



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 147**

51 Int. Cl.:
G01N 33/53 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Número de solicitud europea: **00932451 .8**
86 Fecha de presentación : **15.05.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1214594**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.06.2002**

54 Título: **Inmovilización reversible de ligandos sobre superficies metálicas, su preparación y empleo en aplicaciones bioquímicas.**

30 Prioridad: **14.05.1999 US 134110 P**

73 Titular/es: **Iris BioTechnologies, Inc.**
Suite 320, 5201 Great American Parkway
Santa Clara, California 95054, US

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

72 Inventor/es: **Ramirez-Vick, Jamie, E.**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Inmovilización reversible de ligandos sobre superficies metálicas, su preparación y empleo en aplicaciones bioquímicas.

Antecedentes de la invención

a) **Ámbito de la invención**

Esta invención se refiere a la inmovilización de ligandos sobre superficies sólidas y su empleo en hibridación, purificación, inmunoensayos, biosensores, y otras aplicaciones bioquímicas.

b) **Descripción de las técnicas afines**

En la hibridación, purificación, inmunoensayos y muchas otras aplicaciones bioquímicas, se emplean extensamente, soportes sólidos para la inmovilización de ligandos tales como nucleótidos, proteínas, enzimas y células.

La patente U.S. nº 5.622.826, publicada el 22 de Abril de 1997 describe un método mediante el cual se inmovilizan oligonucleótidos marcados con amino sobre vidrio, empleando un empalme de isocianato, particularmente el diisocianato de 1,3-fenileno. Este método presenta la limitación de que el diisocianato de 1,3-fenileno es reactivo tanto para los grupos hidroxilo como para los grupos tiol, con lo cual disminuye espectacularmente la especificidad de la molécula. Además, el diisocianato de 1,3-fenileno es una molécula pequeña no flexible, que une el ligando íntimamente con la superficie.

Cohen *et al.* (*Nucleic Acids Res.*, **1997**, 25(4), 911-912) describe un método para la inmovilización de oligonucleótidos sobre vidrio empleando la química del triéster de fosfito para la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida. Las moléculas de triéster de fosfito unen múltiples grupos hidroxilo sobre la superficie del vidrio y el grupo fosfato en el extremo 5' del nucleótido. Aunque este método proporciona una unión covalente estable con la superficie, tiene la limitación de una ligazón íntima con la superficie, con lo cual disminuye la exposición del ligando, así como la de ocupar tres grupos hidroxilo por ligando con lo que disminuye la densidad de superficie del ligando.

Los alquilsiloxanos son una de las clases de moléculas más ampliamente empleadas para activar las superficies de vidrio con grupos funcionales (Weetall, H. H., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **1993**, 41, 157-188). Estas moléculas forman monocapas autoensambladas (SAM) cuando el grupo reactivo siloxano se condensa con grupos hidroxilo de la superficie y siloxanos próximos para formar una red de uniones cruzadas (Mrksich, M., and Whitesides, G.M., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1996**, 25, 55-78).

En la patente U.S. nº 5.837.860 publicada el 17 de Noviembre de 1998, Anderson y Rogers describen un método de inmovilización de ácidos nucleicos aislados u oligonucleótidos marcados con grupos sulfhidrilo terminales o disulfuro funcionales. En primer lugar, se inmovilizan moléculas de mercaptosilano sobre un vidrio o una superficie sólida de poliestireno con la cual los nucleótidos marcados forman un enlace disulfuro covalente, empleando mercaptoetanol o ditiotreitól como agentes reductores.

En la patente U.S. nº 5.760.130 publicada el 2 de Junio de 1998, Johnston y Trounstein describen un método para la inmovilización del ADN empleando aminoalquilsilanos. Una vez los aminoalquilsilanos están inmovilizados sobre la superficie de vidrio, una solución de carbodiimida en un tampón de imidazol forma un compuesto intermedio que reacciona con el grupo fosfato del extremo 5' del ADN. Lom, B., *et al.*, *J. Neurosci. Meth.*, **1993**, 50, 385-397, empleó alquilsiloxanos con una mezcla de funcionalidades amino y alcano para unir proteínas, interactuando con sus grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. Otros han empleado alquilsiloxanos funcionalizados con yodo, cloruro de bencilo y epóxido para interactuar con los grupos amino y tiol de los anticuerpos (Pope, N.M., *et al.*, *Bioconj. Chem.*, **1993**, 4(2), 166-171). Maskos y Southern (*Nucleic Acids Res.*, **1992**, 20(7), 1679-1684) emplearon epoxi alquilsilanos y derivados de etilenglicol para inmovilizar los nucleótidos para la síntesis en fase sólida. Los epoxi alquilsilanos sirven como espaciadores, mientras que los derivados de etilenglicol proporcionan grupos hidroxilo que son oxidados para reaccionar con el grupo fosfato del extremo 5' del nucleótido.

Los aminoalquilsiloxanos han sido también empleados para inmovilizar el ADN en sentido longitudinal sobre superficies de vidrio (Yokota *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **1997**, 25(5), 1064-1070). El mecanismo por el cual la superficie aminada se une al ADN no está clara, pero se piensa que es debida a interacciones electrostáticas. Esta interacción está lejos de ser específica puesto que estas superficies aminadas tienen la capacidad de unir cualquier secuencia de nucleótidos. También en este caso, la fuerza de la interacción es débil, puesto que, después de la unión, el ADN se endereza al pulverizar el líquido sobre la superficie de vidrio.

Un problema con el empleo de los alquilsiloxanos es que no forman necesariamente capas SAM como se pensó originalmente (Vandenberg *et al.*, *J. Colloid Inter. Sci.*, **1991**, 147(1), 103-118). En lugar de una estructura ordenada, bien definida, se pueden formar agregados sobre la superficie, con lo cual disminuye la capacidad de unión de la superficie. La estructura que los alquilsiloxanos forman sobre la superficie del vidrio depende en gran manera de las condiciones de reacción.

Otro método para la unión del ADN en sentido longitudinal (o por lo menos en varios puntos a lo largo de su longitud) sobre una superficie de vidrio, consiste en emplear poli-L-lisina (Schena *et al.*, *Science*, **1995**, 270, 467-470, y Shalon *et al.*, *Genome Res.*, **1996**, 6, 639-645). Al igual que con el empleo de los aminoalquilsiloxanos, esta interacción no es específica y por lo tanto es débil, dando como resultado una pérdida de ligando cuando es necesario efectuar pasos de lavado restrictivos.

La interacción de iones metálicos con aminoácidos específicos sobre la superficie de proteínas fue empleada primeramente por Porath *et al.*, (*Nature*, **1975**, 258, 598-607) en cromatografía para separar proteínas del suero empleando iones metálicos inmovilizados mediante imidoacetato. Después de éste, la mayor parte de estudios de unión empleando iones metálicos han confiado en los iones de metales de transición (p. ej., Cu(II), Ni(II), Fe(III) y Zn(II), los cuales interaccionan con los grupos indol e imidazol presentes en las proteínas.

En la patente U.S. n° 5.620.850, publicada el 15 de Abril de 1997, Bamdad *et al.* fijó un compuesto construido a base de un hidroxialquiltiol de cadena larga y un quelador de Ni(II), a una superficie de oro. El Ni(II) es un ión metálico de transición, el cual interacciona con grupos funcionales presentes en las proteínas.

Un trabajo de García y colaboradores demostró que los ácidos de metales blandos Ag(I) y Pt(II) pueden emplearse para inmovilizar proteínas y oligonucleótidos. Se demostró que los iones de plata inmovilizados proporcionan una serie de afinidad única en la separación cromatográfica de los aminoácidos (García, A.A., *et al.*, *Reactive Polymers* ("Polímeros reactivos") **1994**, 23, 249-259) y una preferencia de la BSA marcada con biotina sobre los iones de sentido contrario sin marcar (García, A.A., *et al.*, *Ind. Eng. Chem Res.*, **1996**, 35(4), 1097-1106). Así, se demostró que un nucleótido marcado con biotina (b-dUTP) es retenido mediante las interacciones de afinidad, mientras que el dUTP no es retenido sobre una columna de iones plata inmovilizados cuando la concentración de cloruro de sodio excede de 0,001 M (Agarwal *et al.*, *Sep. Sci. Technol.* **1998**, 33(1), 1-18). Los iones de plata han sido también inmovilizados sobre partículas paramagnéticas coloidales con el fin de recuperar los oligonucleótidos marcados con biotina a partir de una población mixta (Ramírez-Vick, J.E., y García, A.A., *Reactive and Functional Polymers* ("Polímeros reactivos y funcionales"), **1998**, 35, 123-132).

El empleo de iones metálicos blandos como grupos de anclaje, se confirmó cuando la proteína clatrina se inmovilizó sobre una superficie de oro mediante el empleo de dodecanotioles activados por el éster de NHS (Wagner *et al.*, *FEBS Letters*, **1994**, 356, 267-271).

En la patente U.S. n° 5.622.826 publicada el 22 de Abril de 1997, Varma describe un método para emplear placas de platino como superficie sólida para la inmovilización de oligonucleótidos marcados con amino, empleando el diisocianato de 1,4-fenileno. Esta molécula carece de la flexibilidad necesaria para ser capaz de unirse al ligando marcado con una alta densidad de superficie a la vez que proporciona la necesaria disponibilidad para unirse con la máxima cantidad posible de biomolécula receptora.

El objeto de la presente invención es el de proporcionar un método perfeccionado para la inmovilización de ligandos marcados sobre superficies sólidas. Varios problemas que vienen durando muchos años, en hibridación, purificación, inmunoensayos, biosensores y otras aplicaciones bioquímicas se resuelven mediante esta invención.

Resumen de la invención

Esta invención proporciona un soporte sólido para la unión de un ligando, que tiene una superficie sólida de un metal blando y un espaciador heterobifuncional química o físicamente absorbido a la superficie sólida del metal blando por medio de una unión metal blando-base blanda. De preferencia la superficie sólida de metal blando, es de plata, cobre, oro, platino (II), mercurio, mercurio(II), talio, cadmio(II), platino(IV) o paladio(II). El espaciador heterobifuncional es de preferencia un hidrocarburo de cadena larga desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 40 átomos de carbono, el cual tiene por lo menos un grupo de anclaje de base blanda, y por lo menos un grupo nucleótido de unión. La base blanda se selecciona entre la biotinamida y el yodoacetilo. Opcionalmente, se fija previamente un oligonucleótido al espaciador.

Esta invención proporciona también métodos para la preparación de una superficie sólida de ligación-unión, mediante la selección de una superficie sólida de un metal blando e inmovilizando un espaciador heterobifuncional sobre dicha superficie sólida mediante una unión metal blando-base blanda.

Se proporcionan también, sistemas de análisis que tienen superficies sólidas de metal blando y un espaciador heterobifuncional químico o fisioadsorbido a dicha superficie sólida de metal blando por medio de una unión metal blando-base blanda como son, métodos para la detección de la presencia de una molécula biológica, por exposición de una muestra que contiene las moléculas biológicas a una superficie como se ha definido más arriba.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el proceso básico de activación de una superficie de metal blando con el fin de inmovilizar oligonucleótidos marcados con amino.

La figura 2 muestra el proceso básico de activación de una superficie de metal blando con el fin de inmovilizar anticuerpos marcados con amino.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

A no ser que se indique otra cosa, los términos definidos a continuación tienen los siguientes significados:

“Grupo de anclaje” se refiere a un grupo químico funcional que contiene la base blanda que adsorbe el espaciador a la superficie del metal blando.

“Densidad de unión” se refiere al número de grupos terminales reactivos por unidad de área de superficie disponible para la unión del biopolímero marcado.

“Biopolímero” se refiere a moléculas biológicas tales como proteínas, oligonucleótidos, ADN, etc., los cuales son la base de hibridación, purificación, inmunoensayos, y muchas otras aplicaciones bioquímicas.

“Hibridación” se refiere a la reacción de unión entre socios complementarios de moléculas biopolímeras.

“Ligando” se refiere a un miembro del par de unión ligando/receptor, como por ejemplo, oligonucleótidos, ADN, y proteínas.

“Interacción no específica” se refiere a las interacciones individuales físico-químicas (es decir, uniones hidrógeno, uniones iónicas, interacciones hidrofóbicas, y fuerzas de van der Waals) en las que la estructura no está implicada.

“Proteína” se refiere a enzimas, anticuerpos y cualesquiera otros polipéptidos.

“Bases blandas” se refiere a las especies definidas por tener una carga pequeña y un tamaño grande, las cuales se unen de preferencia con metales blandos.

“Metales blandos” se refiere a las especies definidas por tener una carga pequeña y un tamaño grande, las cuales se unen de preferencia con bases blandas.

“Brazo espaciador” se refiere a la molécula que ayuda a que el ligando inmovilizado sea lo bastante flexible para que sea accesible al receptor. Este es habitualmente un hidrocarburo de cadena larga, que contiene opcionalmente heteroátomos, y que tiene por lo menos dos grupos funcionales.

“Interacciones específicas” se refiere al conjunto global de un particular juego de interacciones fisicoquímicas en donde la estructura puede jugar un papel importante. Estas interacciones incluyen enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones hidrofóbicas, y fuerzas de van der Waals.

“Obstáculo estérico” se refiere al efecto causado por grupos grandes que se hallan cerca del ligando, los cuales limitan su accesibilidad a la molécula receptora.

II. Inmovilización de moléculas sobre superficies de metales blandos

Esta invención se refiere a la inmovilización de ligandos marcados, sobre superficies sólidas empleando la unión metal blando - base blanda. Esta invención proporciona procedimientos para el desarrollo de técnicas fiables para la inmovilización de moléculas sonda de biopolímeros biológicamente activos, obteniendo una alta sensibilidad y una alta selectividad y a bajo coste, mediante la reutilización de los elementos sensores.

El procedimiento general implica el empleo de sustratos que contienen capas finas de metal blando. A continuación, se añaden moléculas espaciadoras heterobifuncionales. El espaciador heterobifuncional es un hidrocarburo con una longitud de cadena de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 átomos de carbono, de preferencia aproximadamente 15 a aproximadamente 25 átomos de carbono, y tiene por lo menos dos grupos funcionales. De los dos grupos funcionales, uno es una base blanda que será absorbido en la superficie del metal blando. El otro grupo funcional del espaciador se selecciona para unir el grupo funcional a la marca del ligando. Opcionalmente, un oligonucleótido se fija previamente al espaciador antes de la absorción sobre la superficie del metal. Este procedimiento crea una superficie sólida activa con la capacidad de unir ligandos marcados, con una alta densidad y con una mínima unión no específica.

La estructura (grupo de anclaje - brazo espaciador - grupo reactivo terminal), proporciona una unión estable de anclaje a la superficie sólida, un brazo espaciador que da flexibilidad al ligando permitiendo que interactúe con su entorno de forma que minimiza cualquier obstáculo estérico, y un terminal reactivo que se une al ligando. Opcionalmente, un oligonucleótido puede servir como grupo terminal reactivo. La elección de los componentes individuales de esta estructura de inmovilización depende de la combinación que proporcione un mínimo de interacciones no específicas y obstáculos estéricos, y un máximo de densidad de uniones. El tipo de grupo de anclaje empleado proporcionará el soporte sólido con la funcionalidad apropiada para inmovilizar un brazo espaciador con un grupo terminal reactivo.

Esta estructura de inmovilización puede o bien construirse en fragmentos sobre el sustrato sólido o bien montarse previamente y absorberse como una unidad a la superficie.

La presente invención proporciona también métodos para la inmovilización de oligonucleótidos marcados con grupos amino sobre superficies de metales blandos activadas con un brazo espaciador heterobifuncional de biotina-éster de NHS.

La presente invención proporciona también métodos para la inmovilización de ADNc o ADN amplificado con una PCR marcado con grupos amino sobre superficies blandas de metal activadas con un brazo espaciador heterobifuncional de yodo-éster de NHS.

La presente invención proporciona también métodos para la inmovilización de proteínas sobre superficies metálicas blandas activadas con un brazo espaciador heterobifuncional sulfhidrilo-éster de NHS.

La presente invención proporciona también métodos para la recuperación de ligandos inmovilizados empleando moléculas competidoras que contienen azufre, para desplazar a los espaciadores heterobifuncionales. Debido a la alta solubilidad acuosa del tiodiglicol y su grupo funcional tioéter, puede lograrse una alta recuperación de la elución, empleando una solución concentrada de tiodiglicol. El sustrato puede a continuación volverse a emplear lavando con agua y etanol y a continuación calentando con un vacío parcial con el fin de eliminar el tiodiglicol relativamente volátil.

Las moléculas absorbidas están unidas a la superficie sólida por fuerzas de valencia similares en fuerza a las implicadas en enlaces covalentes. Sin embargo, a diferencia de las interacciones covalentes, existe un equilibrio dinámico en el cual las moléculas absorbidas pueden ser desorbidas sin que se rompa ningún enlace. La interacción entre los iones de metal blando y las bases blandas se describe cualitativamente por el principio de ácidos y bases duros y blandos ("Principle of Hard and Soft Acids and Bases (HSAB)") basado en la definición de Lewis de ácidos y bases (Pearson, R.G., *Chem. Brit* **1967**, 3, 103-107. Pearson, R.G., *J. Chem. Ed.* **1968**, 45, 581-587. Pearson, R. G., *J. Chem. Ed.* **1968**, 45, 643-648). Este principio enuncia simplemente que los ácidos duros prefieren coordinar con bases duras y los ácidos blandos con bases blandas. Define los ácidos duros como aquellos que son pequeños en tamaño, alta carga positiva, y no contienen pares de electrones sin compartir en su cubierta de valencias. Estas propiedades conducen a una alta electronegatividad y una baja polarizabilidad. Los ácidos blandos son grandes en tamaño, tienen una carga positiva baja, y contienen pares de electrones no compartidos (*p* ó *d*) en su cubierta de valencias. Esto conduce a una alta polarizabilidad y una baja electronegatividad. De esta forma, los ácidos blandos forman complejos estables con bases que son altamente polarizables. Mientras los ácidos duros, de los cuales el protón es típico, formarán normalmente complejos estables con bases de forma que la polarizabilidad juega solamente un papel menor. Así pues, los ácidos y bases pueden clasificarse de acuerdo con estas premisas en duros, blandos o intermedios (Tabla 1). Dado que las interacciones ácido/ base comprenden un número de diferentes propiedades, existe también más de una teoría que los describe. Estas teorías son las teorías del enlace iónico-covalente, del enlace π , y la teoría de correlación de electrones.

TABLA 1

CLASIFICACION DE ACIDOS Y BASES LEWIS		
Clase	Acidos	Bases ¹
Duro	H, Li, Na, K, Be ² ,	H ₂ O, OH ⁻ , F ⁻ , Cl ⁻ ,
	Mg ² , Ca ² , Sr ² , Fe ³	CH ₃ COO ⁻ , SO ₄ ²⁻ , NO ₃ ⁻ ,
		ROH, RO ⁻ , NH ₃ , RNH ₂
Intermedios	Cu ² , Zn ² , Ni ² , Fe ² ,	C ₆ H ₅ NH ₂ , C ₅ H ₅ N, N ₃ ⁻ ,
	Co ² , Pb ² , Sn ² , Sb ²	Br, NO ₂ ⁻ , SO ₃ ²⁻
Blando	Ag, Cu, Au, Pt ² ,	RSH, RS ⁻ , R ₂ S, CN ⁻ ,
	Hg, Hg ² , Tl, Cd ² ,	S ₂ O ₃ ²⁻ , I ⁻ , R ₃ P, (RO) ₃ P,
	Pt ⁴ , Pd ²	C ₂ H ₄ , C ₆ H ₆

¹R representa un grupo alquilo, p. ej., CH₃, C₂H₅, etc

La teoría del enlace iónico-covalente es la más antigua y la más obvia. Dicha teoría manifiesta que los ácidos duros interaccionan con las bases duras principalmente mediante fuerzas iónicas debido a su pequeño tamaño y alta carga. Los ácidos y bases blandos con su gran tamaño y pequeña carga no pueden formar un complejo estable a través de sus fuerzas iónicas. La teoría del enlace π manifiesta que los ácidos blandos (normalmente metales) con los electrones de la órbita d débilmente fijados pueden formar enlaces π con bases blandas que contienen órbitas d vacías. Finalmente la teoría de la correlación de electrones sugiere que las energías de dispersión de London o Van der Waals, entre átomos o grupos de la misma molécula pueden conducir a la estabilización de la molécula. Estas fuerzas son grandes en complejos formados por ácidos y bases blandos altamente polarizables, proporcionando así una estabilidad adicional.

Las varias metodologías mencionadas en la presente descripción son ya bien conocidas por los expertos en la especialidad. Estas metodologías pueden encontrarse en referencias estándar tales como: Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques* ("Técnicas de bioconjugados"), 1996, Academic Press, San Diego, California; Birren, B., *et al.*, *Genome Analysis: A Laboratory Manual* ("Análisis del genoma: un manual de laboratorio"), 1995, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

El primer paso en el procedimiento de inmovilización es la fabricación de una película fina de metal blando (aproximadamente 20 nm) sobre el sustrato elegido (p. ej., sílice fundida, vidrio de piedra caliza, cuarzo, silicio oxidado, etc.). Esto se hace por métodos ya conocidos tales como la evaporación mediante un haz de electrones.

Después de lavar y secar, el brazo espaciador heterobifuncional está absorbido. Varios tipos de espaciadores heterobifuncionales pueden adquirirse comercialmente o pueden encontrarse en la literatura protocolos para su síntesis. De los diferentes grupos funcionales del espaciador, por lo menos uno es una base blanda para unirse a la superficie del metal blando. Otro grupo funcional es reactivo frente a los ligandos o biomoléculas a inmovilizar. Todos estos grupos y reacciones químicas son ya conocidos por los expertos en la especialidad y algunos ejemplos se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

GRUPOS QUIMICOS REACTIVOS	
Grupo funcional	Grupo reactivo
Amino	Isotiocianatos
	Isocianatos
	Esteres de NHS
	Carbodiimidas
Tiol	Derivados haloacetilo
	Maleimidas
	Reductores disulfuro
Carboxilato	Carbonildiimidazol
	Carbodiimidas
Hidroxilo	Epóxidos
	Carbonildiimidazol
	Isocianatos
NHS representa N-hidroxisuccinimida	

Los grupos funcionales pueden depender del tipo de biomolécula a inmovilizar. Por ejemplo, todas las proteínas contienen un grupo amino en un extremo y un grupo carboxilato en el otro extremo, además de todos los otros grupos funcionales proporcionados por los aminoácidos específicos de la secuencia. En el caso de los oligonucleótidos éstos están habitualmente sintetizados un nucleótido cada vez. A causa de esto, puede añadirse en algún punto de la síntesis (normalmente al principio o al final), una marca a un nucleótido aislado con el grupo funcional deseado, marcando así el oligonucleótido resultante. Estos nucleótidos individuales pueden modificarse o bien químicamente o bien enzimáticamente con cualquier tipo de grupo funcional con el fin de proporcionar la marca deseada. Este marcado químico o enzimático puede extenderse a las moléculas de ADN, con la diferencia de que se modificarán todas las bases dentro de la molécula objetivo mediante la reacción de marcado. Si el resultado deseado es marcar la molécula de ADN solamente en un punto, el mejor método es la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando cebadores que ya han sido modificados con el grupo funcional deseado.

Después de inmovilizar la molécula diana deseada y de realizar la aplicación bioquímica deseada, la molécula puede recuperarse y la superficie puede ser regenerada. Esto puede hacerse mediante un procedimiento conocido como elución. Una modalidad muy corriente de elución de moléculas específicamente unidas es el empleo de moléculas competidoras, las cuales desplazan la molécula unida. Con el fin de escoger un desplazador adecuado, es importante tener en cuenta la naturaleza de la interacción específica. Los ligandos inmovilizados mediante interacciones metal blando/base blanda sobre películas finas de metal blando, pueden recuperarse mediante el empleo de moléculas competidoras que contengan azufre, las cuales desplazan los espaciadores heterobifuncionales. Por ejemplo, debido a la alta solubilidad acuosa del tiodiglicol y debido a su grupo funcional tioéter, puede lograrse una alta recuperación de la elución empleando una solución concentrada de tiodiglicol. El sustrato puede ser reutilizado a continuación.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar versiones específicas de la invención y no deben interpretarse como limitantes del ámbito de las reivindicaciones.

Ejemplo 1

Inmovilización de un oligonucleótido biotinilado sobre una superficie de platino

Se fabricaron chips de silicio con películas finas de platino mediante evaporación por un haz de electrones. Antes de emplear, estas superficies se limpiaron empleando una mezcla de solución de RBS 35 al 13% (Pierce) y etanol al 33% en agua desionizada. Los chips se lavaron en esta solución sumergiéndolos en un baño de ultrasonidos a 50°C durante 20 minutos. Esto fue seguido de un enjuagado tres veces en agua desionizada empleando un baño de ultrasonidos a 50°C durante 10 minutos. Después de enjuagados los chips se secaron en una corriente de nitrógeno o argón.

Para este ejemplo, el brazo espaciador heterobifuncional fue la succinimidil-6-(biotinamido)hexanoato. Esta molécula puede adquirirse comercialmente (Pierce Chemical Co.) o puede sintetizarse empleando la información que figura en la literatura (Staros, J.V., *Biochemistry*, **1982**, 21(17):3950-3955). Esta molécula es un derivado de la D-biotina que contiene un brazo espaciador de ácido 6-aminocaproico, aproximadamente de 30,5 Å de longitud, unido a la cadena lateral de ácido valérico de la biotina y terminando en un éster de NHS. Este éster de NHS reacciona con los grupos amina de las proteínas y otras moléculas para formar derivados estables del enlace amida. Las condiciones óptimas para la reacción son a pH 7-9. Los tampones que contienen amina tales como el Trizma, que puede competir en la reacción de acilación, deben ser evitados. Esta molécula del brazo del espaciador es insoluble en las condiciones acuosas de la reacción, y puede disolverse en disolventes orgánicos antes de la adición a la solución acuosa de reacción tamponada. Puede prepararse una solución de stock en uno cualquiera de los disolventes orgánicos N,N-dimetilformamida (DMF) o bien el sulfóxido de dimetilo (DMSO). La adición a la solución acuosa no debe exceder del 10% de disolvente orgánico para evitar la precipitación. El ratio molar entre la molécula del brazo espaciador y una proteína debe ser de 2-50:1, y más altos niveles dan como resultado la incorporación de mayores cantidades.

Los chips se sumergen a continuación en una solución de succinimidil-6-(biotinamido)hexanoato 2 mM en DMF ó etanol durante 12 horas a temperatura ambiente. Los chips se lavan a continuación tres veces en DMF y después se secan en una corriente de nitrógeno, empleándose inmediatamente para el paso de inmovilización.

Los chips activados se sumergen en una solución de 10 mg/ml del oligonucleótido marcado con amino en fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,15 M, a un pH de 7,2 durante 30-60 minutos a temperatura ambiente, o durante varias horas a 4°C. A continuación se lavan los chips tres veces en el tampón de fosfato y después se secan en una corriente de nitrógeno.

Ejemplo 2

Inmovilización de anticuerpos sobre una superficie de plata

Se fabricaron chips de silicio con una fina película de plata, mediante el método de evaporación de electrones. Antes de emplear estas superficies se limpiaron empleando una mezcla de solución al 13% de RBS 35 (Pierce) y etanol al 33% en agua desionizada. Los chips se lavaron en esta solución sumergiéndolos en un baño de ultrasonidos a 50°C durante 20 minutos. A continuación se enjuagaron tres veces en agua desionizada empleando un baño de ultrasonidos a 50°C durante 10 minutos. Después de enjuagar, los chips se secaron en una corriente de nitrógeno o argón.

El succinimidil-6-[6-(((yodoacetil)amino)-hexanoil)amino]hexanoato es un espaciador heterobifuncional que contiene un éster de NHS en un extremo separado por dos grupos aminohexanoato de un grupo yodoacetilo en el otro extremo. Esta molécula puede, o bien adquirirse comercialmente (Molecular Probes) o bien puede sintetizarse empleando la información que figura en la literatura (Brinkley, M., *Bioconjugate Chem*, **1992**, 3:2-18). El éster de NHS reacciona con aminas primarias en diferentes biomoléculas para formar enlaces amida estables. Incluso, aunque el grupo yodoacetilo sea altamente reactivo frente a los metales blandos, reacciona también con grupos sulfhidrilo formando una unión tioéter. Otro aspecto que concierne a los grupos yodoacetilo es que pueden ser degradados a yodo con la luz, reduciendo así su reactividad. Este reticulador es altamente hidrofóbico por lo que debe disolverse en un disolvente orgánico (DMSO ó DMF) antes de añadirse al tampón acuoso de reacción. Las conjugaciones que se efectúen con este reticulador deben evitar que los componentes del tampón contengan aminas (p. ej., tris, glicina o imidazol) o sulfhidrilos (p. ej., ditio-treitol, 2-mercaptoetanol, o cisteína), puesto que estos competirán con la reacción de reticulación deseada.

A continuación, los chips se sumergen en una solución que contiene succinimidil-6-[6-(((yodoacetil)amino)-hexanoil) amino]hexanoato 2 mM en DMSO durante 12 horas a temperatura ambiente. Los chips se lavan a continuación tres veces en DMSO y después se secan en una corriente de nitrógeno y se emplean inmediatamente para el paso de inmovilización.

Los chips activados se sumergen en una solución de 10 mg/ml del anticuerpo en borato de sodio 50 mM, EDTA 5 mM a un pH de 8,3 durante 30-60 minutos a temperatura ambiente, o durante varias horas a 4°C. A continuación se lavan los chips tres veces en el tampón de borato y después se secan en una corriente de nitrógeno.

Ejemplo 3

Recuperación de anticuerpos inmovilizados sobre una superficie de plata mediante el empleo del tiodiglicol como agente desplazador

Los anticuerpos inmovilizados mediante interacciones metal blando/base blanda sobre chips de silicio con una fina película de plata, pueden recuperarse mediante el empleo de moléculas competidoras que contengan azufre, para desplazar los espaciadores heterobifuncionales con una función yodo.

Con el fin de escoger un desplazador apropiado, es importante tomar en consideración la naturaleza de la interacción específica. En este caso, la interacción yodo-plata, según se ha descrito en el principio de HSAB, requiere una base blanda que pueda competir con la unión a la plata inmovilizada (un ácido blando). Puesto que en el espaciador figura el grupo yodo el cual confiere a esta molécula su naturaleza de base blanda, la estrategia consistió en buscar otras moléculas con un grupo funcional de base blanda.

El tiodiglicol es un perfecto candidato debido a su alta solubilidad acuosa y debido a su grupo funcional tioéter. Una alta recuperación de la elución puede lograrse mediante la inmersión del chip de plata con el anticuerpo inmovilizado del Ejemplo 2 en una solución 1 M de tiodiglicol en un baño de ultrasonidos durante 1 hora a temperatura ambiente. El sustrato puede emplearse de nuevo a continuación, lavándolo con una solución desionizada de agua/etanol (50:50) en un baño de ultrasonidos a 50°C durante 20 minutos, calentando después en una estufa durante 30 minutos a 100°C con un vacío parcial con el fin de eliminar el tiodiglicol relativamente volátil.

REIVINDICACIONES

1. Una superficie sólida de unión con ligandos, la cual comprende:

a) un soporte sólido de un metal blando, y

b) un espaciador heterobifuncional que tiene por lo menos dos grupos funcionales,

incluyendo dichos grupos funcionales una base blanda, siendo dicho espaciador químico o fisioadsorbido a dicho soporte sólido de metal blando mediante la unión a una base de metal blando,

en donde la base blanda se selecciona entre la biotin-amida y el yodoacetilo.

2. Una superficie sólida de la reivindicación 1, en la cual el soporte sólido de metal blando se selecciona de superficies recubiertas de plata, cobre, oro, platino (II), mercurio, mercurio (II), talio, cadmio (II), platino (IV) y paladio (II).

3. Una superficie sólida de la reivindicación 1, en la cual el espaciador heterobifuncional comprende un hidrocarburo con una longitud de cadena de aproximadamente 10 a 40 átomos de carbono.

4. Una superficie sólida de la reivindicación 1, en donde el espaciador heterobifuncional es el succinimidil-6-(biotinamido)hexanoato.

5. Una superficie sólida de la reivindicación 1, en donde el espaciador heterobifuncional es el succinimidil-6-[6-(((yodoacetil)amino)hexanoil)amino]hexanoato.

6. Un método para la preparación de una superficie sólida de unión con ligandos, que comprende

a) la selección de un soporte sólido de un metal blando; y

b) la inmovilización de un espaciador heterobifuncional sobre dicho soporte sólido mediante una unión metal blando-base blanda, teniendo dicho espaciador por lo menos dos grupos funcionales, incluyendo dichos grupos funcionales una base blanda, en donde la base blanda se selecciona entre la biotinamida y el yodoacetilo.

7. Un método de la reivindicación 6, en el cual el soporte sólido de metal blando se selecciona de superficies recubiertas de plata, cobre, oro, platino (II), mercurio, mercurio (II), talio, cadmio (II), platino (IV) y paladio (II).

8. Un método de la reivindicación 6, en el cual el espaciador heterobifuncional comprende un hidrocarburo de aproximadamente 10 a 40 átomos de longitud.

9. Un método de la reivindicación 6, en donde el espaciador heterobifuncional es el succinimidil-6-(biotinamido)hexanoato.

10. Un método de la reivindicación 6, en donde el espaciador heterobifuncional es el succinimidil-6-[6-(((yodoacetil)amino)hexanoil)amino]hexanoato.

11. Un sistema de ensayo que comprende una pluralidad de superficies de la reivindicación 1.

12. Un método para la detección de la presencia de una molécula biológica que comprende la exposición de una muestra que contiene moléculas biológicas a una superficie sólida de la reivindicación 1, en donde el espaciador heterobifuncional incluye un ligando para la unión a dichas moléculas biológicas.

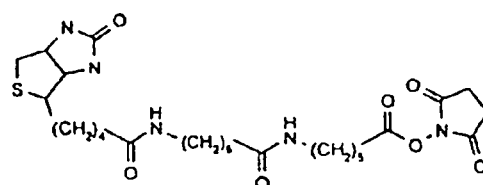
13. Un método para la recuperación de ligandos inmovilizados mediante un espaciador heterobifuncional que contiene yodo que está absorbido química o físicamente sobre un soporte que contiene plata mediante una unión metal blando-base blanda, el cual método comprende:

a) puesta en contacto de dicho soporte que contiene plata, con una solución de tiodiglicol, sobre el cual soporte se inmoviliza un ligando mediante un espaciador heterobifuncional que contiene yodo;

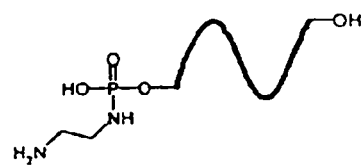
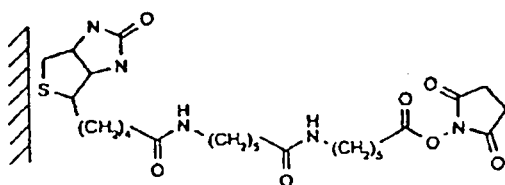
b) exponiendo dicho soporte que contiene plata en contacto con dicha solución de tiodiglicol a la energía ultrasónica; y

c) recuperando dichos ligandos de dicha solución de tiodiglicol.

Superficie de
metal blando



Succinimidil-6-(biotinamido)hexanoato



Oligonucleotido marcado con
fosforamidato

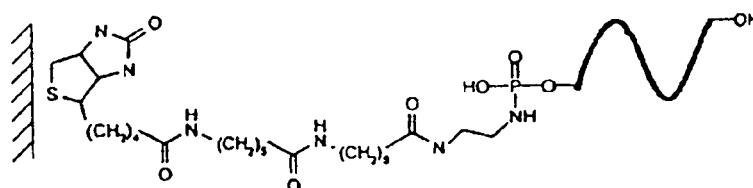
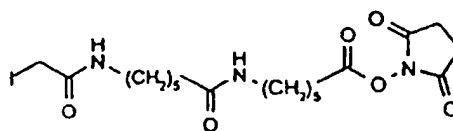
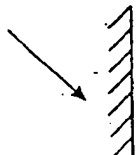
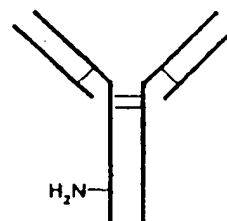
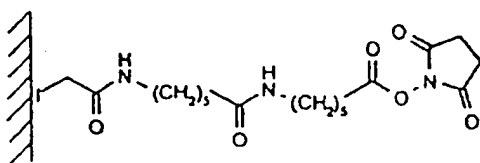


FIGURA 1

Superficie de
metal blando



Succinimidil 6-[6-(((yodoacetil)amino-hexanoil)amino)]hexanoato



Anticuerpo con grupos amino disponibles

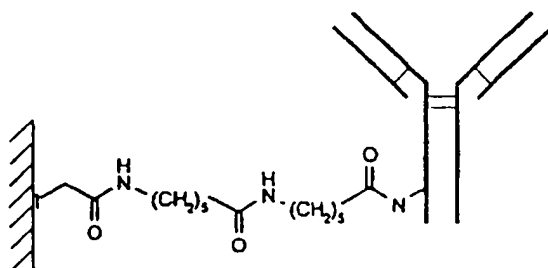


FIGURA 2