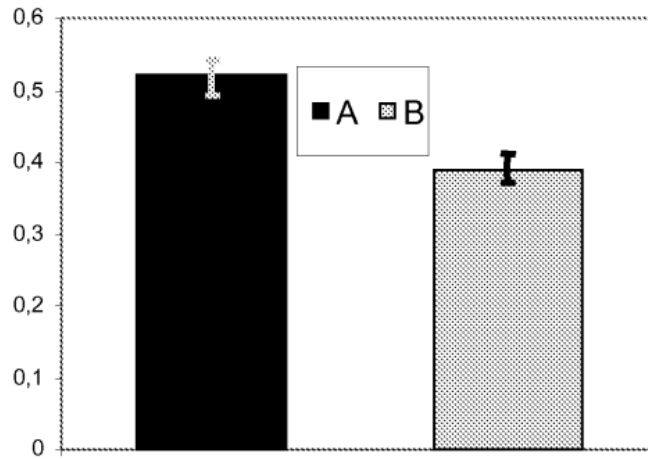


Fig. 12

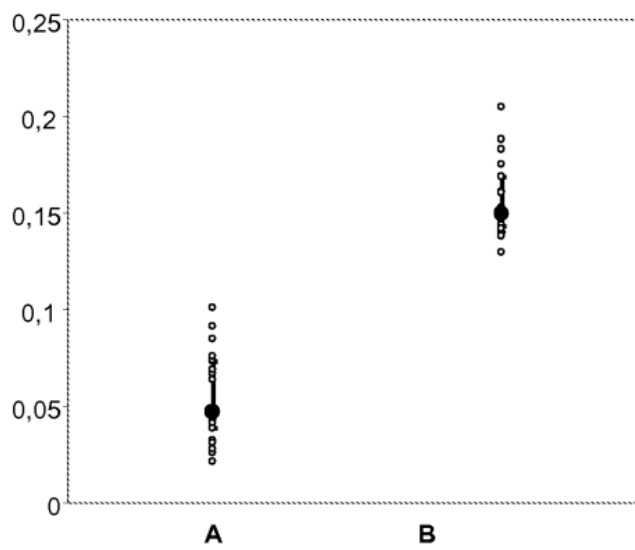


Fig. 13