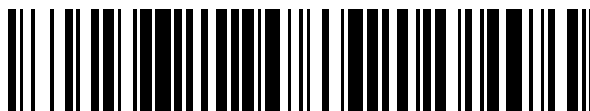


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 332**

51 Int. Cl.:
C07K 1/107 (2006.01)
C07K 17/02 (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07005917 .5**
96 Fecha de presentación: **19.07.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1870417**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.12.2007**

54 Título: **Procedimiento de ligación de aceptores de péptidos**

30 Prioridad:
27.07.1999 US 145834 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.06.2012

73 Titular/es:
**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
ROUTE 206 AND PROVINCE LINE ROAD
PRINCETON NJ 08543-4000, US**

72 Inventor/es:
**Kurz, Markus;
Lohse, Peter y
Wagner, Richard**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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).

ES 2 383 332 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de ligación de aceptores de péptidos

Antecedentes de la invención

En general, la presente invención se refiere a procedimientos de ligación, en particular, para unir aceptores de péptidos a ácidos nucleicos.

Actualmente existen procedimientos para la preparación de fusiones de ARN-proteína. Una fusión de ARN-proteína se crea uniendo un aceptor de péptidos al extremo 3' de una molécula de ARN, seguido de la traducción *in vitro* o *in situ* del ARN. El producto es un péptido unido al extremo 3' del ARN que lo codifica. La generación de estas fusiones de ARN-proteína facilita el aislamiento de proteínas con propiedades deseadas a partir de grandes conjuntos de secuencias de aminoácidos parcial o completamente aleatorias, y resuelve el problema de recuperar y amplificar la información de la secuencia de la proteína por unión covalente de la secuencia codificante de ARN a su molécula de proteína correspondiente.

En el documento WO98/31700 se describe el uso de la ADN ligasa de T4 para unir el aceptor de péptidos puromicina a ARN por medio de un "puente" de ADN. El documento WO98/31700 también describe la preparación de moldes de traducción mínimos que contienen puromicina 3' por unión de nucleótidos individuales a puromicina inmovilizada usando una síntesis de oligonucleótidos convencional basada en fosforamidoato.

Roberts y Szostak (PNAS 94:12297-12302, 1997) informan sobre la preparación de ARN sintéticos con puromicina 3' usando puromicina inmovilizada como soporte para la síntesis convencional de un engarce oligonucleotídico, y ligando la molécula de engarce de puromicina resultante a un ARN que codifica un polipéptido en tampón de ADN ligasa de T4.

En el documento WO98/155636 se describe un procedimiento para la preparación de productos de ligación químicos de ARN-ADN que comprenden puromicina 3' usando ARN ligasa de T4.

Tuniskaya y col. (FEBS Letters 442: 20-24, 1999) informan sobre estudios de interacción de proteína-ácido nucleico usando oligonucleótidos que contienen 2'-O-β-ribofuranosil-citidina que se oxidaron con IO_4^- para producir los dialdehídos correspondientes que permitían la unión covalente a la proteína investigada.

Pieles y col. (Nucleic Acids Research 17(22), 8967-77, 1989) describen la formación de enlaces covalentes entre un oligonucleótido que lleva psoraleno y la cadena de matriz complementaria por fotorreacción.

Misiura y col. (Nucleic Acids Res. 18(15): 4345-54, 1990) han descrito unidades de engarce de fosforamidoato no nucleosídicas para la incorporación directa de grupos indicadores durante la síntesis de oligonucleótidos.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para la unión de un aceptor de péptidos a una molécula de ARN, así como a los productos de ARN-aceptor de péptidos. Estos procedimientos facilitan la producción de fusiones de ARN-proteína que pueden usarse, por ejemplo, para el aislamiento de proteínas o ácidos nucleicos con propiedades deseadas a partir de grandes conjuntos de secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos parcial o completamente aleatorias. Este procedimiento de la invención puede realizarse por una diversidad de estrategias para fijar un aceptor de péptidos a una molécula de ácido nucleico. Estos diversos enfoques difieren entre sí en los tipos de enlaces formados por la unión del péptido al ácido nucleico, y en los reactivos usados para conseguir la unión.

En el presente documento se describe un procedimiento para fijar un aceptor de péptidos a una molécula de ARN que implica proporcionar una molécula de ARN que tiene una secuencia 3' que forma una estructura de horquilla, proporcionar un aceptor de péptidos unido covalentemente a una molécula de engarce de ácido nucleico, e hibridar la molécula de ARN con la molécula de engarce de ácido nucleico en condiciones que permiten que se produzca la formación de enlaces covalentes entre el aceptor de péptidos y la molécula de ARN.

También se describe en el presente documento un procedimiento para fijar un aceptor de péptidos a una molécula de ARN que implica proporcionar un aceptor de péptidos que tiene un engarce con una secuencia 5' que forma una horquilla, hibridar el aceptor de péptidos con la molécula de ARN, y unir covalentemente el aceptor de péptidos al ARN.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para fijar un aceptor de péptidos a una molécula de ARN ligando químicamente la molécula de ARN al aceptor de péptidos.

En una realización de este aspecto, el aceptor de péptidos está unido a un resto de psoraleno y forma enlaces cruzados con la molécula de ARN a través del resto de psoraleno. El resto de psoraleno puede estar unido al extremo 5' o 3' de una molécula de engarce que se une por sí misma al aceptor de péptidos, o el resto de psoraleno puede estar situado en una posición interna de la molécula de engarce. De acuerdo con esta técnica, el aceptor de péptidos forma enlaces cruzados con la molécula de ARN usando irradiación UV. En realizaciones adicionales de

este aspecto particular, el psoraleno está unido al aceptor de péptidos a través de una cadena alquilo C6 y/o la molécula de ARN contiene un codón de terminación colocado cerca de su extremo 3'. Preferentemente, el engarce tiene una longitud comprendida entre 25 y 40 unidades nucleotídicas. Además, antes del entrecruzamiento del aceptor de péptidos a la molécula de ARN, el ARN puede hibridar con un engarce que incluye además un resto fotoescindible. El ARN hibridado después puede inmovilizarse en un soporte sólido a través del resto fotoescindible. Preferentemente, el resto fotoescindible es biotina.

En otra realización del primer aspecto de la invención, la molécula de ARN está funcionalizada y se une a un péptido que se ha modificado de manera adecuada para permitir la formación de enlaces químicos entre el aceptor de péptidos y la molécula de ARN. Preferentemente, la molécula de ARN se funcionaliza mediante oxidación con IO_4^- . El aceptor de péptidos puede funcionalizarse por unión al aceptor de péptidos de una molécula elegida entre el grupo que consiste en aminas, hidrazinas, (tio)hidrazidas y (tio)semicarbazonas.

En otra realización más del primer aspecto de la invención, la ligación química se realiza en ausencia de un molde externo. Como alternativa, la reacción de ligación química puede realizarse en presencia de un molde externo. Este segundo procedimiento implica alinear la molécula de ARN y la parte de engarce de un aceptor de péptidos usando un molde, de tal forma que el extremo 5' del molde hibride con la parte de engarce del aceptor de péptidos y el extremo 3' del molde hibride con la molécula de ARN. La ligación química de una molécula de ARN a un aceptor de péptidos también puede realizarse en ausencia de un molde externo por hibridación de la propia molécula de engarce, que está unida covalentemente al aceptor de péptidos, a la molécula de ARN. Esta hibridación aproxima el aceptor de péptidos y la molécula de ARN para la ligación. Preferentemente, el grupo funcional está en el extremo 5' de la región de engarce del aceptor de péptidos, o está flanqueado por un dominio de hibridación por un lado y por el aceptor de péptidos por el otro lado.

En una realización adicional del primer aspecto de la invención, la ligación química del aceptor de péptidos a la molécula de ARN implica la unión de un grupo funcional a la molécula de ARN por medio de aminación reductora del ARN, seguida de la modificación del aceptor de péptidos para reaccionar con la molécula de ARN. Las dos moléculas después se unen mediante la formación de un enlace covalente. Preferentemente, el grupo funcional unido a la molécula de ARN es un tiol, maleimida o amina.

En otros aspectos, la invención se refiere a moléculas de ARN ligadas químicamente a aceptores de péptidos así como a las fusiones de ácido nucleico-proteína generadas por transcripción y traducción (y, si se desea, transcripción inversa y/o amplificación) de estas moléculas de ARN. En una realización, el aceptor de péptidos está ligado al extremo 3' de la molécula de ARN.

También se describen procedimientos para la selección de una proteína o ácido nucleico deseado usando las moléculas de ARN-aceptor de péptidos de la invención. Las técnicas de selección usan las moléculas de la presente invención para la formación de fusiones de ARN-proteína, y la posterior selección de proteínas o ácidos nucleicos de interés. Los procedimientos de selección pueden realizarse por cualquiera de los enfoques descritos, por ejemplo, en Szostak y col., documento WO 98/31700, y Szostak y col., U.S.S.N. 09/247.190, incorporados en el presente documento por referencia.

En un aspecto final, la invención se refiere a un procedimiento para generar una fusión de ARN-proteína. Este procedimiento implica proporcionar una molécula de ARN hibridada con un engarce, en la que el engarce contiene un resto fotoescindible, un resto de psoraleno y un aceptor de péptidos; inmovilizar el ARN en un soporte sólido en condiciones en las que el ARN no inmovilizado se retira sustancialmente del soporte; entrecruzar el aceptor de péptidos y el ARN a través del resto de psoraleno, con lo que este entrecruzamiento libera simultáneamente el ARN entrecruzado del soporte sólido; y traducir el ARN entrecruzado para formar una proteína de fusión de ARN. En una realización, el resto fotoescindible es biotina.

En todos los aspectos anteriores de la invención, la molécula de ARN puede incluir una secuencia de inicio de la traducción y un codón de iniciación unido operativamente a una secuencia codificante de proteína candidata. Además, un aceptor de péptidos preferido es puromicina, un análogo de nucleósido que se añade al extremo C de una cadena peptídica en crecimiento y termina la traducción. En una realización, el aceptor de péptidos incluye puromicina unida a un engarce, por ejemplo, un engarce nucleotídico. Este engarce facilita el alineamiento del aceptor de péptidos a la molécula de ARN para la unión. En una realización adicional, la región de engarce del aceptor de péptidos incluye restos no nucleotídicos, por ejemplo PEG. Otras posibles elecciones para aceptores incluyen estructuras de tipo ARNt en el extremo 3' del ARN, así como otros compuestos que actúan de una manera similar a la puromicina. Dichos compuestos incluyen, sin limitación, cualquier compuesto que posea un aminoácido unido a una adenina o a un compuesto de tipo adenina, tal como los aminoácidos-nucleótidos fenilalanil-adenosina (A-Phe), tirosil adenosina (A-Tyr) y alanil adenosina (A-Ala), así como estructuras unidas a amida, tales como fenilalanil 3' desoxi 3' amino adenosina, alanil 3' desoxi 3' amino adenosina y tirosil 3' desoxi 3' amino adenosina; en cualquiera de estos compuestos, puede usarse cualquiera de los L-aminoácidos naturales o sus análogos. Además, en la invención también puede usarse un conjugado de puromicina de estructura 3' similar al ARNt combinado.

En un diseño preferido de la invención, se incluye una secuencia de ADN entre el extremo del mensajero y el aceptor de péptidos. Esta secuencia está diseñada para hacer que el ribosoma se detenga al final de la fase de lectura abierta, proporcionando tiempo adicional para que el aceptor de péptidos (por ejemplo, puromicina) acepte la cadena peptídica naciente antes de la hidrólisis del enlace peptidil-ARNt. Durante la traducción *in vitro*, el ribosoma también puede detenerse en el sitio de ligación química, especialmente en un sitio de entrecruzamiento de psoraleno o en un oligotipo de ANP.

En otro diseño preferido de la invención, pueden usarse restos de engarce predominantemente no nucleotídicos en lugar de los engarces nucleotídicos unidos al aceptor de péptidos. Este diseño facilita la ligación de un aceptor de péptidos a una molécula de ADN. Por ejemplo, el engarce puede contener espaciadores de trietilenglicol. El engarce también puede contener 2'-OMe-ARN fosforamiditas. En algunos casos en los que la hibridación es un prerrequisito para la ligación química o enzimática, una parte suficiente del engarce próxima al sitio de ligación debe estar compuesta por ácidos nucleicos.

Además, el ARN o el engarce de la invención puede contener una secuencia (por ejemplo, una secuencia de poli(A)) para su uso en la purificación, por ejemplo, purificación de afinidad del ARN o una molécula de fusión de ARN-proteína formada a partir de dicho ARN o engarce.

Además, en todos los aspectos anteriores de la invención, la molécula de ARN fijada a un aceptor de péptidos puede traducirse *in vitro* o *in situ* para producir una molécula de fusión de ARN-proteína. La molécula de fusión de ARN-proteína después se incuba en presencia de una alta concentración de sal y/o se incuba a baja temperatura (por ejemplo, durante una noche a -20 °C) como se describe por Szostak y col. (09/247.190). La molécula de fusión de ARN-proteína también puede purificarse, por ejemplo, usando técnicas de purificación de poli(A) convencionales.

Como se usa en el presente documento, por "proteína" se entiende dos o más aminoácidos cualesquiera naturales o modificados unidos por uno o más enlaces peptídicos. "Proteína" y "péptido" se usan indistintamente.

Por "ARN" se entiende una secuencia de dos o más ribonucleótidos naturales o modificados unidos covalentemente. Un ejemplo de un ARN modificado incluido dentro de este término es el ARN de fosfortioato.

Por "secuencia de inicio de la traducción" se entiende cualquier secuencia capaz de proporcionar un sitio de entrada a un ribosoma funcional. En sistemas bacterianos, esta región algunas veces se denomina secuencia Shine-Dalgarno.

Por "codón de iniciación" se entiende tres bases que señalan el comienzo de una secuencia codificante de proteína. Por "codón de terminación" se entiende tres bases que señalan la terminación de una secuencia codificante de proteína. En general, los codones de iniciación son AUG (o ATG) y los codones de terminación son UAA (o TAA), UAG (o TAG), o UGA (o TGA); sin embargo, pueden sustituirse por cualquier otro triplete de bases que pueda usarse como codón de inicio o de terminación.

Por "unido covalentemente" se entiende unido directamente a través de un enlace covalente o indirectamente a través de otra secuencia unida covalentemente (por ejemplo, ADN que corresponde a un sitio de pausa).

Por "unido no covalentemente" se entiende unido por un medio distinto de un enlace covalente.

Por "estructura de horquilla" se entiende una región bicatenaria formada por una sola cadena de ácido nucleico. Preferentemente, dichas estructuras de horquilla tienen al menos 8 pares de bases de longitud, y más preferentemente, entre 8 y 15 pares de bases de longitud.

Por "ligación química" se entiende la unión de dos moléculas sin el uso de una enzima. La ligación química puede dar como resultado enlaces no covalentes así como covalentes.

Por "aceptor de péptidos" se entiende cualquier molécula que pueda añadirse al extremo C de una cadena de proteína en crecimiento por la actividad catalítica de la función peptidil transferasa ribosómica. Normalmente, dichas moléculas contienen (i) un resto nucleotídico o de tipo nucleotídico, por ejemplo adenosina o un análogo de adenosina (es aceptable la dimetilación en la posición N-6 amino), (ii) un aminoácido o resto similar a aminoácido, tal como cualquiera de los 20 D- o L-aminoácidos o cualquier análogo de aminoácido de los mismos, incluyendo O-metil tirosina o cualquiera de los análogos descritos por Ellman y col. (Meth. Enzymol. 202: 301, 1991), e (iii) un enlace entre los dos (por ejemplo, un enlace éster, amida o cetona en la posición 3' o, menos preferentemente, en la posición 2'). Preferentemente, este enlace no altera significativamente el fruncimiento del anillo a partir de la conformación del ribonucleótido natural. Los aceptores de péptidos también pueden poseer un nucleófilo, que puede ser, sin limitación, un grupo amino, un grupo hidroxilo o un grupo sulfhidrilo. Además, los aceptores de péptidos pueden estar compuestos de miméticos de nucleótidos, miméticos de aminoácidos o miméticos de la estructura combinada de nucleótido-aminoácido.

Por un "engarce" o "molécula de engarce" se entiende una secuencia que incluye desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o análogos de los mismos.

Por "funcionalizar" se entiende modificar de una manera que da como resultado la unión de un grupo o resto funcional. Por ejemplo, una molécula de ARN puede funcionalizarse mediante oxidación con IO_4^- o aminación, o un aceptor de péptidos puede funcionalizarse por unión de un grupo amina, hidrazina, (tio)hidrazida o (tio)semicarbazona.

- 5 Por "molde externo" se entiende una secuencia de ácido nucleico que se añade a la mezcla de reacción de ligación, pero que no forma parte del producto final de la reacción de ligación.

Por "alto contenido de sal" se entiende una concentración de catión monovalente de al menos 200 mM y, preferentemente, al menos 500 mM o incluso 1 M, y/o una concentración de catión divalente o de valencia superior de al menos 25 mM, preferentemente al menos 50 mM y más preferentemente al menos 100 mM.

- 10 Por "secuencia de purificación de afinidad" se entiende una secuencia de nucleótidos que se usa en la purificación de un ácido nucleico o una molécula de fusión de ácido nucleico-proteína. Por ejemplo, una secuencia de purificación de afinidad puede ser una secuencia de poli(A), tal como A_{8-20} , que puede usarse para la purificación de moléculas de ácido nucleico o de fusión sobre oligo-dT celulosa. Una secuencia de purificación de afinidad también puede ser una secuencia polipeptídica que se usa para purificar una molécula de fusión de ácido nucleico-proteína.
- 15 Szostak y col., U.S.S.N. 09/247.190, describen otras técnicas de purificación a modo de ejemplo.

La presente invención proporciona varias ventajas. Por ejemplo, los procedimientos descritos en el presente documento facilitan la ligación eficaz de aceptores de péptidos a moléculas de ARN, en algunos aspectos, sin la necesidad de un molde externo para juntar el ARN y el aceptor de péptidos. La invención también reduce el coste asociado con la generación de una fusión de ARN-proteína.

- 20 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes por la siguiente descripción detallada, y por las reivindicaciones.

Descripción detallada

En primer lugar se describirán brevemente los dibujos.

Breve descripción de los dibujos

- 25 La FIGURA 1 es una representación esquemática de etapas a modo de ejemplo implicadas en la ligación de un engarce de aceptor de péptidos a un ARN usando ADN ligasa de T4 en un molde de horquilla. La secuencia 3' de ARN o el engarce de aceptor de péptidos está diseñado para formar una estructura de horquilla, y el engarce de aceptor de péptidos hibrida con el ARN, aproximando de esta manera el ARN y el aceptor de péptidos entre sí.
- 30 La FIGURA 2 es una representación esquemática de etapas a modo de ejemplo implicadas en la ligación de un engarce de aceptor de péptidos a un ARN usando desoxinucleotidil transferasa terminal.
- La FIGURA 3A es una representación esquemática de etapas a modo de ejemplo implicadas en la modificación 3' de un ARN a través de la formación de hidrazida y semicarbazona.
- 35 La FIGURA 3B es una representación esquemática de etapas a modo de ejemplo implicadas en la modificación 3' de un ARN mediante aminación reductora.
- Las FIGURAS 4A-4D son una serie de diagramas que muestran estrategias a modo de ejemplo para la ligación química de un engarce de puromicina funcionalizado a un ARN funcionalizado. Una estrategia es independiente de molde (Figura 4A). Otras estrategias implican el uso de moldes de oligo externos para alinear el ARN y el engarce de puromicina. En las estrategias que implican moldes de oligo externos, el
- 40 molde de oligo puede hibridar tanto con el ARN como con el engarce de puromicina (Figura 4B), o unirse al engarce de puromicina e hibridar con el ARN (Figura 4D). Además, el grupo funcional puede estar en el extremo 5' del engarce de puromicina (Figuras 4B y 4C) o interno al engarce de puromicina (Figura 4D).
- La FIGURA 5 es una representación esquemática de etapas a modo de ejemplo implicadas en la síntesis de una carbohidrazida fosforamidita completamente protegida para su uso en un engarce de puromicina modificado.
- 45 La FIGURA 6 es una representación esquemática de etapas a modo de ejemplo implicadas en la ligación de un engarce de aceptor de péptidos a un ARN por unión de un grupo funcional al extremo 3' del ARN seguido de ligación química. El grupo funcional después puede reaccionar con una molécula de engarce modificada convenientemente para unir covalentemente el ARN y el engarce de puromicina, a través de un
- 50 grupo tiol (A), maleimida (B) o amina (C).
- Las FIGURAS 7A-7C son una serie de representaciones esquemáticas de etapas a modo de ejemplo implicadas en la ligación de un aceptor de péptidos a un ARN usando fotoentrecruzamiento. En este procedimiento general, un resto de psoraleno unido al engarce de puromicina entrecruza el engarce de puromicina con el ARN tras la exposición a irradiación UV. El resto de psoraleno puede estar en el extremo
- 55 5' del engarce de puromicina (Figura 7A), interno al engarce de puromicina (Figura 7B) o en el extremo 3' del engarce de puromicina (Figura 7C).
- La FIGURA 7D es una representación esquemática de ARNm usados para la formación de fotoentrecruzamientos.

La FIGURA 7E es una representación esquemática de un dúplex formado entre la secuencia 3' constante del ARNm (región constante de los ARNm de la Figura 7D) y el fotoengarce que muestra el supuesto sitio de intercalación de psoraleno. También se muestra la estructura del psoraleno, que se unió a través de una cadena alquilo C6 al fosfato 5' del engarce. Las variables x e y determinan el número de nucleótidos dA y unidades de trietilenglicol (TEG) en el engarce, respectivamente. La autorradiografía de la izquierda representa el análisis electroforético en gel de la reacción de fotoentrecruzamiento entre el ARNm 1 y el engarce B.

La FIGURA 7F es una imagen de un gel que ilustra la traducción *in vitro* y la formación de fusión. La síntesis de proteínas a partir del molde 2 y el molde 3 de ARNm se muestra en los carriles 1 y 3, respectivamente. La traducción de moldes de ARNm fotoentrecruzados con el engarce B produjo fusiones de ARNm-proteína (carriles 2 y 4). El molde 3 lleva un codón de terminación después del sitio de entrecruzamiento del engarce. El carril 5 muestra el producto de fusión después de la purificación en oligo-dT celulosa. Encima de la imagen del gel se proporciona una representación esquemática de la formación de fusión usando una molécula de ARNm que contiene un codón de terminación.

La FIGURA 7G es una imagen de un gel que ilustra la dependencia de la producción de moléculas de fusión de ARNm-proteína de la composición del engarce y de la concentración de sal.

La FIGURA 7H es una representación esquemática de las etapas implicadas en la ligación del ARNm a engarces hibridados basados en biotina fotoescindibles y su posterior formación de fusión.

La FIGURA 8A es una representación esquemática de la unión de un engarce de puromicina a un ARN mediante la formación de tríplex de (ANP)₂-ARN. El engarce de puromicina se une a dos moléculas de ANP que se unen a un ARN formando una triple hélice a través de enlaces no covalentes fuertes.

La FIGURA 8B es una representación esquemática de etapas implicadas en la síntesis de conjugados de ANP-engarce. El engarce se une a un soporte sólido y se modifica para unirse al ANP. El ANP después se acopla al engarce deseado, y la molécula de engarce de ANP se desprotege y separa del soporte sólido.

En el presente documento se describen diversos procedimientos para unir un aceptor de péptidos a una molécula de ARN. El ARN puede generarse por cualquier enfoque convencional, que incluye síntesis celular normal, técnicas recombinantes y síntesis química, e incluye, sin limitación, ARN celular, bibliotecas de ARNm y bibliotecas de ARN sintéticas aleatorias. El aceptor de péptidos (por ejemplo, puromicina) normalmente se une a un engarce de ADN o ARN. Dichas moléculas aceptoras de péptidos pueden generarse por cualquier técnica convencional, por ejemplo, la técnica descrita en Roberts y Szostak (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 12297, 1997), Szostak y col. (documento WO 98/31700), y Szostak y col., U.S.S.N. 09/247.190. A continuación se describen con detalle técnicas para realizar cada procedimiento de la invención, usando ejemplos particulares y ejemplos de referencia. Estos ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención, y no deben considerarse limitantes.

Ejemplo de Referencia 1: Procedimientos de Ligación Enzimática en los que está Implicada la ADN Ligasa de T4 en un Molde de Horquilla

En un enfoque particular, se usa la ADN ligasa de T4 para unir un aceptor de péptidos a una molécula de ARN usando un molde que contiene horquilla, por ejemplo, como se muestra en la Figura 1. La reacción de ligación se realiza de una manera de autohibridación y no usa un puente de oligo. La secuencia 3' de ARN o el extremo 5' de la región de engarce del aceptor de péptidos están diseñados para formar una estructura de horquilla. La colocación próxima del extremo 5' de la región de engarce del aceptor de péptidos y el extremo 3' del ARN en el contexto de una estructura de horquilla facilita la ligación enzimática con la ADN ligasa de T4, como se describe, por ejemplo, en Sambrook, Fritsch, y Maniatis. *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. La relación de los reactivos es de aproximadamente 1:1, aunque es aceptable un ligero exceso (1:1,2) de cualquier reactivo. Las condiciones de ligación óptimas pueden variar ligeramente de una reacción a otra y pueden determinarse experimentalmente usando técnicas conocidas para el experto en la materia.

Ejemplo de Referencia 2: Procedimientos de Ligación Enzimática en los que está Implicada la Transferasa Terminal

Otro procedimiento enzimático para la unión de un aceptor de péptidos a una molécula de ARN implica la modificación del extremo 3' del ARN seguida de ligación usando desoxinucleotidil transferasa terminal, por ejemplo, como se muestra en la Figura 2. La reacción de TdT se realiza como se describe en general en Sambrook, Fritsch, y Maniatis (*supra*). Esta enzima extiende el extremo 3' de ácidos nucleicos con desoxi- (o didesoxi-)nucleótido trifosfatos. Estos (d/dd)NTP pueden modificarse químicamente en sus restos de base para realizar las estructuras de engarce deseadas (como se describe, por ejemplo, en Meyer, *Methods in Molecular Biology*, Agrawal, ed., vol 26, Totowa: Humana Press, 1994, páginas 73-91; Kumar y col., *Anal. Biochem.* 169: 376, 1988, Riley y col., *DNA* 5: 333, 1986; y Schmitz y col., *Anal. Biochem.* 192: 222, 1991). Como se muestra en la Figura 2, la molécula de engarce debe iniciar con un (d/dd)NTP. El resto de la composición de engarce, sin embargo, puede variar. Una característica especial de este procedimiento de ligación de transferasa terminal es que la región de engarce de ADN del aceptor de péptidos puede ser tan corta como de una unidad de (d/dd)NTP.

Ejemplo 1: Procedimientos de Ligación Química que Implican Funcionalización del Extremo 3' de un ARN a través de Oxidación con IO_4^- Seguida de Ligación Química

De acuerdo con los procedimientos de la invención, un aceptor de péptidos también puede unirse a una molécula de ARN mediante funcionalización del extremo 3' del ARN a través de oxidación con IO_4^- , seguido de ligación química del aceptor de péptidos al ARN, como se muestra en la Figura 3A. La oxidación con IO_4^- se realiza como se describe más adelante y de acuerdo con los procedimientos de Agrawal (Methods in Molecular Biology, Agrawal, ed., vol 26, Totowa: Humana Press, 1994, páginas 93-120), Proudnikov y Mirzabekov, Nucleic Acids Res. 24: 4535, 1996; Gosh y col., Anal. Biochem. 178: 43, 1989; Bauman y col., J. Histochem. Bauman y col., J. Histochem. Cytochem. 29: 227, 1981; y Wu y col., Nucleic Acids Res. 24: 3472, 1996). Como la etapa de oxidación con IO_4^- requiere estrictamente un 1,2-diol para la reacción, sólo se modifica el nucleótido terminal, dejando sin afectar los restos internos de la molécula de ARN. El dialdehído resultante puede someterse a una reacción adicional con diversos nucleófilos tales como aminas, hidrazinas, carbo(tio)hidrazidas o (tio)semicarbazidas, produciendo estructuras similares a bases de Schiff. Estas reacciones se realizan como se describe, por ejemplo, en Agrawal (*supra*), Proudnikov y Mirzabekov (*supra*), Gosh y col. (*supra*), Bauman y col. (*supra*), y Wu y col. (*supra*). Aunque las (tio)hidrazidas y (tio)semicarbazonas obtenidas después de la reacción con carbo(tio)hidrazidas y (tio)semicarbazidas, respectivamente, son bastante estables, los aductos iniciales que contienen aminas o hidrazinas normalmente requieren una etapa de reducción posterior, tal como aminación reductora, como se muestra en la Figura 3B y como se describe en Agrawal (*supra*), Proudnikov y Mirzabekov (*supra*), Gosh y col. (*supra*), Bauman y col. (*supra*) y Wu y col. (*supra*), para hacer que los enlaces recién formados sean estables frente a la hidrólisis.

Las reacciones de acoplamiento descritas anteriormente pueden realizarse usando varias estrategias diferentes, como se muestra en las Figuras 4A-4D. Por ejemplo, la ligación puede realizarse de una manera independiente de molde externo como se muestra en la Figura 4A. Esta estrategia requiere un gran exceso de aceptor de péptidos modificado (por ejemplo, un exceso de 100 a 1000 veces) para conseguir una ligación satisfactoria a la molécula de ARN. Para aumentar la eficacia de la ligación del ARN, puede usarse oligos de molde externos para el alineamiento del sustrato como se muestra en la Figura 4B. Preferentemente, dichos oligos, que son de secuencia complementaria a las secuencias de ARN y de engarce de aceptor de péptidos, son de al menos aproximadamente diez nucleótidos de longitud. Normalmente, este oligo incluirá al menos aproximadamente diez nucleótidos que son complementarios a la molécula de ARN y aproximadamente 10 nucleótidos que son complementarios al engarce de aceptor de péptidos. Como alternativa, los sitios reactivos pueden aproximarse por hibridación directa del engarce y dominios de ARN como se muestra en las Figuras 4C-4D. En este caso, el grado de hibridación de secuencias es de al menos diez a quince nucleótidos.

Pueden usarse varias construcciones diferentes para la unión de aceptores de péptidos al ARN mediante la formación de entrecruzamientos. Por ejemplo, un tipo de construcción a modo de ejemplo incluye un aceptor de péptidos unido a un engarce que lleva una modificación en su extremo 5' como se muestra en las Figuras 4A-4C. Una construcción alternativa puede comprender un grupo funcional interno flanqueado por un dominio de hibridación en un lado y una parte de engarce de puromicina en el otro (Figura 4D).

La síntesis de estos engarces modificados implica la síntesis de ADN automática convencional usando fosforamiditas disponibles en el mercado (Glen Research, Sterling, VA) para ensamblar el cuerpo principal de nucleótidos o restos espaciadores. La puromicina 3' puede introducirse mediante el uso de puromicina-CPG (Glen Research, Sterling, VA) como un soporte sólido para la síntesis. La unión de los grupos funcionales reactivos puede conseguirse usando reactivos disponibles en el mercado tales como modificadores del extremo amino (Glen Research, Sterling, VA) o modificadores de amino Uni-link (Clontech, Palo Alto, CA). Otros grupos funcionales pueden incorporarse usando fosforamiditas apropiadas. En la Figura 5 se describe un procedimiento a modo de ejemplo para generar una carbohidrazida fosforamidita. Se generó una carbohidrazida fosforamidita combinando una lactona con hidrazina y metanol y poniendo los reactivos a reflujo durante 2 horas para producir un resto de carbohidrazida. El rendimiento de esta etapa de síntesis fue del 97 %. El producto resultante después se hizo reaccionar con la sal de un grupo dimetoxitritilo y piridina/tolueno a temperatura ambiente durante 2,5 horas para producir un resto de carbohidrazida protegido. El rendimiento de producto para esta etapa fue del 88 %. Este producto se hizo reaccionar adicionalmente con un resto de fosforamidita en presencia de tetrahidrofurano y diisopropilamina a temperatura ambiente durante 30 minutos, que produjo (72 %) un producto de reacción de una carbohidrazida fosforamidita completamente protegida.

Además, la reactividad del aceptor de péptidos hacia el ARN oxidado con IO_4^- puede aumentarse adicionalmente mediante la introducción de múltiples copias de grupos reactivos.

Se realizó una reacción de ligación a modo de ejemplo como se indica a continuación. Un nmol de ARN, que consistía en un transcrito que codificaba un epítipo Flag y un marcador de estreptomicina, de la secuencia: 5' G GGA CAA UUA CUA UUU ACA AUU ACA AUG GAC UAC AAG GAC GAU GAC GAU AAG GGC GGC UGG UCC CAC CCC CAG UUC GAG AAG GCA UCC GCU (SEC ID N°: 1) se combinó con 20 μl de NaOAc 500 mM (pH 5,2) y 10 μl de NaIO_4 5 mM y se llevó a un volumen final de 100 μl con agua. La mezcla de reacción se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 10 μl de Na_2SO_3 10 mM y la mezcla de reacción se incubó de nuevo durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron cuarenta μl de tampón fosfato 1 M (pH 8,0), 1,5 nmol del engarce de aceptor de péptidos Uni-A1/8, que tiene la secuencia: 5' X CGC GGA TGC AAA AAA

AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA CCPu (SEC ID N°: 2) (en la que X es un modificador de amino Uni-link [Clontech] y Pu es Puomicina-CPG [Glen Research]) y 20 µl de NaCNBH₃ a la mezcla de reacción. La mezcla después se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente, se precipitó, se purificó en un gel de TBE al 6 %-Urea y se sometió al procedimiento de elución en bandas de gel (Crush-Soak) durante una noche para obtener la molécula de fusión de ARN-proteína. Esta reacción produjo 230 pmol de producto.

Ejemplo 4: Procedimientos de Ligación Química que Implican la Unión de Grupos Funcionales al Extremo 3' de una Molécula de ARN Seguido de Ligación Química

Un aceptor de péptidos también puede fijarse a una molécula de ARN por unión de un grupo funcional al extremo 3' del ARN seguido de ligación química, como se muestra en la Figura 6. En una variación del proceso descrito anteriormente, se usan aminación reductora y reacciones relacionadas para unir grupos funcionales al extremo 3' de un ARN. Estos grupos recién introducidos después reaccionan adicionalmente con engarces modificados convenientemente en el aceptor de péptidos, conduciendo a la formación de enlaces covalentes entre el ARN y el aceptor de péptidos. Grupos reactivos a modo de ejemplo incluyen tioles (para la formación de disulfuro o reacciones con reactivos tiofílicos tales como disulfuros de piridilo; Figura 6, Reacción A) o maleimidas (Figura 6, Reacción B).

Otros grupos reactivos posibles para la funcionalización del extremo 3' de un ARN seguido de la unión de un aceptor de péptidos son aminas. Por ejemplo, pueden generarse ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS-ésteres) en engarces modificados con 5' amino del aceptor de péptidos por reacción con glutarato de disuccinimidilo (DSG) o reactivos relacionados como se describe en Cox y col. (J. Immunol. 145: 1719, 1990) y <http://www.piercenet.com/Products/linksearch.cfm> (Pierce, Rockford, IL; Figura 6, Reacción C). Este engarce modificado después puede hacerse reaccionar con el grupo amino funcional del ARN modificado.

Este tipo de reacción de ligación puede realizarse de una manera dependiente o independiente de molde externo como se ha descrito anteriormente, usando los mismos enfoques generales.

Ejemplo 5: Procedimientos de Ligación Química que Implican Procedimientos Fotoquímicos

Un aceptor de péptidos también puede unirse a una molécula de ARN usando procedimientos fotoquímicos como los mostrados en las Figuras 7A-7H. Las moléculas de engarce del aceptor de péptidos que llevan grupos psoraleno permiten la introducción de entrecruzamientos en cadenas de ARN complementarias tras la irradiación con luz UV de onda larga. Esta técnica puede realizarse generalmente como se describe en Pielles y Englisch, (Nucleic Acids Res. 17:285, 1989); y Godard y col. (Nucleic Acids Res. 22: 4789, 1994). La unión del resto de psoraleno al extremo 5' de la región de engarce del aceptor de péptidos puede realizarse usando psoraleno amiditas disponibles en el mercado, 2'-OMe-ARN fosforamiditas, psoraleno C6 fosforamiditas y trietilenglicol (TEG) fosforamiditas (Glen Research, Sterling, VA) en un sintetizador de ADN convencional.

En un enfoque a modo de ejemplo, este procedimiento se realizó como se indica a continuación. Se combinaron un nmol de ARN que consistía en un transcrito de ARN que codificaba un epítipo flag, un marcador de estreptomicina y un sitio diana fotoquímico de la secuencia: 5' G GGA CAA UUA CUA UUU ACA AUG GAC UAC AAG GAC GAU GAC GAU AAG GGC GGC UGG UCC CAC CCC CAG UUC GAG AAG AAC GGC UAU A (SEC ID N°: 3), 1,2 nmol de Photolinker 30/10 que consistía en la secuencia: 5' Pso TAG CCG TTC T AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA CC Pu (SEC ID N°: 4) (en la que Pso es un psoraleno C2 amidita [Glen Research] y Pu es Puomicina-CPG [Glen Research]), sintetizado de acuerdo con protocolos convencionales del fabricante, o 30/15 que consistía en la secuencia: 5' Pso TAG CCG TTC TTC TCG AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA CC Pu (SEC ID N°: 5) (en la que Pso es una psoraleno C2 amidita, y Pu es Puomicina-CPG), tampón 10x (Tris 250 mM pH 7,0; NaCl 1 M) y agua (llevando el volumen final a 360 µl) y se calentaron a 80 °C durante 2 minutos. La mezcla de reacción después se enfrió lentamente a temperatura ambiente. La mezcla de reacción después se irradió durante 15 minutos a 0 °C con un valor de λ mayor de 310 nm usando una lámpara de inmersión de 450 W (presión media; ACE Glass, n° de cat. 7825-34), equipada con un manguito de absorción de Pyrex (ACE Glass, n° de cat. 7835-44) en un pocillo de inmersión de cuarzo (ACE Glass, n° de cat. 7854-25), estando la muestra en un tubo de microcentrifuga sujeto al pocillo de inmersión, y enfriado con agua con hielo. La muestra después se precipitó con 40 µl de NaOAc 3 M y 1000 µl de etanol, y se resuspendió en 75 µl de agua. A continuación, se añadieron 75 µl de tampón de carga 2x (Novex) a la muestra y la muestra se purificó en un gel de TBE-Urea al 6 % prefundido (Novex). El producto se recuperó usando un procedimiento "crush and soak" (NaOAc 0,3 M, durante una noche a temperatura ambiente) seguido de precipitación con etanol. Este procedimiento de fotoentrecruzamiento produjo 272 pmol de producto de fusión de ARN-proteína usando Photolinker 10/30 y 227 pmol usando Photolinker 15/30.

Para este procedimiento de fotoentrecruzamiento de ligación química, se evaluaron diversos parámetros de la reacción. En primer lugar, se ensayó la dependencia de sal de la formación de fotoentrecruzamiento. Se realizó una serie de experimentos de entrecruzamiento con tampones que contenían NaCl 100-1000 mM. No se observaron diferencias en las eficacias de ligación entre las diversas reacciones. Además, un cambio en la secuencia diana de ARN a: 5'...GAC UAC AAG GAC GAG GCA UCC GCU CUU UCA CUA UA (SEC ID N°: 6) (siendo la secuencia subrayada una diana para el engarce de psoraleno) proporcionó rendimientos de producto reducidos significativamente (reducidos del 15 al 20 %), indicando que la secuencia diana de ARN era importante. A

continuación, se determinó que el rendimiento de producto podía aumentarse por el reemplazo repetido de engarces de psoraleno que se habían inactivado durante el transcurso de la reacción. Este experimento se realizó como se indica a continuación. El ARN, engarce y tampón 10x se combinaron y se calentaron a 80 °C durante 2 minutos. Después, la mezcla de reacción se enfrió lentamente a temperatura ambiente y se irradió como se ha descrito anteriormente. Después se añadieron 1 nmol adicional de engarce y 1 µl de tampón. El engarce se hibridó con el ARN y después se irradió. Este procedimiento se repitió, añadiendo 2 nmol de engarce y 2 µl de tampón e irradiando. Este procedimiento permitió obtener un mayor rendimiento de producto desde el 20 % a más de un 40 % para ciertas secuencias.

También se evaluó el comportamiento de los productos de ligación generados por procedimientos de entrecruzamiento fotoquímico. En experimentos con engarces de diferentes longitudes (psoraleno más 15 pares de bases de dominio de hibridación de diana más dA_nCCPu [donde n=7, 12, 17 o 22]) se realizaron las siguientes observaciones. Los engarces largos dieron los mayores rendimientos de fusión de ARN-proteína en condiciones de alta concentración de sal (KCl 500 mM más MgCl₂ 50 mM). En tampones con concentración de sal reducida (KCl 250 mM más MgCl₂ 10 mM, o KCl 250 mM), los engarces cortos produjeron mayores rendimientos que los largos, pero los rendimientos globales generalmente fueron inferiores. En general, los rendimientos parecían ser comparables a los obtenidos con moldes de ARN ligados enzimáticamente.

En otros procedimientos a modo de ejemplo, se sintetizaron diversos ARNm y engarces de puomicina de tal forma que el aceptor de péptidos se colocara en el extremo 3' del engarce. Los engarces se hibridaron con los ARNm diana y se evaluaron con respeto a su eficacia en la formación de moléculas de fusión de ARNm-proteína mediante técnicas de traducción *in vitro*. También se determinó el efecto de la longitud del engarce y la composición sobre el rendimiento de la molécula de fusión.

La Figura 7D ilustra el diseño de los ARNm usados en las reacciones de entrecruzamiento. Cada una de las moléculas de ARN contenía una parte del virus del mosaico del tabaco 5'-UTR (TMV) con un buen contexto de codón de iniciación (Gallie y col., *Nucleic Acids Res.*, 16: 883-93, 1988; y Kozak, *Microbiol. Rev.*, 47: 1-45, 1983), y un codón de inicio de la traducción (AUG). Todos los ARNm también llevaban una secuencia de hibridación de engarce de 10 nucleótidos 3'-terminal 5'-GCAUC-CGCUAUU que codificaba la secuencia de aminoácidos ASA, y terminaba con la secuencia dinucleotídica 5'-UA para el fotoentrecruzamiento de psoraleno (const.), como se describe por Sinden y Hagerman (*Biochemistry*, 23: 6299-6303, 1984) y Gamper y col., (*Photochem. Photobiol.*, 40: 29-34, 1984). Además, un ARNm (ARNm 1) contenía un epítipo Flag, DYKDDDDK (Hopp y col., *Biotechnology*, 6: 1205-1210, 1988) seguido de una secuencia Strep-Tag II, WSHQPFEK (Schmidt y col., *J. Mol. Biol.*, 255: 753-66, 1996). Otras moléculas de ARNm (ARNm 2, 3 y 4) contenían un scFv 4-4-20, molde de anticuerpo monocatenario antifluoresceína, como se describe por Bedzyk y col. (*J. Biol. Chem.*, 265: 18615-20, 1990) y Mallender y col. (*J. Biol. Chem.*, 271: 5338-46, 1996). Además, los ARNm 3 y 4 contenían un codón de terminación cadena abajo (UAA) para inducir la liberación de ARNm a partir del ribosoma después de la traducción del molde no entrecruzado residual (véase más adelante). Una cola de poli-A también se unió al ARNm 4 para la purificación por oligo-dT.

Los ARNm usados en estos estudios (Figura 7D) se prepararon por transcripción no iniciada (run off) con ARN polimerasa de T7 (Megashortscript Transcription Kit, Ambion, TX) de moldes de ADN de PCR, de acuerdo con los procedimientos de Milligan y col. (*Nucleic Acids Res.*, 15: 8783-8798, 1987). Después de la transcripción, todos los ARN se purificaron por electroforesis en geles de poliácridamida de TBE al 6 %-urea (Novex, CA). Las bandas de producto se visualizaron por sombreado UV, se escindieron, se aplastaron y se humedecieron durante una noche en NaOAc 0,3 M. Después de la precipitación con etanol, los ARN se resuspendieron y se almacenaron en H₂O. El ARN radiomarcado se sintetizó de acuerdo con el mismo procedimiento incluyendo [α -³²P] UTP (Amersham, IL) en el tampón de transcripción.

Los engarces de puomicina usados en estos estudios (Figura 7E) se prepararon usando un Expedite Synthesizer Model 8909 (PerSeptive Biosystems, MA), usando química de fosforamidita en soporte sólido convencional. Se usaron puomicina-CPG, ADN fosforamiditas, 2'-OMe-ARN fosforamiditas, psoraleno C6 fosforamidita y trietilenglicol (TEG) fosforamiditas (espaciador 9) de acuerdo con los protocolos recomendados (Glen Research). Un resto de psoraleno se unió a través de una cadena alquilo C6 al fosfato 5' del engarce. Se usaron espaciadores flexibles de trietilenglicol fosfato (TEG) y secuencias polinucleotídicas de diversas longitudes para encadenar la 5'-dCdC-puomicina al extremo 3' (véase la tabla de la Figura 7E). La secuencia de hibridación del engarce se preparó a partir de 2'-OMe-ARN fosforamiditas para mejorar la estabilidad de emparejamiento de la estructura de tallo (Inoue y col., *Nucleic Acids Res.*, 15: 6131-6148, 1987; y Majlessi y col., *Nucleic Acids Res.*, 26: 2224-2229, 1998). Después de la desprotección en hidróxido amónico concentrado durante 8 horas a 55 °C, los engarces se purificaron por HPLC de fase inversa en una columna C18 Spheri-5 (Perkin Elmer, CA) con acetato de trietilamonio 50 mM en acetonitrilo al 5 % v/v como tampón A, y acetato de trietilamonio 50 mM en acetonitrilo al 70 % v/v como tampón B y con un caudal de 1,5 ml/min. Para la elución se usó un gradiente lineal de 15-60 % de tampón B durante 45 minutos. Después del secado, los engarces se resuspendieron y se almacenaron en H₂O.

Los engarces (5 µM) se hibridaron con los ARNm diana (2,5 µM) en tampón Tris HCl 25 mM, pH 7, y NaCl 100 mM por calentamiento a 85 °C durante 30 segundos, seguido de refrigeración a 4 °C durante un periodo de 5 minutos. La mezcla de reacción se irradió durante 15 minutos a temperatura ambiente en viales de vidrio de borosilicato (Kimble/Kontes, NJ), usando un modelo de lámpara UV de múltiples longitudes de onda portátil UVGL-25 (UVP, CA)

preparada para una onda larga (longitud de onda $\lambda > 300$ nm). La mezcla de productos de la reacción de fotoentrecruzamiento entre el ARNm 1 radiomarcado y el engarce B se analizó en un gel desnaturante de TBE al 6 %-Urea (Novex) y se visualizó en un sistema fosforimaging (Molecular Dynamics, CA) (Figura 7E). Estas mezclas de productos de fotoentrecruzamiento generalmente contenían <20 % de ARNm sin reaccionar y >80 % de ARNm fotoentrecruzado, y se usaron directamente para la traducción *in vitro* y la posterior formación de fusión de ARNm-proteína sin purificación adicional. Para los sustratos de ARNm mayores 2, 3 y 4 (> 800 nucleótidos), la diferencia relativa de tamaños entre el ARNm y el ARNm entrecruzado se volvió demasiado pequeña para separarse en un gel. En estos casos, las mezclas de reacción de fotoentrecruzamiento en bruto se añadieron directamente al lisado para la formación de la fusión, sin purificación adicional.

La traducción y formación de fusión de las moléculas de fusión de ARNm primero se ensayaron usando ARNm 2 en los siguientes experimentos. Las reacciones de traducción *in vitro* se realizaron usando lisados de reticulocitos de conejo (Ambion) durante 30 minutos a 30 °C. Las reacciones contenían 100 pmol de ARNm fotoentrecruzado (véase anteriormente), creatina fosfato 10 mM, KOAc 150 mM, MgCl₂ 0,5 mM, una concentración 0,1 mM de cada aminoácido excepto metionina, 150 μ Ci de [³⁵S] metionina (Amersham) y un 67 % v/v de lisado en un volumen total de 300 μ l. La formación de fusión de ARNm-proteína se promovió por la adición de KCl y MgCl₂ a las concentraciones finales de 590 mM y 50 mM, respectivamente, en un volumen de 500 μ l, de acuerdo con los procedimientos de Roberts y Szostak y Szostak y col. (*supra*). La incubación se continuó durante otros 60 minutos a 20 °C. También se ensayaron concentraciones variables de KCl y MgCl₂ para explorar la dependencia de la sal de la formación de fusión.

Los productos de traducción *in vitro* se aislaron diluyendo el lisado en 10 ml de tampón de unión (Tris HCl 100 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, NaCl 1 M, Triton X-100 al 0,25 % v/v) y añadiendo a la mezcla 10 mg de oligo-dT celulosa tipo 7 (Pharmacia, NJ). Las muestras se hicieron rotar durante 60 minutos a 4 °C. El soporte sólido después se lavó con 5 ml de tampón de unión enfriado con hielo, seguido de elución con alícuotas de 100 μ l de H₂O desionizada. La cantidad de fusión de ARNm-proteína aislada se determinó por recuento de centelleo de la [³⁵S] metionina incorporada. El producto se analizó por electroforesis en geles de NuPage al 4-12 % usando tampón de proceso MES (Novex). Los geles se secaron después de un lavado extensivo para retirar el exceso de [³⁵S] metionina y las bandas se visualizaron en un sistema fosforimager (Molecular Dynamics).

El análisis del gel mostró dos bandas que correspondían al peptidil-ARNt y el péptido libre (Figura 7F, carril 1). Cuando la traducción se realizó con ARNm 2 foto-reticulado, apareció una tercera banda de migración más lenta, indicando de esta manera la formación de fusión satisfactoria de ARNm-proteína (Figura 7F, carril 2). Se obtuvieron mayores rendimientos de proteína libre y fusión (aproximadamente un 20 % más con ARNm 3, que era idéntico en secuencia codificante al ARNm 2, pero llevaba un codón de terminación cadena abajo del sitio de fotoentrecruzamiento (Figura 7F, carriles 3 y 4). Las intensidades de bandas relativas indicaron que el 30 % de la cantidad total de proteína sintetizada se convirtió en fusión de ARNm-proteína (Figura 7F, carril 4).

Una molécula de fusión de ARNm-scFv, preparada a partir del ARNm 4 de la Figura 7E, se purificó por unión de las regiones de engarce A₁₈ a oligo-dT celulosa, seguido de lavado con tampón de unión, de acuerdo con los procedimientos de Roberts y Szostak y Szostak y col. (*supra*) (Figura 7E, carril 5). El producto de fusión pudo aislarse con un rendimiento del 1,3 % basándose en la cantidad de ARNm de entrada fotoentrecruzado. Se descubrió que las propiedades físicas (movilidad en gel, unión a oligo-dT celulosa, unión selectiva del péptido a reactivos de afinidad) de las fusiones preparadas a partir del ARN fotoentrecruzado eran idénticas a las del producto de fusión obtenido a partir de moldes de ARNm ligados enzimáticamente.

Para confirmar la composición de la parte de péptido de las moléculas de fusión, se ensayaron fusiones preparadas a partir del molde de ARNm 1 entrecruzado con el engarce B de la Figura 7E, que codificaba el epítipo Flag y el marcador Strep-Tag II, con respecto a la unión de proteínas. Se añadió una solución de 10 μ l de fusión de ARNm-péptido marcada con ³⁵S (preparada a partir de ARNm 1 con engarce B) a 20 μ l de Gel de Afinidad Anti-Flag M2 (Sigma, MO) en 300 μ l de tampón que contenía Tris HCl 50 mM, pH 7,4, NP 40 al 1 %, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM y Na F 1 mM. Se realizó un segundo experimento de precipitación añadiendo el mismo producto de fusión a 20 μ l de StrepTactin Sepharose (Genosys, TX) en 300 μ l de tampón que contenía Tris HCl 100 mM, pH 7,1, EDTA 1 mM y 0,5 mg/ml de ARNt de levadura. Las dos mezclas de precipitación se procesaron en paralelo en condiciones idénticas: las mezclas se hicieron rotar durante 1 hora a 4 °C y después se transfirieron a una unidad de filtro Ultrafree-MC (0,45 μ m; Millipore, MA). El tampón se retiró por centrifugación y el residuo se lavó 5 veces con 300 μ l de tampón enfriado con hielo. Los residuos se analizaron por recuento de centelleo y se determinó que la unión de fusión era el 54 % y 62 % para la matriz Anti-Flag M2 y la matriz de StrepTactin, respectivamente. Una reacción de control con proteína A agarosa (Sigma) no mostró unión detectable a la matriz.

Para ensayar el efecto de la longitud del engarce y la composición sobre la formación de la fusión en presencia de diversas concentraciones de sal, el ARNm 3 se fotoentrecruzó con los engarces A-F de la Figura 7E y cada molde posteriormente se ensayó con respecto a la formación de fusión (Figura 7G). Después de la incubación durante 30 minutos a 30 °C, las muestras se dividieron en alícuotas a las que se añadieron cantidades variables de KCl y MgCl₂. Las muestras se incubaron durante otros 60 minutos a 20 °C; después, el producto de fusión se analizó por electroforesis en gel. Se obtuvieron los mayores rendimientos de fusión de ARNm-proteína con los engarces largos

A y B (40 y 35 nucleótidos, respectivamente) en condiciones de alta concentración de sal. Una concentración de sal menor dio como resultado una reducción significativa en la formación de la fusión con los engarces A y B. Por otra parte, los rendimientos de fusión para los engarces más cortos C a F fueron menos dependientes de la concentración de sal. Además, el rendimiento de molécula de fusión aumentaba generalmente con el número de espaciadores de TEG flexibles. El análisis de los lisados de molécula de fusión de ARNm-proteína bruta reveló que hasta el 45 % de la proteína total estaba presente como fusión de ARNm-proteína. Como el engarce F carecía del rastro de oligo-dA necesario para la purificación de oligo-dT, el ARNm 4 se preparó con un tramo de A₁₈ en su extremo 3', que permitió la purificación de la fusión en oligo-dT celulosa.

En una alternativa a las técnicas anteriores que implican la unión de psoraleno al extremo 5' del engarce, el resto de psoraleno también puede incorporarse en una posición interna de la región de engarce del aceptor de péptidos, como se muestra en la Figura 7B, y como se describe en Pieleas y col. (Nucleic Acids Res. 17: 8967, 1989), o por incorporación de una fosforamidita ramificada (Clontech, Palo Alto, CA) dentro de la secuencia de engarce, seguido de la adición de una psoraleno fosforamidita (Glen Research, Sterling, VA). Por ejemplo, el resto de psoraleno puede entrecruzarse con el ARN a través de un engarce ramificado, como se describe en el documento U.S.S.N. 09/453.190, incorporado en el presente documento por referencia.

En un enfoque a modo de ejemplo, se ha sintetizado un engarce con la secuencia 5' cgt agg cga gaa agt gat X AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA CC Pu (en la que Pu es Puomicina-CPG [Glen Research]; C y A son 3'-amiditas convencionales [Glen Research]; a, t, c y g son 5'-fosforamiditas [Glen Research]; y X es una amidita de ramificación asimétrica [Clontech]) de acuerdo con los protocolos convencionales del fabricante, seguido de desprotección selectiva del punto de ramificación X (de acuerdo con las instrucciones de Clontech) y posterior acoplamiento de una psoraleno C6 amidita (Glen Research). Este engarce después se fotoentrecruzó con un ARN con la secuencia diana 5'...GCA UCC GCU CUU UCA CUA UA usando las técnicas de fotoentrecruzamiento descritas anteriormente. Esta construcción de ARN-engarce después se usó satisfactoriamente para la síntesis de fusiones de ARN-proteína.

En otra alternativa más, también puede construirse un engarce que contiene un psoraleno unido al extremo 3' del dominio de hibridación diana (Figura 7C). En este procedimiento, el extremo 5' del engarce que contiene psoraleno se extiende por otro engarce, que después de la inversión de la orientación de la cadena, termina con una puomicina 3'. La posterior digestión del dominio diana de ARN con RNasa H es opcional y aumentará la flexibilidad de la construcción del engarce. Además, este enfoque permite la unión del engarce en posiciones internas de moléculas de ARN muchos mayores, y la región no traducida cadena abajo del sitio de engarce después se corta antes de la traducción y de la formación de la fusión de ARN-proteína.

En un enfoque a modo de ejemplo de este procedimiento, se construyó un engarce con la secuencia 5' Pso atg cga gaa agt gat aaa aaa aaa CC Pu (en la que Pu es Puomicina-CPG [Glen Research]; C es una 3'-amidita convencional [Glen Research]; a, t, c y g son 5'-fosforamiditas [Glen Research]; y Pso es una psoraleno C6 fosforamidita [Glen Research]) de acuerdo con protocolos convencionales del fabricante. El engarce después se fotoentrecruzó con un ARN con la secuencia diana 5'...GUA UAC GCU CUU UCA CUA usando las técnicas de fotoentrecruzamiento descritas anteriormente. Esta construcción de ARN-engarce (con y sin tratamiento previo con RNasa H) después se usó satisfactoriamente para la síntesis de fusiones de ARN-proteína.

Una ventaja de los procedimientos fotoquímicos para unir un aceptor de péptidos a un ARN es que estos procedimientos no requieren modificación química del ARN antes de la ligación. Esto hace que el proceso sea muy sólido y selectivo y permite el uso de un ARN a partir de una región de transcripción de T7 en bruto como sustrato para la ligación química.

Ejemplo 4: Purificación de ARN basada en Biotina Fotoescindible y Ligación

Si se desea, una etapa de purificación de ARN basada en afinidad puede combinarse con un procedimiento de ligación fotoquímico descrito anteriormente (Figura 7H). Una molécula de engarce adecuada se modifica en su extremo de puomicina con un resto de biotina fotoescindible (por ejemplo, EZ-Link™ NHS-PC-LC-Biotin, Pierce, Rockford, IL). El ARN diana (obtenido, por ejemplo, a partir de una reacción de transcripción en bruto) después se hibrida con una cantidad definida de engarce, y el dúplex resultante se captura en un soporte sólido, tal como resina de estreptavidina (o una resina relacionada). El ARN en exceso, así como los componentes de la reacción de transcripción, después se retira por lavado extensivo. La irradiación con luz UV de onda larga simultáneamente conduce a la formación de fotoentrecruzamientos y a la liberación del producto de la resina. El ARN ligado después puede suministrarse directamente a una reacción de traducción y formación de fusión, sin purificación adicional.

Este procedimiento es ventajoso con respecto a los esquemas de purificación de ARN previos. Por ejemplo, después de la transcripción, la cantidad de ARN simplemente tiene que estimarse de manera que exceda la cantidad de engarce usado. Cuando se somete al procedimiento descrito, su cantidad se reduce automáticamente a una cantidad no mayor que la cantidad de engarce usado. A su vez, esto permite avanzar hacia la siguiente etapa sin una cuantificación adicional del ARN (o ARN ligado), por ejemplo, tomando lecturas UV A₂₆₀, y las cantidades de ARN no tienen que ajustarse de otra manera. Por lo tanto, el proceso de preparación de moléculas de fusión de ácido nucleico-proteína es más adecuado para la automatización.

En una técnica a modo de ejemplo, este protocolo de purificación y ligación de ARN basado en biotina puede realizarse como se indica a continuación. En este procedimiento de purificación y ligación de ARN basado en biotina fotoescindible, el engarce primero se biotinila. El engarce C6-psoraleno-2-Ome[U AGC GGA UGC] dA₁₈ TEG₂ dCdC-puromicina se biotinila por combinación de 100 µl de engarce 100 µM (10 nmol en total), 50 µl de 1 µmol de EZ-Link™ PC-LC-Biotin en DMSO, 20 µl de PBS 10x, pH 7,4 y 30 µl de H₂O. La mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 2 horas y da como resultado un rendimiento cuantitativo. La mezcla después se precipita dos veces con etanol, con una recuperación esperada de >90 % del engarce biotinilado-PC y se resuspende en 200 µl de H₂O.

El ARN después se transcribe usando, por ejemplo, el Kit Megashortscript de T7 (Ambion). La transcripción se realiza usando 10 pmol de un molde de ADN que contiene la secuencia GCA UCC GCU AUU UAA A_n en el extremo 3' para una reacción de 250 µl. Esta reacción de transcripción produciría aproximadamente 2-5 nmol de producto de ARN bruto. No se requiere purificación (extracción con fenol, columna NAP-5 o columna RNeasy) antes de proceder a la siguiente etapa.

En la siguiente etapa de esta técnica de purificación y ligación, el engarce biotinilado (10 µl de engarce biotinilado 50 pmol/µl; 500 pmol en total) se hibrida con 62,5 a 250 µl de la mezcla de transcripción (que contiene un mínimo estimado de 500 pmol de ARN) usando, por ejemplo, una máquina de PCR (calentando durante 30 segundos a 80 °C, y después enfriando a 4 °C a 0,3 °C/seg) con 15 µl de NaCl 5 M (a una concentración final de 0,25 M para una reacción de 300 µl) y H₂O, hasta un volumen de reacción final de 300 µl. El ARN de la mezcla de reacción después se inmoviliza en 100 µl de perlas Neutravidin (Pierce, Rockford, IL) agitando suavemente la mezcla de reacción a 4 °C durante 30 minutos. Las perlas después se lavan y se resuspenden en 300 µl de H₂O.

Las perlas después se centrifugan y se lavan 3 veces con 100 µl de tampón (Tris 25 mM pH 7,0 y NaCl 0,25 M). Después, las perlas se irradian UV durante 15 minutos a temperatura ambiente (usando una lámpara UV portátil UVGL-25; el tubo de microcentrifuga que contiene las perlas se pone directamente en la lámpara) para ligar químicamente el engarce al ARN y fotoliberar la molécula ligada de las perlas. Se espera que se fotoliberen 250 pmol de ARN ligado. Se añaden setenta y cinco µl de H₂O a los tubos y los tubos se agitan con vórtice durante 30 segundos, y las perlas se centrifugan. El sobrenadante de 75 µl, que contiene el ARN/engarce ligado, se usa para la traducción y formación de moléculas de fusión de ácido nucleico-proteína.

Las moléculas de fusión de ácido nucleico-proteína se forman combinando los 75 µl de sobrenadante de la etapa previa con 225 µl de los componentes tampón y lisado del Kit de Lisado de Reticulocitos de Conejo (Ambion) e incubando la mezcla durante 30 minutos a 30 °C. Después se añade KCl y MgCl₂ a concentraciones finales de 500 mM y 50 mM, respectivamente, y la reacción continúa incubándose durante 60 minutos a temperatura ambiente para producir las moléculas de fusión de ácido nucleico-proteína.

Ejemplo de referencia 3: Unión de Aceptor de Péptidos a un ARN Mediante Enlaces no Covalentes Fuertes

Como alternativa a la formación de enlaces covalentes para la unión de un aceptor de péptidos a una molécula de ARN, también son posibles procedimientos que se basan únicamente en la formación de complejos fuertes y forman parte de la presente invención. Un procedimiento implica el uso de ácidos nucleicos peptídicos (ANP) para el reconocimiento y la unión del ARN, como se muestra en la Figura 8A. Los ANP son miméticos de ADN que comprenden un esqueleto compuesto de unidades de N-(2-aminoetil)glicina quirales y no cargadas (Knudsen y Nielsen, Nucleic Acids Res. 24: 494,1996). Se ha mostrado que los ANP hibridan con especificidad de secuencia y alta afinidad con ADN monocatenario complementario y con ARN. En particular, las construcciones que forman triples hélices que comprenden dos moléculas de ANP que se unen al ARN, formando de esta manera un oligotipo, pueden proporcionar un medio eficaz para la unión fuerte del ARN, ya que dichas construcciones pueden ser extremadamente resistentes a la desnaturalización térmica y a las condiciones usadas para la traducción *in vitro* (Figura 8A) (Hanvey Hanvey y col., Science, 258: 1481, 1992).

El uso de bases de pseudisocitosina aumenta además la estabilidad a pH neutro y básico (Egholm y col, Nucleic Acids Res. 23: 217, 1995). Se ha demostrado que dichos oligotipos de ANP permanecen asociados con el ARNm en condiciones de traducción *in vitro* y no pueden desplazarse por el ribosoma (Knudsen y Nielsen, Nucleic Acids Res. 24: 494, 1996). Esta propiedad maximiza la estabilidad de la construcción de fusión de ARN-proteína correspondiente.

La preparación de construcciones de engarce de ácido nucleico-ANP puede realizarse por síntesis en fase sólida partiendo de puromicina-CPG, como se muestra en la Figura 8B y como se describe en Uhlmann y col. (Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35: 2633, 1996). Después del ensamblaje de la parte de ácido nucleico deseada (o PEG-espaciador, si se desea) usando síntesis automática convencional, la síntesis en fase sólida se continúa uniendo el dominio de ANP con los reactivos apropiados (por ejemplo, como se describe en Uhlman y col. (*supra*)). Como alternativa, el ANP puede presintetizarse como un resto separado (PE Biosystems, Foster City, CA), seguido de acoplamiento químico a la parte de engarce deseada.

En un ejemplo particular, un engarce de puromicina-ADN puede modificarse con un grupo amino 5' terminal, que

5 puede convertirse adicionalmente en un éster activado químicamente (por ejemplo, un éster de NHS mediante reacción con disuccinimidil glutarato o reactivos relacionados; esta técnica se describe, por ejemplo, en Cox y col. (J. Immunol. 145: 1719, 1990); y <http://www.piercenet.com/Products/linksearch.cfm>; Pierce, Rockford, IL). La reacción posterior con el resto de ANP (que tiene un extremo amino desprotegido o una lisina carboxi-terminal) une covalentemente los dominios. Este procedimiento puede realizarse en una solución homogénea que contiene el producto de ADN-engarce final, o con el ADN que lleva grupos protectores y se mantiene unido a la resina sólida.

Ejemplo 5: Optimización de la Longitud y Composición del Engarce

10 Para todas las estrategias descritas anteriormente, es preferible optimizar la construcción del engarce. Son factores a considerar, por ejemplo, la inclusión potencial de elementos de reconocimiento de molde/diana y la accesibilidad esteárica de grupos funcionales unidos. Particularmente, cuando está implicado el molde o el reconocimiento de la diana a través de hibridación de ácidos nucleicos, se optimizan preferentemente factores que incluyen la secuencia diana y la naturaleza química del engarce. Por ejemplo, se sabe que la fuerza de hibridación de ARN y, por consiguiente, la eficacia de ligación aumentan mediante el uso de 2-OMe ARN o nucleobases modificadas con propino, en lugar de ADN (como se describe, por ejemplo, en Inoue y col., Nucleic Acids Res. 15: 6131, 1987); Kibler-Herzog y col., Nucleic Acids Res. 19: 2979, 1991; y Wagner y col., Science 260: 1510, 1993).

15 Los engarces también pueden optimizarse con respecto a su eficacia en la reacción de fusión de ARN-proteína. Generalmente, esto implicará variar la longitud del engarce, pero también puede implicar el uso de diferentes bloques de construcción para la unión de ARN-proteína. En un ejemplo particular, los desoxinucleótidos del engarce pueden reemplazarse con espaciadores de PEG o unidades de 2-OMe-ARN (ambas de Glen Research, Sterling, VA).

20 Dentro de las reivindicaciones se incluyen otras realizaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para fijar un aceptor de péptidos a una molécula de ARN, que comprende:
 - (a) proporcionar una molécula de ARN; y
 - (b) ligar químicamente dicho aceptor de péptidos a dicha molécula de ARN para formar un enlace covalente.
- 5 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho aceptor de péptidos se une a un resto de psoraleno y dicha etapa de ligación química comprende entrecruzar dicho aceptor de péptidos, a través de dicho resto de psoraleno, con dicha molécula de ARN.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicho resto de psoraleno se une a dicho aceptor de péptidos a través de un engarce.
- 10 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho resto de psoraleno se sitúa en el extremo 5' de dicho engarce.
5. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho resto de psoraleno se sitúa en el extremo 3' de dicho engarce.
6. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho resto de psoraleno se sitúa dentro de dicho engarce.
- 15 7. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho engarce comprende una cadena alquilo C6.
8. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicha molécula de ARN contiene un codón de terminación colocado cerca de su extremo 3'.
9. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho engarce tiene una longitud comprendida entre 25 y 40 unidades nucleotídicas.
- 20 10. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicho entrecruzamiento se consigue por irradiación de luz UV.
11. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que, antes de dicho entrecruzamiento, dicho ARN se hibrida con dicho engarce que comprende además un resto fotoescindible, y dicho ARN hibridado se inmoviliza en un soporte sólido a través de dicho resto fotoescindible.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que dicho resto fotoescindible es biotina.
- 25 13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha molécula de ARN se funcionaliza, y en el que se une un grupo funcional a dicho aceptor de péptidos.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicha molécula de ARN se funcionaliza por oxidación con IO_4 .
15. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicha ligación química se realiza en ausencia de un molde externo.
- 30 16. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicho aceptor de péptidos está unido covalentemente a una molécula de engarce y, antes de dicha etapa de ligación química, dicha molécula de ARN y dicho aceptor de péptidos se alinean usando un molde externo, hibridando dicho molde externo con el extremo 3' de dicha molécula de ARN y con el extremo 5' de dicha molécula de engarce.
- 35 17. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicho aceptor de péptidos se une covalentemente a una molécula de engarce y, antes de dicha etapa de ligación química, dicha molécula de ARN y dicho aceptor de péptidos se alinean por hibridación de dicha molécula de engarce al extremo 3' de dicho ARN.
18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que dicho grupo funcional de dicho aceptor de péptidos se localiza en el extremo 5' de dicha molécula de engarce.
- 40 19. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que dicho grupo funcional de dicho aceptor de péptidos está flanqueado por una región que hibrida con dicha molécula de ARN por un lado y por dicho aceptor de péptidos por el otro lado.
20. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicho grupo funcional de aceptor de péptidos se selecciona entre el grupo que consiste en una amina, hidrazina, (tio)hidrazida y (tio)semicarbazona.
21. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha etapa de ligación química comprende:
 - (a) unir un grupo funcional a dicha molécula de ARN mediante aminación reductora;
 - (b) modificar un aceptor de péptidos para que reaccione con dicho grupo funcional de dicha molécula de ARN; y
- 45

(c) poner en contacto dicho aceptor de péptidos con dicha molécula de ARN en condiciones que permiten la formación de enlaces covalentes.

22. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que dicho grupo funcional es un tiol, una maleimida o una amina.
- 5 23. El procedimiento de la reivindicación 1 o 22, en el que dicha molécula de ARN comprende una secuencia de inicio de la traducción y un codón de iniciación unido operativamente a una secuencia codificante de proteína.
24. El procedimiento de la reivindicación 1 o 22, en el que dicho aceptor de péptidos es puromicina.
25. El procedimiento de la reivindicación 1 o 22, en el que dicho aceptor de péptidos está unido covalentemente a una molécula de engarce no nucleotídica.
26. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho engarce comprende espaciadores de trietilenglicol.
- 10 27. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho engarce comprende 2'-OMe-ARN fosforamiditas.
28. El procedimiento de la reivindicación 1, 3 o 22, en el que dicho ARN o dicho engarce contienen una secuencia de purificación de afinidad y dicho procedimiento comprende además purificar dicho ARN.
29. El procedimiento de la reivindicación 28, en el que dicha secuencia de purificación de afinidad comprende una secuencia de poli (A).
- 15 30. Una molécula de ARN entrecruzada con un aceptor de péptidos a través de un resto de psoraleno.
31. La molécula de ARN de la reivindicación 30, en la que dicho ARN contiene un codón de terminación colocado en su sitio diana de fotoentrecruzamiento.
32. La molécula de ARN de la reivindicación 30, en la que dicho aceptor de péptidos está ligado al extremo 3' de dicha molécula de ARN.
- 20 33. La molécula de ARN de la reivindicación 30, en la que dicha molécula de ARN comprende una secuencia de inicio de la traducción y un codón de iniciación unido operativamente a una secuencia codificante de proteína.
34. La molécula de ARN de la reivindicación 30, en la que dicho aceptor de péptidos es puromicina.
35. La molécula de ARN de la reivindicación 30, en la que dicho resto de psoraleno está unido a dicho aceptor de péptidos a través de un engarce.
- 25 36. Un procedimiento para generar una fusión de ARN-proteína, comprendiendo dicho procedimiento:
 - (a) proporcionar una molécula de ARN hibridada con un engarce, comprendiendo dicho engarce un resto fotoescindible, un resto de psoraleno y un aceptor de péptidos;
 - (b) inmovilizar dicho ARN en un soporte sólido en condiciones en las que el ARN no inmovilizado se retira sustancialmente del soporte;
 - 30 (c) entrecruzar dicho aceptor de péptidos con dicho ARN, a través de dicho resto de psoraleno, con lo que dicho entrecruzamiento libera simultáneamente dicho ARN entrecruzado de dicho soporte sólido; y
 - (d) traducir el ARN entrecruzado formado en la etapa (c) para formar una proteína de fusión de ARN.

Ligación en un Molde de Horquilla con ADN Ligasa de T4

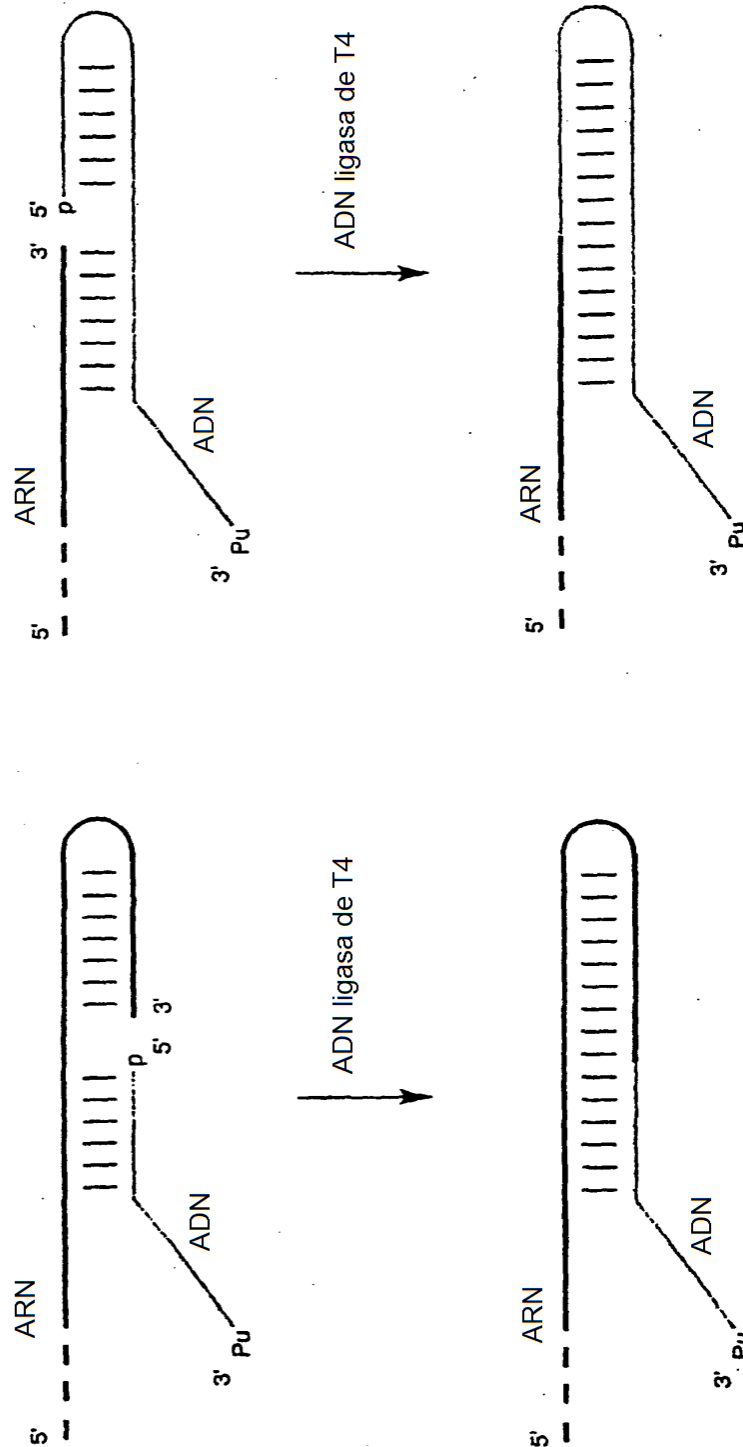


FIGURA 1

Unión de Puromicina - Engarce usando Transferasa Terminal

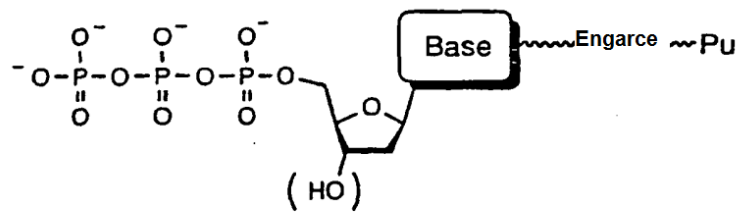
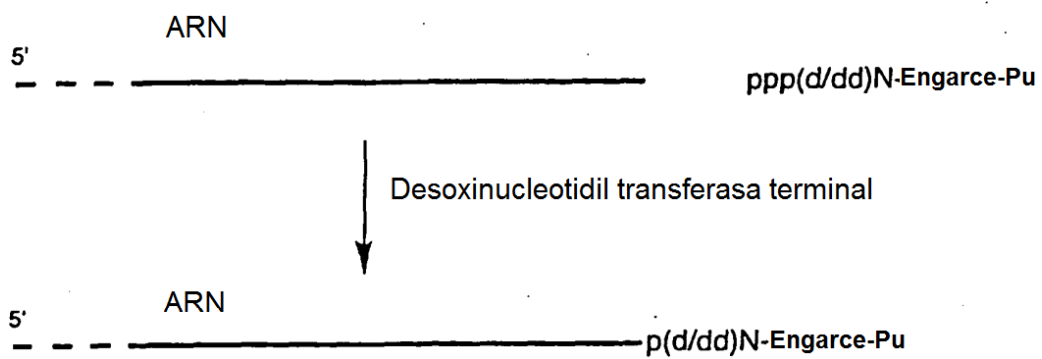


FIGURA 2

Modificación 3' de ARN mediante Formación de Hidrazida y Semicarbazona

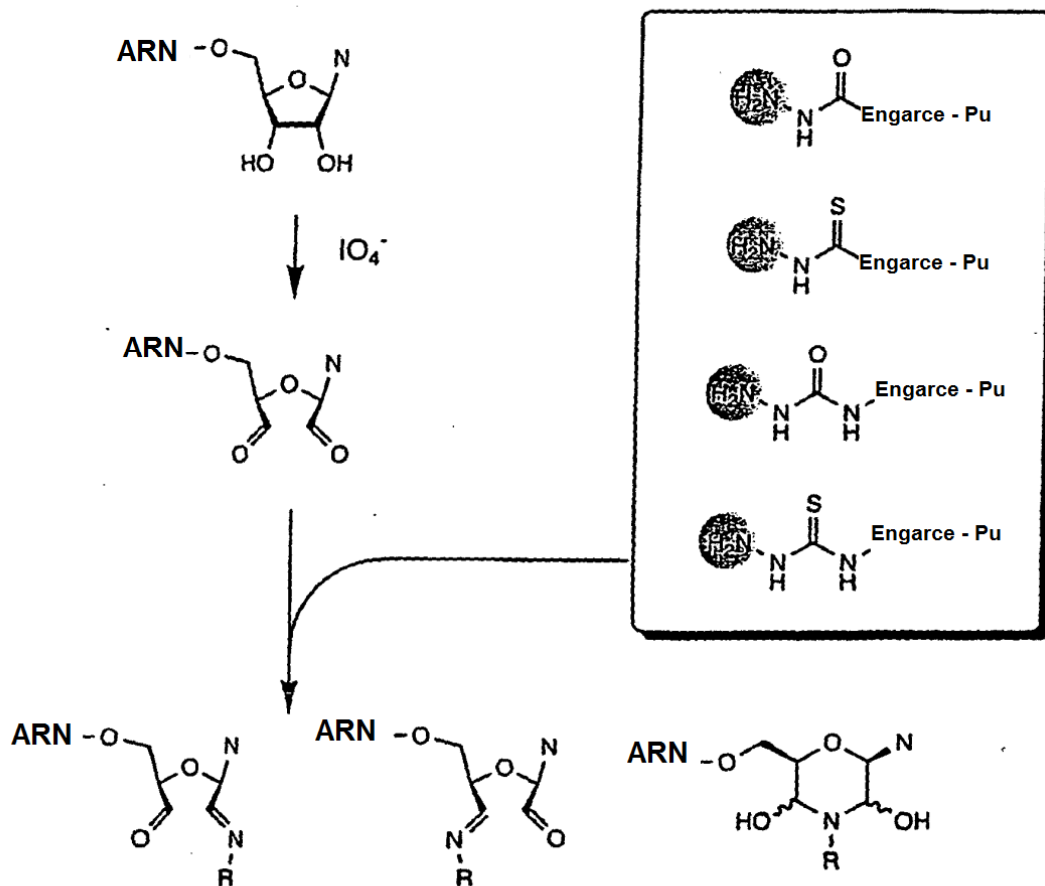


FIGURA 3A

Modificación 3' de ARN mediante Aminación Reductora

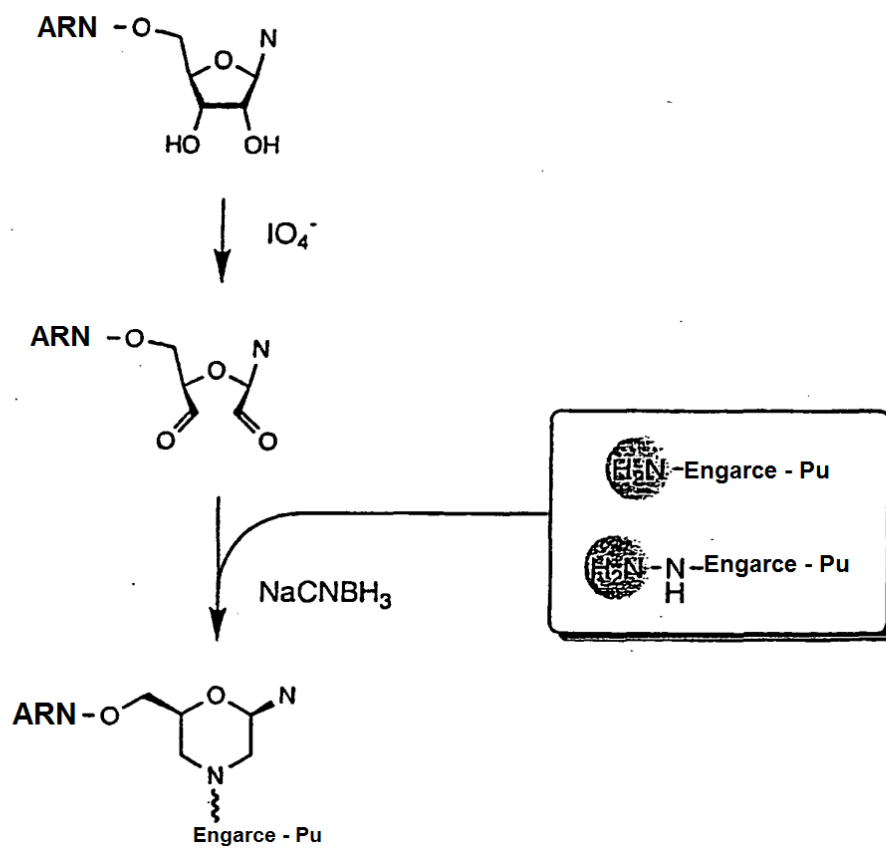
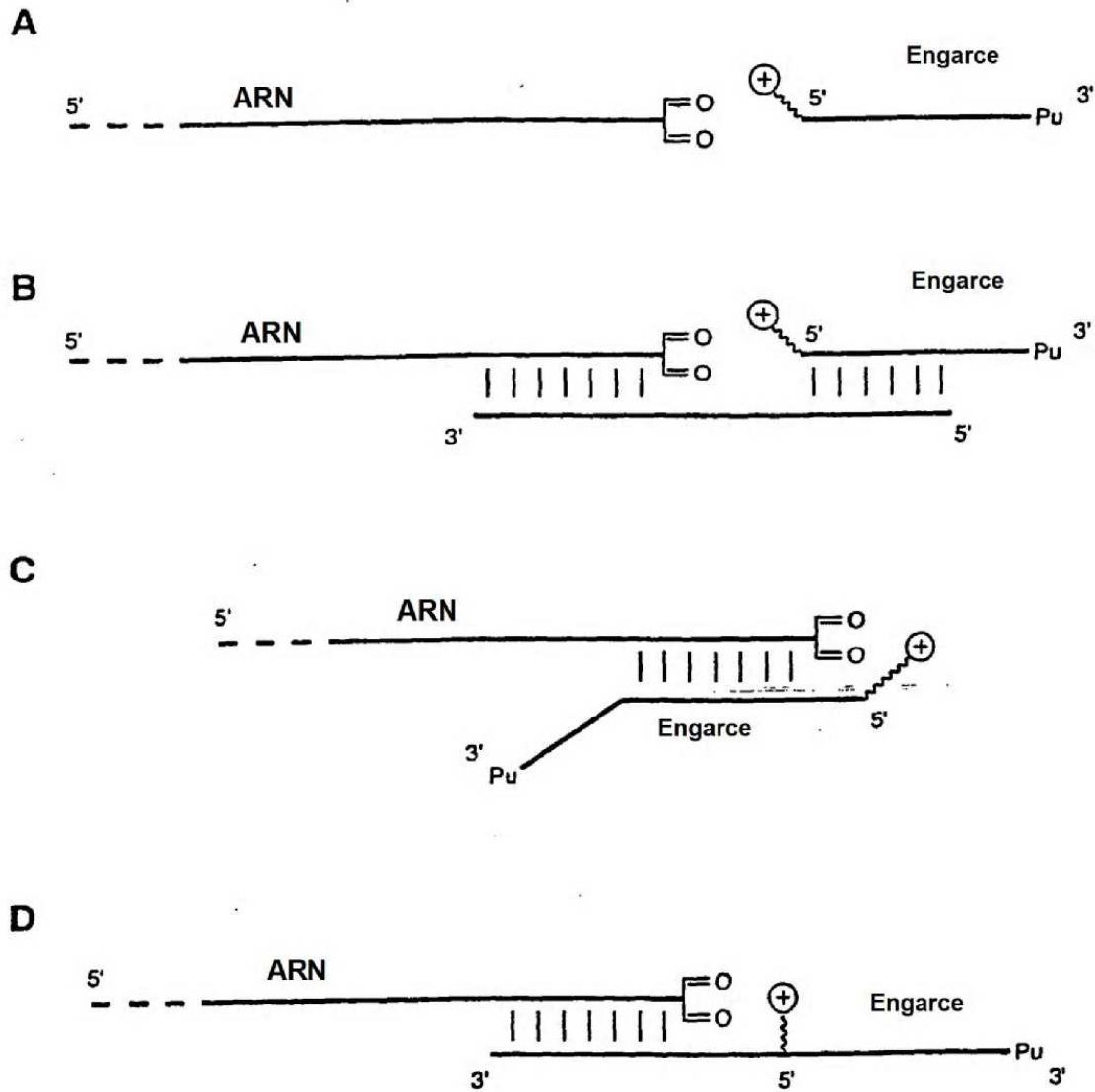


FIGURA 3B

Estrategias para ligación química



⊕ = grupo funcional reactivo (véanse las Figuras 3A y 3B)

FIGURAS 4A - 4D

Síntesis de Hidrazida Fosforamidita

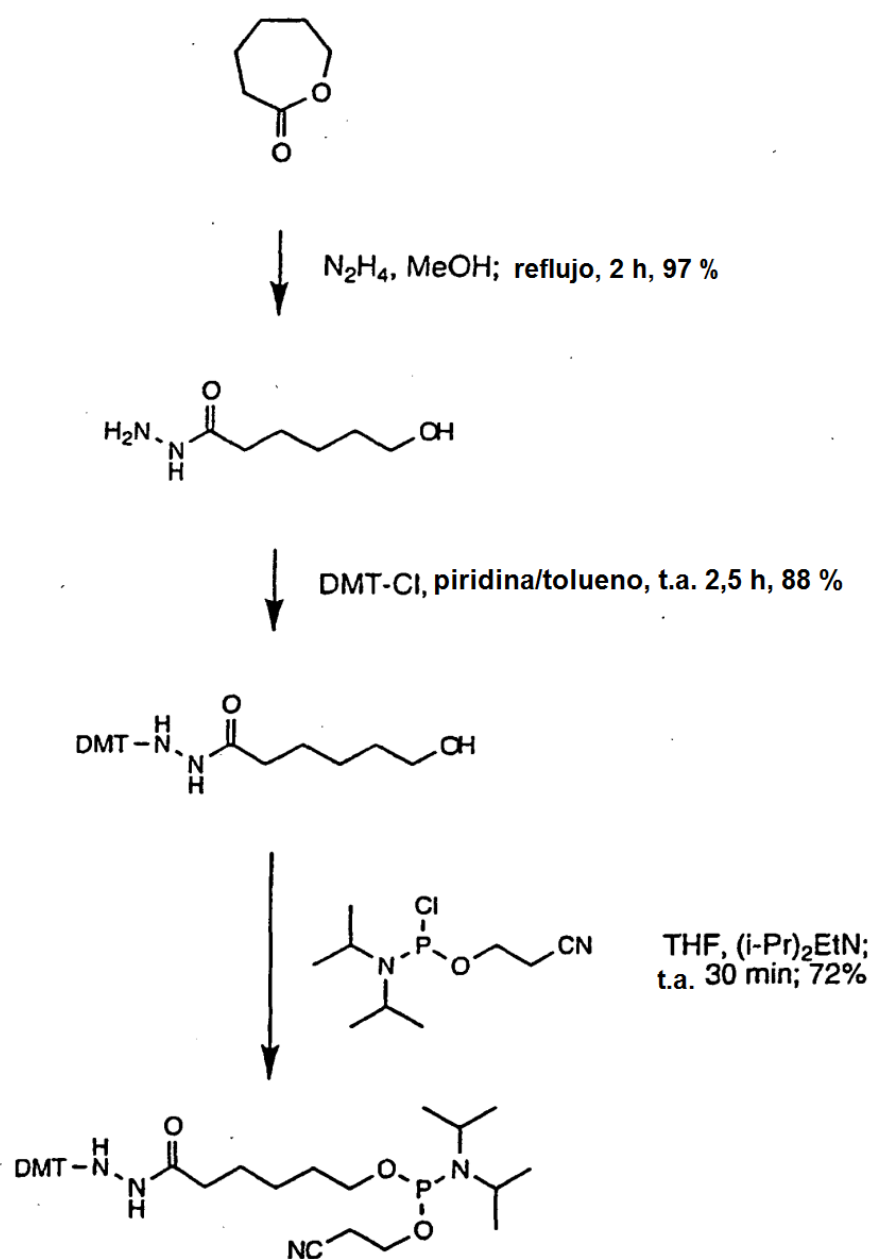
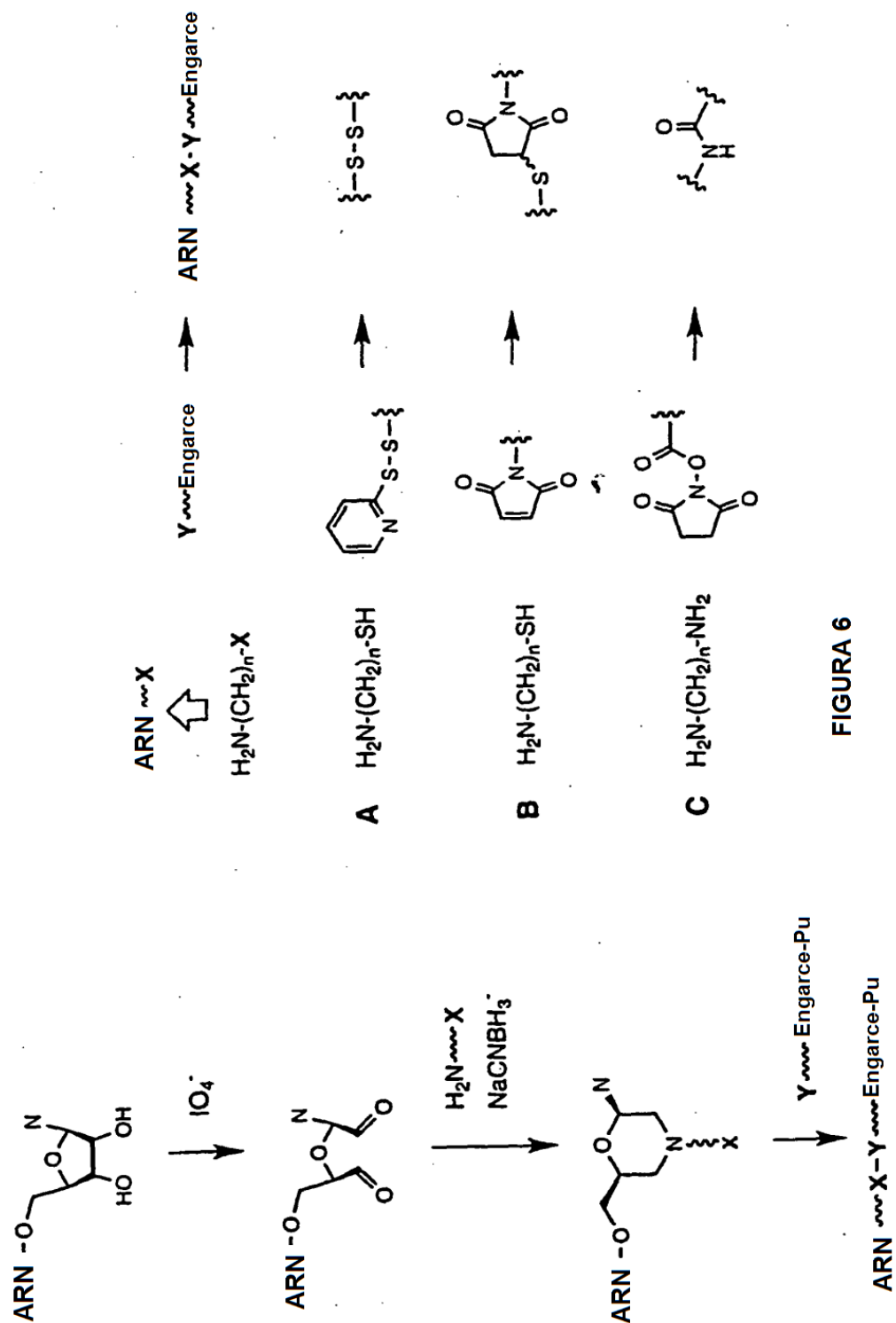
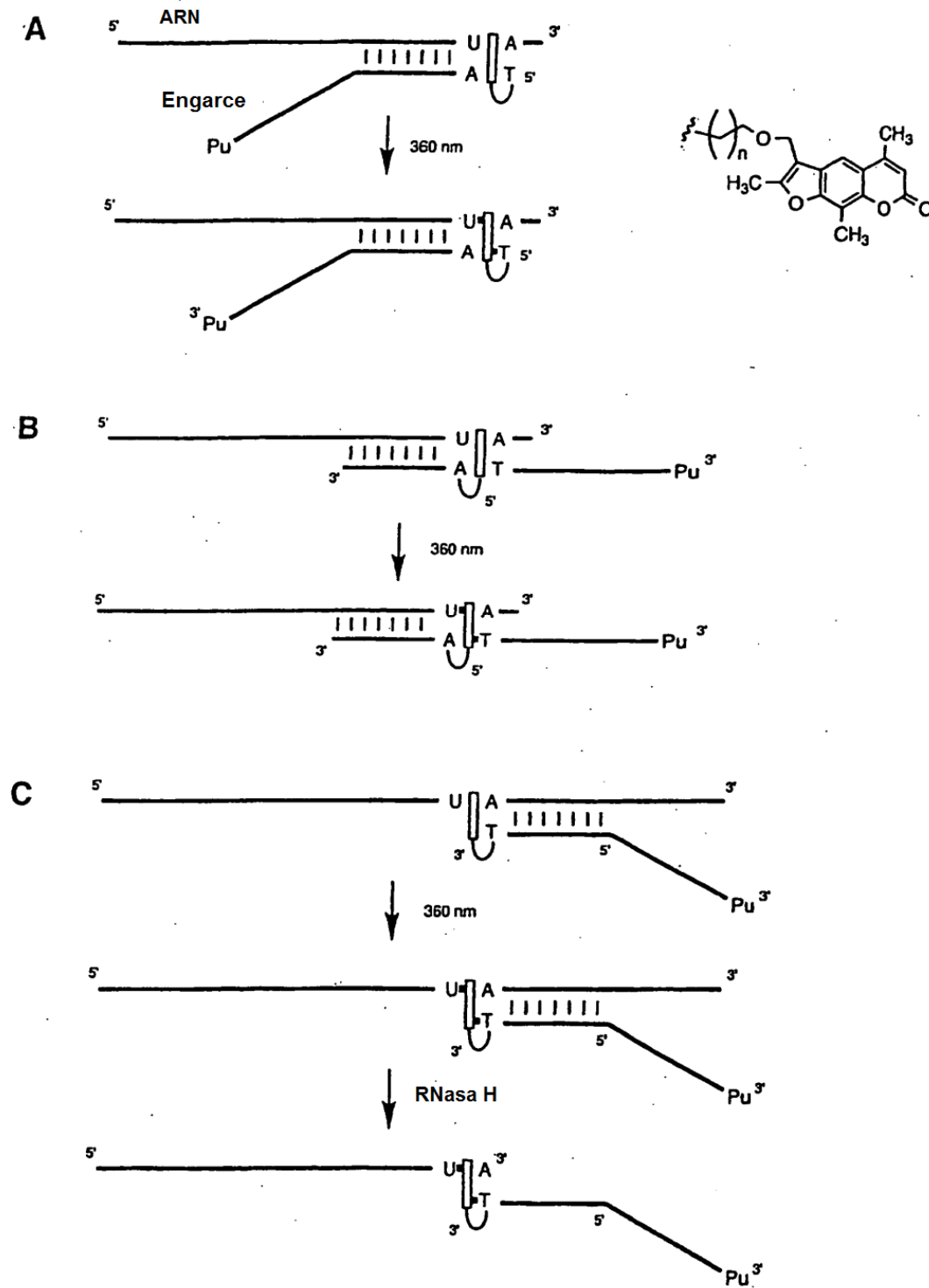


FIGURA 5

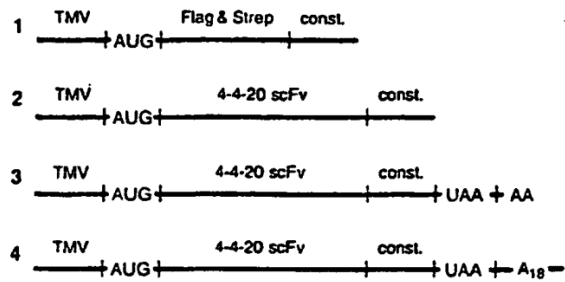
Ligación Química



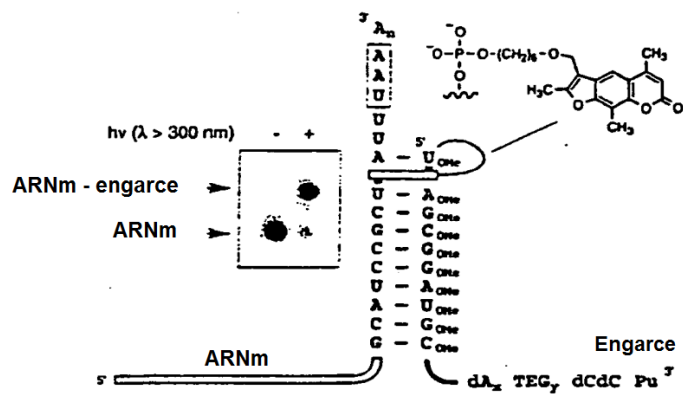
Formación de Fotoentrecruzamientos



D



E



Engarce	Composición $dA_x \text{ TEG}_y$	Longitud aproximada [unidades de nucleótido]
A:	$x = 20, y = 4$	40
B:	$x = 18, y = 2$	35
C:	$x = 13, y = 2$	30
D:	$x = 8, y = 2$	25
E:	$x = 12, y = 0$	25
F:	$x = 0, y = 6$	25

FIGURAS 7D-7E

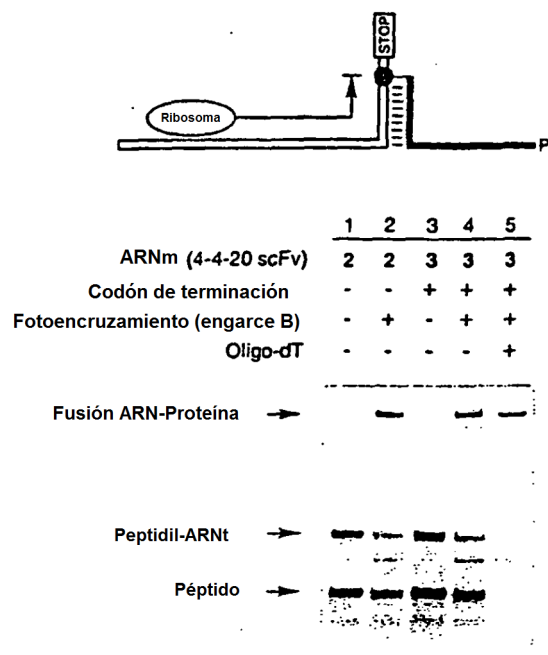


FIGURA 7F

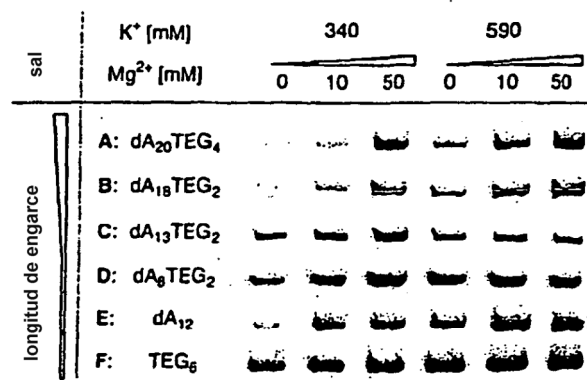


FIGURA 7G

Esquema de Purificación de ARN basada en Biotina Fotoescindible y Ligación

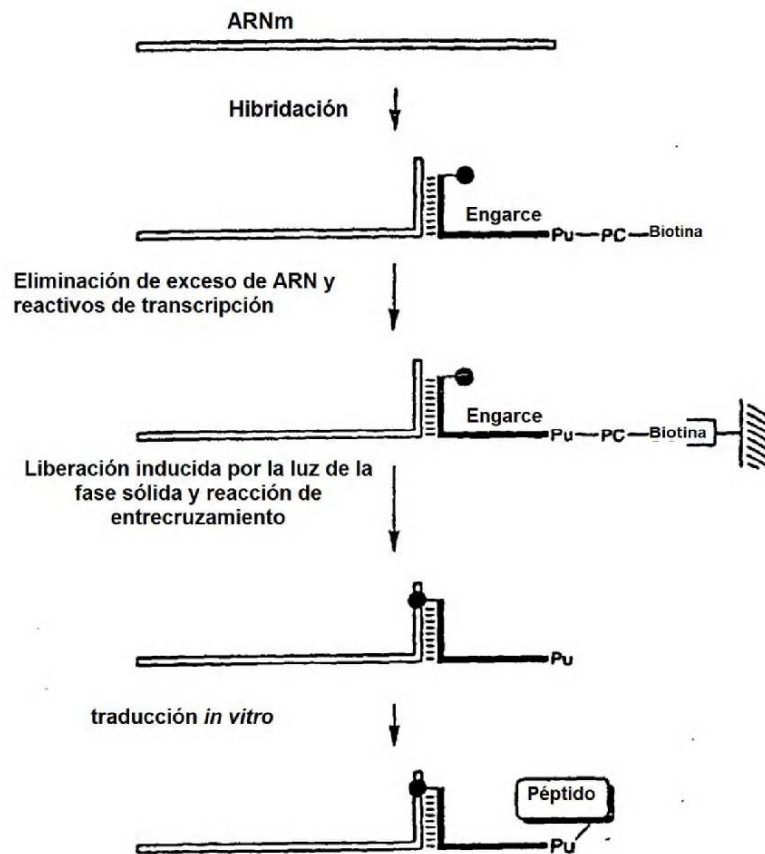


FIGURA 7H

Unión de Engarces a través de la Formación de Tríplex de $(ANP)_2$ - ARN

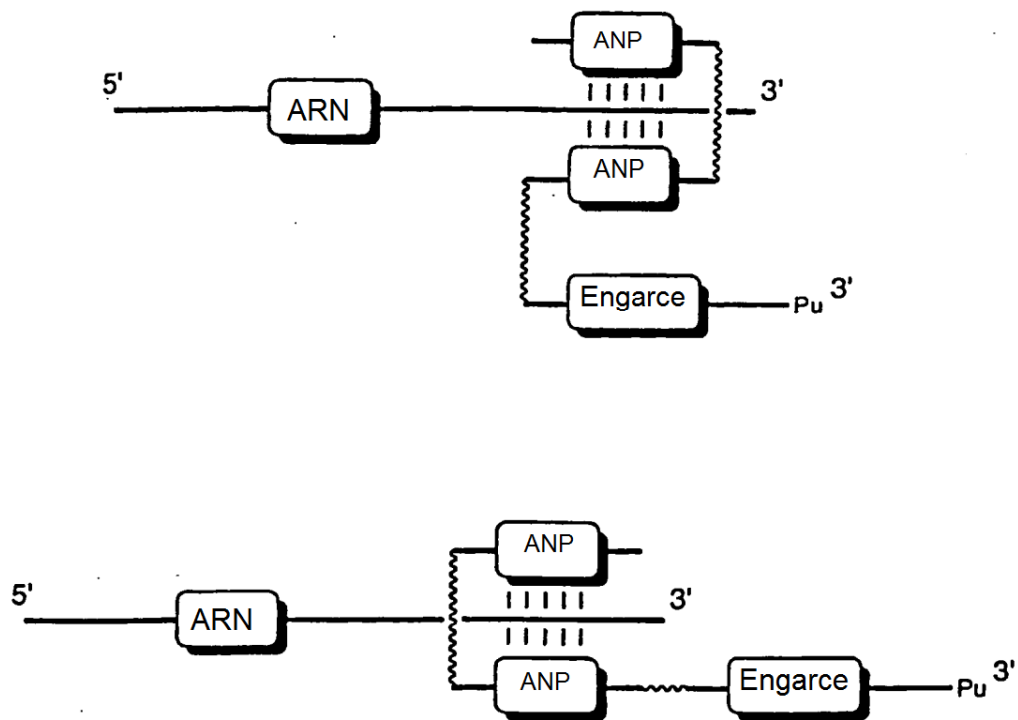


FIGURA 8A

Síntesis de Conjugados de ANP - Engarce

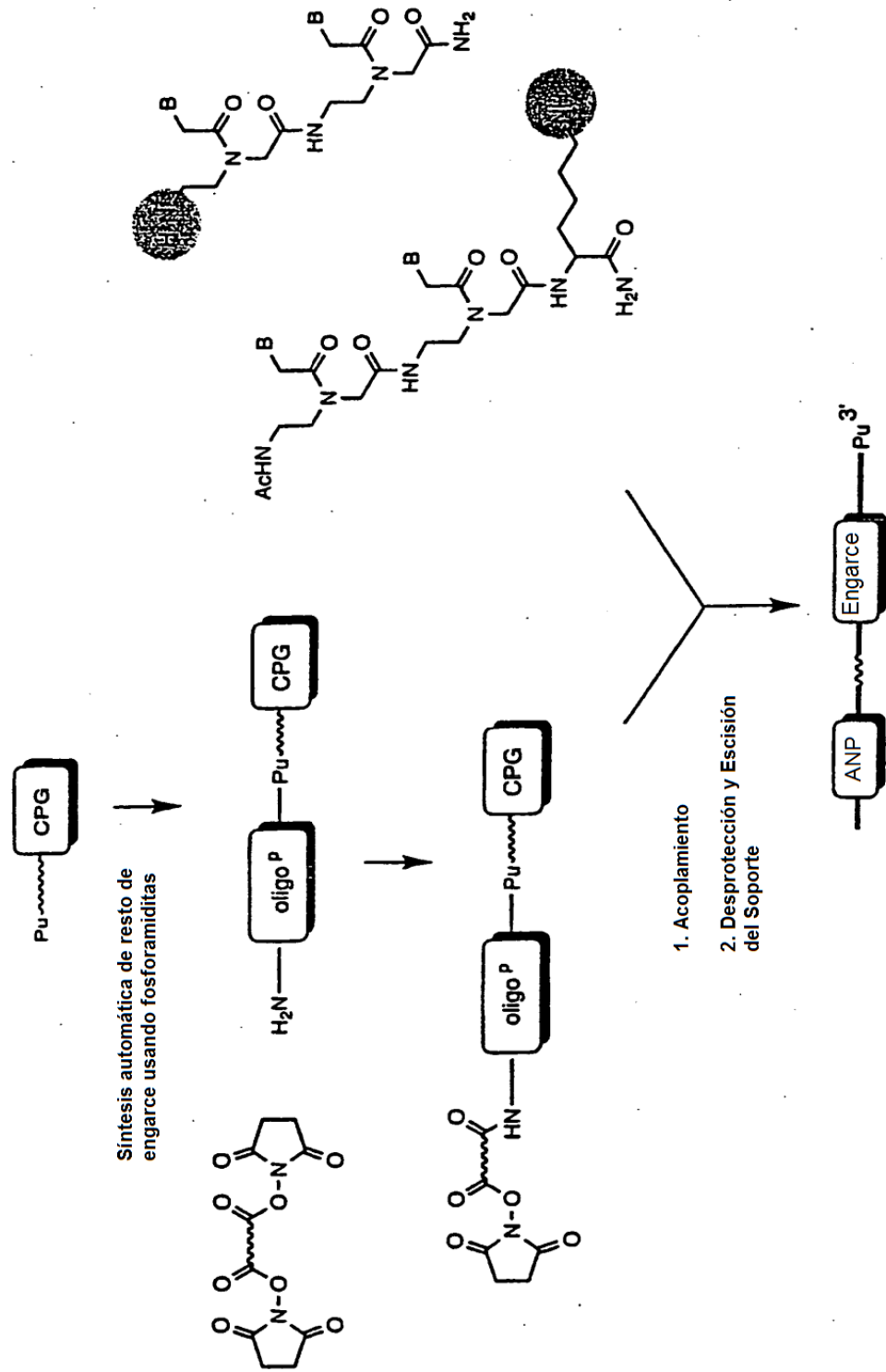


FIGURA 8B