

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
19 de enero de 2012 (19.01.2012)

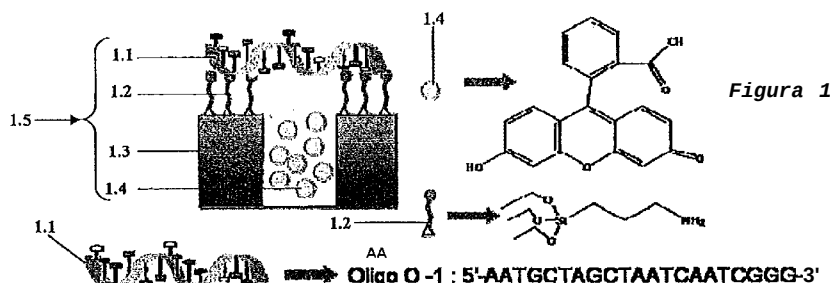
PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/007623 A2

- (51) **Clasificación Internacional de Patentes:** Sin clasificar
- (21) **Número de la solicitud internacional:** PCT/ES201 1/070507
- (22) **Fecha de presentación internacional:** 8 de julio de 2011 (08.07.2011)
- (25) **Idioma de presentación:** español
- (26) **Idioma de publicación:** español
- (30) **Datos relativos a la prioridad:** P201000900 12 de julio de 2010 (12.07.2010) ES
- (71) **Solicitante** (para todos los Estados designados salvo US): **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA** [ES/ES]; CTT - Edificio 11 y 12, Camino de Vera, s/n, E-46022 Valencia (ES).
- (72) **Inventores; e**
- (75) **Inventores/Solicitantes** (para US solamente): **CLIMENT TEROL, Estela** [ES/ES]; Universidad Politécnica de Valencia, CTT - Edificio 11 y 12, Camino de Vera, s/n, E-46022 Valencia (ES). **MARCOS MARTÍNEZ, María Dolores** [ES/ES]; Universidad Politécnica de Valencia, CTT - Edificio 11 y 12, Camino de Vera, s/n, E-46022 Valencia (ES). **MARTÍNEZ MAÑEZ, Ramón** [ES/ES]; Universidad Politécnica de Valencia, CTT - Edificio 11 y 12, Camino de Vera, s/n, E-46022 Valencia (ES). **SANCENON GALARZA, Félix** [ES/ES]; Universidad Politécnica de Valencia, CTT - Edificio 11 y 12, Camino de Vera, s/n, E-46022 Valencia (ES). **SOTO CAMINO, Juan** [ES/ES]; Universidad Politécnica de Valencia, CTT - Edificio 11 y 12, Camino de Vera, s/n, E-46022 Valencia (ES).
- (74) **Mandatario:** **UNGRIA LÓPEZ, Javier**; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).
- (81) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:**
- sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))

(54) **Title:** OLIGONUCLEOTIDE-ACTIVATED CONTROLLED-RELEASE SYSTEM

(54) **Título :** SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA ACTIVADO POR OLIGONUCLEÓTIDOS



(57) **Abstract:** The invention describes a novel system for the controlled release preferably of active substances or detection substances in response to the presence of oligonucleotides as specific stimulus. Furthermore, a preparation method for systems containing the above-mentioned controlled-release system has been developed, together with a method for the determination of specific nucleic acid sequences in aqueous solutions.

(57) **Resumen:** La invención describe un nuevo sistema para la liberación controlada, preferiblemente de sustancias activas o de detección, en respuesta a la presencia de oligonucleótidos como estímulo específico. Además se ha desarrollado una preparación de sistemas conteniendo el sistema de liberación controlada descrito anteriormente, junto con un método para la determinación de secuencias de ácidos nucleicos específicos en disoluciones acuosas.



WO 2012/007623 A2

**SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA ACTIVADO POR
OLIGONUCLEÓTIDOS**

DESCRIPCIÓN

OBJETO DE LA INVENCION

5 La presente describe un nuevo sistema para la liberación controlada, preferiblemente de sustancias activas, en respuesta a la presencia de oligonucleótidos como estímulo específico.

10 Además se ha desarrollado una preparación de una aplicación de éste sistema, su uso para la detección de oligonucleótidos y especies biológicas, entre otros, y una metodología para su utilización.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 En las últimas décadas el desarrollo de la química de coordinación y la química supramolecular ha dado lugar al nacimiento de nuevos conceptos relacionados con el diseño de dispositivos a escala nanométrica que permitan liberar sustancias químicas de forma controlada. El control de la liberación de ciertas sustancias es muy importante, ya que
20 cuando se pretende liberar sustancias anticancerígenas, como el Taxol o la Doxorrubicina, se necesita que exista una liberación de esta sustancia únicamente en zonas localizadas, en este caso con células tumorales. La respuesta a eventos que ocurren en sistemas biológicos, de
25 forma que estos sean autorregulados, ha sido explorada en el desarrollo de materiales de liberación controlada en respuesta a la relación glucosa/insulina o modificaciones de pH, o anticuerpos. Sin embargo, hasta el momento, el uso de la hibridación de ADN o ARN con sus complementarios no
30 ha sido explorado como estímulo para procesos de liberación controlada.

35 Ciertos sistemas de liberación actuales tienen lugar mediante una simple dispersión, mientras que el mecanismo de otros sistemas, tales como la biodegradación de soportes poliméricos requieren disolventes orgánicos durante el

proceso de cargado, lo cual puede afectar a la estructura de la sustancia encapsulada.

Entre el uso de otros tipos de soportes, como microcápsulas (M. Hamidi, et al., Adv. Drug Delivery Rev. 2008, 17, 1638;), micelas (C.W. Pouton, et al., Adv. Drug Delivery Rev. 2008, 17, 625;), vesículas (C. J. F. Rijcken et al., Controlled Release 2007, 120, 131;), o liposomas (T. L. Andresen, et al., Prog. Lipid Res. 2005, 44, 69), el empleo de soportes mesoporosos inorgánicos ha sido en comparación poco empleado. Estos soportes pueden ser sintetizados en una amplia variedad de morfologías con un tamaño de poro definido, y presentan una elevada superficie específica. Entre los diferentes óxidos que se pueden utilizar como soporte, destacan por su uso las sílices porosas del tipo MCM-41, HMS, MSU-n, MSU-V, FSM-16, KSW-2, SBA-n (n= 1, 2, 3, 8, 11-16) UVM-7, UVM-8, M-UVM-7 o M-UVM-8. Éstas se caracterizan por tener un tamaño de partícula comprendido entre 1-100 μm y una superficie específica de 200-1100 m^2/g .

La modificación química de este tipo de materiales permite desarrollar sistemas de liberación controlada más sofisticados, ya que se pueden diseñar válvulas moleculares que contengan en su interior sustancias químicas que pueden ser transportadas a un sitio específico del organismo y ser liberadas de forma controlada mediante estímulos externos (Descalzo AB, et al., Angew. Chem Int. Ed 2006, 45, 5924-48; y Ariga K, et al., Chem Rev 2007, 251, 2562-91;) o provocados a nivel celular. Recientemente se han descrito algunos materiales funcionalizados con puertas moleculares mediante el empleo de estructuras sólidas nanoscópicas organizadas (mesoporosos del tipo MCM-41) en las que se han anclado moléculas orgánicas funcionales en su superficie externa. De esta manera se han descrito materiales funcionalizados con puertas moleculares cuyos ciclos de apertura/cierre están controlados por la presencia de ciertos aniones, cambios en el pH del medio, temperatura,

reacciones redox y la irradiación con luz (Casasús, R. Et al., J. Am. Chem. Soc , 2008, 130, 1903-1917; Angelos, S. Et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2008, 47, 2222-2226; Fu, Q. Et al., Adv Mater. 2003, 15, 1262; Trewyn, B.G. Et al., 5 Acc. Chem. Res, 2007, 40, 846-853; Radu, D.R. et al., J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 13216-13217; Slowing, I.I. et al., Adv Funct. Mater., 2007, 17, 1225-1236; Liu, N. et al., Nano Lett., 2004, 4, 551-554; Vivero-Escoto, J. L. et al., J. Am. Chem. Soc, 2009, 131, 3462-3463 y Aznar, E. Et 10 al., J. Am. Chem, Soc, 2009, 131, 6833-6843). Adicionalmente, hay muy pocos materiales híbridos con puertas moleculares que muestren una liberación selectiva en presencia de bio-moléculas , pero en ningún caso ha sido descrito un sistema parecido en el que el estímulo sea la 15 presencia de un oligonucleótido (ADN o ARN) . Así, muy recientemente, se han descrito tres ejemplos de materiales silíceos cuya carga es liberada en presencia de una enzima que es capaz de hidrolizar determinados enlaces en las moléculas orgánicas que actúan como puerta (Patel, K. et 20 al., J. Am. Chem. Soc, 2008, 130, 2382-2383; Schlossbauer , A. et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2009, 48, 3092-3095 y Bernardo, A. et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2009, 48, 5884-5887), y un ejemplo en el cual se emplean anticuerpos que interaccionan con un hapteno anclado a la superficie del 25 material y que permiten la liberación de especies bioactivas en presencia del antígeno correspondiente, debido a que la afinidad del anticuerpo por el antígeno es mayor que por el hapteno anclado a la superficie del material híbrido diseñado (Climent, E. Et al., J. Am. Chem. 30 Soc, 2009, 131, 14075-14080).

De entre los sistemas patentados existentes, en las patentes descritas por J. Zink, F. Stoddart y colaboradores (WO 2009/094580 y WO 2009/097439) utilizan nanodispositivos para producir una liberación controlada empleando 35 reacciones de oxidación-reducción o cambios de pH como estímulos para el mecanismo de apertura/cierre, mientras

que en otros ejemplos, tales como los descritos por v. Lin y colaboradores en US2006/154069 o US2009/0252811 utilizan nanoparticulas de CdS o diferentes polímeros para recubrir el material sintetizado. Así, no existen demasiados
5 estímulos específicos descritos para producir nuevos sistemas de liberación controlada, siendo un campo que debido a sus potenciales aplicaciones es de gran interés.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La invención se encuentra dentro del campo del diseño
10 de sistemas de liberación controlada en respuesta a estímulos externos específicos. Debido a que el empleo de ácidos nucleicos no ha sido descrito como un estímulo específico en la liberación controlada de sustancias bio-activas, la presente invención combina el uso de
15 contenedores de sustancias activas con ácidos nucleicos para desarrollar un nuevo sistema de liberación controlada.

En esta invención, el sistema se basa en la modificación superficial del material que contiene la sustancia activa, el cual por interacción supramolecular
20 bloquea la salida de los poros del material mediante un oligonucleótido, inhibiendo su liberación. La interfase entre el soporte y el oligonucleótido se produce a través de un grupo coordinante unido al material contenedor por enlace covalente y por interacción supramolecular al
25 oligonucleótido. El sistema es activado al ponerlo en contacto con una disolución que contenga el ácido nucléico complementario, preferiblemente en condiciones ensayadas, para que se produzca una hibridación entre ambas cadenas de nucleótidos y de esa manera se abrirá el poro y se
30 producirá una salida de la sustancia activa del interior del nanodispositivo sólido.

Según el contenido del soporte, se puede aplicar la liberación del mismo para la detección de una hibridación del oligonucleótido que tapa los poros del soporte ó se
35 puede aplicar a la liberación controlada de una sustancia

activa biológica cuando haya una hibridación del oligonucleótido.

Otro objeto de la presente invención es el procedimiento para la preparación de sistemas conteniendo el sistema de liberación controlada descrito en los párrafos anteriores.

Además, es objeto de la presente invención el desarrollo de un método para la determinación de secuencias de ácidos nucleicos específicas en disoluciones acuosas.

Se considera incluidos en esta descripción por referencia los distintos modos particulares de llevar a cabo esta invención definidos por las reivindicaciones dependientes 2 a 14, 16 a 18, 20 a 23 y 25 a 27.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Se complementa la presente memoria descriptiva con planos, ilustrativos de un ejemplo preferente y nunca limitativo de la invención.

La Figura 1 muestra una realización preferente de la invención, indicando un conjunto de un nanodispositivo, en este caso del tipo MCM-41, cargado con fluoresceína y modificado superficialmente por reacción con aminopropiltrietaxisilano, que a su vez está unido a un oligonucleótido por interacciones supramoleculares.

La Figura 2 representa la reacción del oligonucleótido unido al nanodispositivo en presencia de su oligonucleótido completamente complementario, llevando a una hibridación más específica y dejando libre los poros del nanodispositivo, liberando la fluoresceína contenida del mismo.

La Figura 3 compara la reacción del oligonucleótido unido al nanodispositivo con varios oligonucleótidos, medido en la variación de la fluorescencia de la disolución medida a 516 nm (λ_{exc} 419 nm) según la cantidad de fluoresceína liberada tras la hibridación.

EXPOSICIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El primer objeto de la presente invención es un nuevo sistema de apertura activado por la presencia de oligonucleótidos específicos y que pueda ser aplicado en nuevos formatos de detección o en procesos de liberación controlada, dependiendo del contenido del soporte.

Este sistema se basa en el bloqueo de los poros del soporte mediante un oligonucleótido, conteniendo de esta forma la sustancia activa dentro del soporte. Para la activación de la liberación de la sustancia se produce en presencia de un segundo oligonucleótido activante y complementario a este primer oligonucleótido, fijado al soporte. Como la hibridación del segundo oligonucleótido con el primer oligonucleótido es una interacción más fuerte que la existente con el material contenedor de la sustancia activa, la hibridación desbloquea la salida de los poros liberando la sustancia dentro del soporte.

La interacción del primer oligonucleótido que se tiene que fijar al soporte, se produce con este mismo a través de interacciones supramoleculares, preferentemente electrostáticas con el material que contiene la sustancia a liberar.

Obtenemos mediante este sistema una innovadora aproximación para el desarrollo de sistemas de liberación controlada, que es además de gran selectividad dado que se basa en la hibridación de hebras complementarias de ADN ó ARN.

En una realización particular, el sistema se encuentra compuesto por:

- un soporte poroso con capacidad para contener la sustancia activa o el indicador;
- una capa interfaz entre el soporte poroso y el oligonucleótido que asegura su fijación en la superficie y
- el oligonucleótido complementario de aquél que se desea reconocer, el cual se encuentra adsorbido a la superficie por interacciones supramoleculares (tales como

interacciones electrostáticas) bloqueando la liberación de la sustancia activa.

El soporte puede estar formado por metales, semiconductores, polímeros orgánicos, carbones u óxidos, preferiblemente de diferentes especies inorgánicas, tales como el titanio, zirconio, silicio, magnesio o boro. Entre las sílices de elevada superficie específica que se pueden emplear como soporte, existe el tipo MCM-41, HMS, MSU-n, MSU-V, FSM-16, KSW-2, SBA-n (n=1, 2, 3, 8, 11-16) UVM-7, UVM-8, M-UVM-7 ó M-UVM-8, entre otros. Preferiblemente se ha usado el soporte MCM-41.

La capa interfaz se encuentra unida covalentemente al soporte y es capaz de dar interacciones supramoleculares, preferentemente electrostáticas, con el oligonucleótido.

La elección del soporte ha de realizarse teniendo en cuenta su compatibilidad con la sustancia activa a liberar y la posibilidad de modificación superficial con la capa de interfaz. La interacción entre esta capa y el oligonucleótido ha de ser lo suficientemente fuerte para evitar la separación del oligonucleótido bloqueante en ausencia del oligonucleótido activador y complementario al 100%, pero lo suficientemente débil en comparación con la hibridación entre los oligonucleótidos para que en presencia del activador se produzca la liberación. Así pues, es fundamental seleccionar la especie, topología y concentración superficial en la composición de la capa interfaz.

En relación con el oligonucleótido bloqueante, este puede ser una cadena de ADN ó ARN formada por entre 10 y 50 nucleótidos. En una realización particular, dichos nucleótidos pueden ir unidos de forma covalente a otras partículas inorgánicas, tales como nanopartículas de sulfuro de cadmio o nanopartículas magnéticas.

Los sistemas así desarrollados pueden formar parte de polímeros o andamios para, entre otras aplicaciones, regeneración tisular o diferenciación celular, dependiendo

de la sustancia activa biológica presente en el soporte y que es liberada tras la hibridación de los oligonucleótidos . Si el soporte comprende un indicador, colorante, sustancia fluorescente, o parecido, su liberación puede ser utilizada para la detección del oligonucleótido, tanto para su seguimiento como para su cuantificación .

En una realización preferente el soporte es de tipo óxido de silicio mesoporoso y la capa interfaz consiste en una capa de compuestos con carga positiva al pH de ensayo del sistema, tales como aminos o sales de guanidinio, y el oligonucleótido está formado por cadenas de ADN ó ARN de entre 15 y 30 nucleótidos.

El segundo aspecto de la invención hace referencia al procedimiento para la preparación de los sistemas de liberación controlada. Dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) Suspender en una disolución acuosa conteniendo el oligonucleótido un material poroso capaz de formar interacciones supramoleculares con oligonucleótidos ;
- b) Agitar entre 10 minutos y 3 horas preferentemente 30 minutos, la suspensión manteniendo simultáneamente la temperatura constante entre 15 y 50°C, preferentemente a 37°C;
- c) Eliminar la disolución, preferentemente mediante centrifugación durante 5 minutos a 5.000 rpm y
- d) Lavar con disolución acuosa.

Aunque se pueden utilizar diferentes medios como disolución acuosa, son preferidos los medios tamponados a pH fisiológico, en especial a pH 7.5 con una mezcla $MgCl_2$ 37.5 mM, Tris-HCl 20 mM.

En tercer lugar, la invención comprende el uso de los sistemas de liberación controlada anteriormente expuestos para la determinación de cadenas de oligonucleótidos - en el caso de que los materiales se hallen cargados con

indicadores, colorantes, sustancias fluorescentes o parecidos - o para la liberación controlada en respuesta a la presencia de oligonucleótidos en disolución para la liberación de otras sustancias activas (fármacos, biocidas, etc.) en medios celulares, o sistemas biológicos.

Finalmente se encuentra comprendido en la invención el procedimiento para la detección de oligonucleótidos que comprende las siguientes etapas:

a) Suspender en disolución acuosa el material con propiedades de liberación controlada;

b) Mezclar la disolución a ensayar que contiene el oligonucleotido con la disolución preparada en la etapa a) y

c) Medir la señal macroscópica producida en la etapa b) y opcionalmente cuantificar dicha señal por interpolación en una curva de calibrado. La señal producida dependerá del indicador presente en el soporte y liberado por la hibridación de los oligonucleótidos. Por ejemplo, se podría medir la absorbancia, la fluorescencia, etc.

Aunque se pueden utilizar diferentes medios como disolución acuosa, son preferidos los medios tamponados a pH fisiológico, en especial a pH 7.5 con una mezcla MgCl_2 37.5 mM, Tris-HCl 20 mM.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1

Obtención del soporte con el oligonucleotido específico absorbido (SI)

En una realización concreta de la invención se pesaron 5 mg de un soporte tipo MCM-41 cargado con fluoresceína y modificado superficialmente con aminopropiltriethoxisilano (concentración de aminas determinada por análisis termogravimétrico 1.98 mmoles/g SiO_2) y se suspendieron en 5 mL de una disolución tamponada a pH 7.5 (MgCl_2 37.5 mM, Tris-HCl 20 mM) y conteniendo el oligonucleotido 0-1 (5'-AATGCTAGCTAAT CAATCGGG-3') en una concentración de 20

nmol/g sólido y se dejó agitar a 37°C durante media hora. A continuación se centrifugó la suspensión durante 5 minutos a 5000 rpm y se separó la disolución, lavando el sólido con 5 mL de la disolución tamponada. Esta suspensión se separó
5 nuevamente por centrifugación, obteniendo así el conjunto SI.

En la figura 1 se muestra un esquema de este conjunto SI obtenido, donde el 1.1 es el primer oligonucleótido 0-1, indicado en detalle en la parte inferior de la figura; 1.2
10 es la cadena de aminopropilsilano generada por la reacción del aminopropilatrietoxisilano con la superficie del soporte, indicado en detalle en la parte inferior a la derecha; 1.3 es el soporte MCM-41; 1.4 es la fluoresceína contenida en los poros del soporte, indicado en detalle en
15 la parte superior a la derecha; y 1.5 indica el conjunto SI.

Para la caracterización y cuantificación del conjunto SI se utilizó un oligonucleótido 0-1' (5'-AATGCTAGCTAATCAATCGGG-Cy5-3'), marcado con Cy5 en el
20 extremo 3', unido al soporte mediante el mecanismo anteriormente descrito. La cuantificación se realizó mediante el cálculo de la fluorescencia de la disolución después de producirse el anclado al sólido, teniendo un contenido de 17 nanomoles/g sólido.

25 **Ejemplo 2**

Comportamiento del conjunto SI en presencia del oligonucleótido complementario y oligonucleótidos similares.

En una realización concreta de la invención se suspendieron 5 mg del conjunto SI descrito anteriormente en
30 5 mL de la disolución tamponada a pH 7.5 (MgCl₂ 37.5 mM, Tris-HCl 20 mM). De esta suspensión se pipetearon 100 µL y se añadieron 300 µL de la disolución tamponada conteniendo el oligonucleótido 0-2 (5'-CCCGATTGATTAGCTAGCATT-3') en
35 concentración 15 nmol/g sólido, el cual es complementario

al 100% con el oligonucleótido 0-1 unido al soporte. En la Figura 2 se ilustra el funcionamiento de la hibridación del oligonucleótido 0-1 unido al soporte en presencia del oligonucleótido 0-2 100% complementario. Al hibridarse las dos hebras de los que comprenden los oligonucleótidos, se destapa el poro del soporte y se libera la sustancia que estaba contenida en el mismo. Se han utilizado las mismas indicaciones numéricas para los mismos componentes comprendidos en la Figura 1 y se ha añadido 2.1 que indica el oligonucleótido 0-2, complementario al 100% con el oligonucleótido 0-1; 2.2 es la hebra que forman los oligonucleótidos 0-1 y 0-2 después de su hibridación, destapando el poro del soporte 1.3, dejando el aminopropiltriethoxysilano 1.2 anclado al soporte y liberando la fluoresceína 1.4 contenida en los poros del soporte 1.3.

Esta experiencia se repitió en presencia del oligonucleótido 0-3 (5' - CCCGATTGATTCTCTAGCATT-3'), con dos bases diferentes respecto al oligonucleótido 0-2 en posición central, ó en presencia del oligonucleótido 0-4 (5'-CCCGATTGATTGGCTAGCATT-3', con solo una base diferente respecto al oligonucleótido 0-2 en posición central) en la misma concentración, ó en ausencia de cualquier nucleótido.

Se midió la intensidad de la fluorescencia durante un total de 180 minutos. Los resultados se ilustran en la Figura 3, donde a) representa la fluorescencia medida añadiendo el oligonucleótido 0-2; b) representa la fluorescencia medida añadiendo el oligonucleótido 0-3; c) representa la fluorescencia medida añadiendo el oligonucleótido 0-4 y d) representa la fluorescencia medida en ausencia de cualquier nucleótido, pero si añadiendo el resto de los componentes de la mezcla. Se observa una ligera liberación del contenido de los poros incluso cuando no hay ningún nucleótido presente, por lo que puede haber una pequeña e insignificante degradación de la unión del oligonucleótido 0-1 con el soporte. La liberación del

-12-

5 contenido de los poros es luego mucho menor al añadir el oligonucleótido 0-4 con respecto a la liberación con la presencia del oligonucleótido 0-3. La respuesta más eficaz se observa añadiendo el oligonucleótido 0-2, indicando la especificidad del oligonucleótido 0-1 para hibridar con su pareja complementaria al completo y a un nivel significativamente menor con oligonucleótidos que se difieren en una u dos bases.

10 Todas estas realizaciones no son limitativas y presentan ejemplos de las posibilidades de la invención.

REIVINDICACIONES

1.- Un sistema de liberación controlada **caracterizado por que** la activación de la liberación se produce por la hibridación de un oligonucleótido unido a y tapando poros de un soporte, activando la liberación de una sustancia contenida en los poros del soporte.

2.- Un sistema de liberación controlada según la reivindicación 1 **caracterizado por que** el oligonucleótido unido a y tapando poros de un soporte se encuentra unido a la superficie del soporte mediante interacciones supramoleculares .

3.- Un sistema de liberación controlada según la reivindicación 2 **caracterizado por que** la unión entre el oligonucleótido y la superficie del soporte se debe a fuerzas electrostáticas.

4.- Un sistema de liberación controlada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado por que** la unión entre el oligonucleótido y el soporte es lo suficientemente fuerte para unir un oligonucleótido a la superficie del soporte, bloqueando los poros del soporte y lo suficiente débil para que pueda hibridar el oligonucleótido unido al soporte con el oligonucleótido complementario .

5.- Un sistema de liberación controlada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 **caracterizado por que** el sistema comprende un soporte poroso con capacidad para contener una sustancia activa o un indicador, un oligonucleótido bloqueante de los poros del soporte y una capa interfaz entre el soporte poroso y el oligonucleótido que asegura la fijación entre estos elementos.

6.- Un sistema de liberación controlada según la reivindicación 5, **caracterizado por que** el soporte poroso está compuesto por metales, semiconductores, polímeros orgánicos, carbones u óxidos de especies tales como el

silicio, aluminio, titanio, zirconio, magnesio o boro, entre otros.

7.- Un sistema de liberación controlada según la reivindicación 6, **caracterizado por que** el soporte poroso es una sílice de elevada superficie específica.

8.- Un sistema de liberación controlada según la reivindicación 7, **caracterizado por que** el soporte poroso es una sílice tipo MCM-41, HMS, MSU-n MSU-V, FSM-16, KSW-2, SBA-n (n = 1, 2, 3, 8, 11-16) UVM-7, UVM-8, M-UVM-7 o M-UVM-8, entre otros.

9.- Un sistema de liberación controlada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 **caracterizado por que** el oligonucleótido bloqueante de los poros del soporte es una cadena de ADN o ARN formada por entre 10 y 50 nucleótidos.

10.- Un sistema de liberación controlada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 **caracterizado por que** el oligonucleótido bloqueante de los poros del soporte es complementario a un oligonucleótido a ser detectado.

11.- Un sistema de liberación controlada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 **caracterizado por que** el oligonucleótido bloqueante de los poros del soporte puede ir unido de forma covalente a otras partículas inorgánicas, tales como nanopartículas de sulfuro de cadmio o nanopartículas magnéticas.

12.- Un sistema de liberación controlada, según la reivindicación 5, **caracterizado por que** la capa interfaz está compuesta por compuestos con carga positiva covalentemente unidos a la superficie del soporte poroso.

13.- Un sistema de liberación controlada según la reivindicación 12, **caracterizado por que** los compuestos con carga positiva comprendidos en la capa interfaz son aminas, sales de amonio o sales de guanidinio.

14. - Un sistema de liberación controlada, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, **caracterizado por que** comprende además un polímero o andamio.

5 15. - Procedimiento de preparación de un sistema de liberación controlada según las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado por que** comprende :

a) Suspender en una disolución acuosa conteniendo el oligonucleótido un material poroso capaz de formar interacciones supramoleculares con oligonucleótidos;

10 b) Agitar entre 10 minutos y 3 horas, la suspensión manteniendo simultáneamente la temperatura constante entre 15 y 50°C;

c) Eliminar la disolución y

d) Lavar con disolución acuosa.

15 16.- Procedimiento según la reivindicación 15, **caracterizado por que** la disolución se agita durante 30 minutos y se mantiene la suspensión a una temperatura constante de 37°C en el paso b) y se elimina la disolución mediante centrifugación durante 5 minutos a 5000 rpm en el
20 paso c) .

17. - Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16 **caracterizado por que** la disolución acuosa está tamponada.

25 18. - Procedimiento según la reivindicación 17, **caracterizado por que** la disolución acuosa tamponada tiene un pH de 7.5 y comprende una mezcla de MgCl_2 37.5 mM y Tris-HCl 20 mM.

30 19. - Uso de un sistema de liberación controlada descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la detección de oligonucleótidos, especies biológicas o restos de especies biológicas, entre otros.

20. - Uso de un sistema de liberación controlada descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la liberación de sustancias activas en disolución.

21. - Uso de un sistema de liberación controlada según la reivindicación 20, donde la disolución acuosa es un medio celular o biológico.

5 22. - Uso de un sistema de liberación controlada según cualquiera de las reivindicaciones 20 ó 21, donde la sustancia a liberar tiene actividad.

23. - Uso de un sistema de liberación controlada según la reivindicación 22 donde la sustancia a liberar es un fármaco, un biocida, un aroma, o parecido.

10 24.- Procedimiento de uso del sistema de liberación controlada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23, **caracterizado por que** comprende:

15 a) Suspender el material con propiedades de liberación controlada según las reivindicaciones 1 a 14 en disolución acuosa;

b) B) Mezclar la disolución a ensayar que contiene el oligonucleótido con la disolución preparada en la etapa a) y

20 c) Medir la señal macroscópica producida en la etapa b)

25 25. Procedimiento según la reivindicación 24, **caracterizado por que** además se cuantifica la señal macroscópica producida en la etapa b) por interpolación en una curva de calibrado.

26.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 24 ó 25, **caracterizado por que** la disolución acuosa está tamponada.

30 27.- Procedimiento según la reivindicación 17 a 26 **caracterizado por que** la disolución acuosa tamponada tiene un pH de 7.5 y comprende una mezcla de MgCl_2 37.5 mM y Tris-HCl 20 mM.

1/2

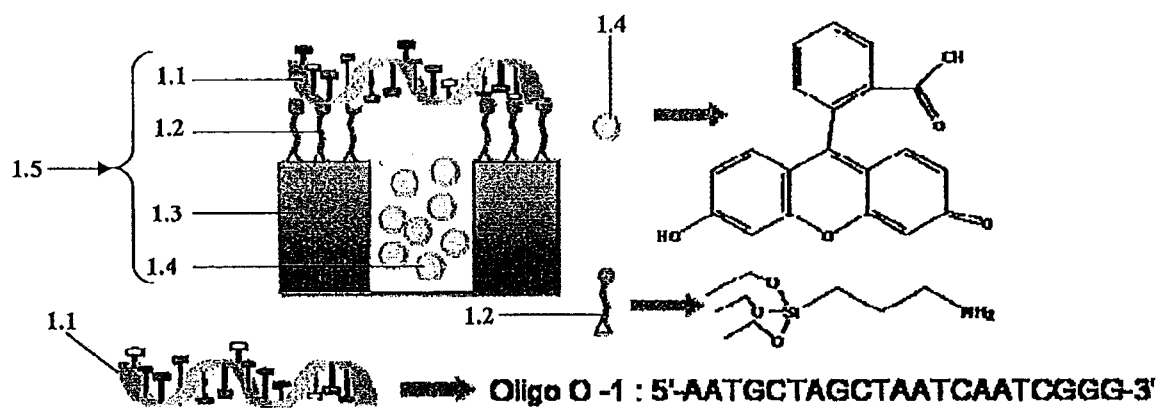


Figura 1

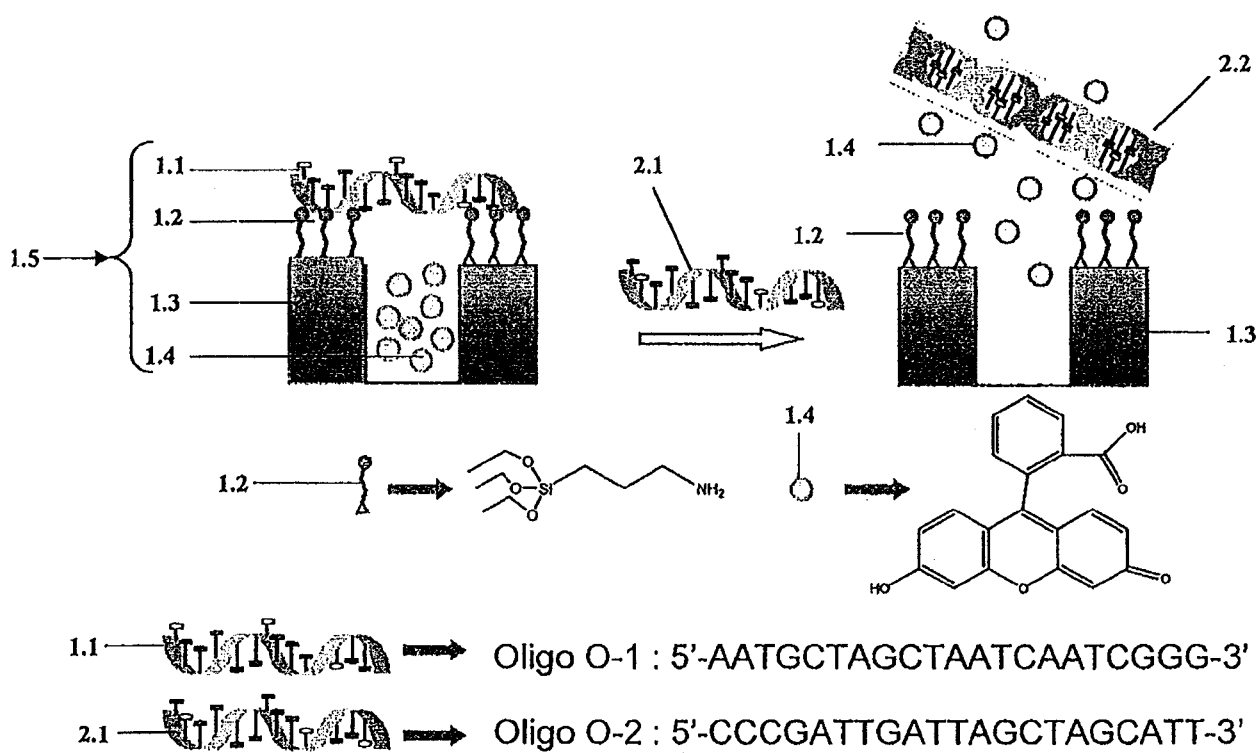


Figura 2

2/2

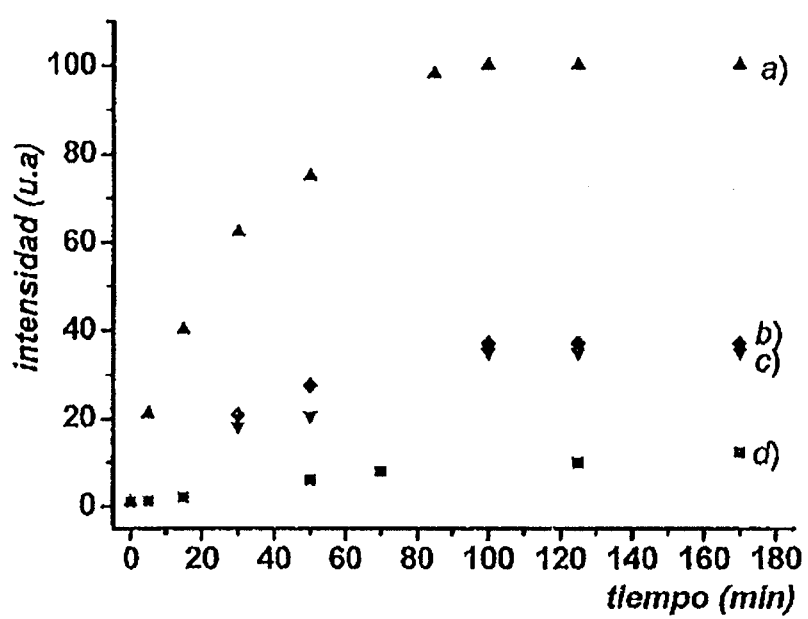


Figura 3