

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 835**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

**C12P 1/00** (2006.01)

**C12P 19/34** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

**C07H 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2002 E 07114663 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 1905829**

54 Título: **Moléculas y métodos con plantilla para el uso de tales moléculas**

30 Prioridad:

**20.06.2001 DK 200100962**

**15.03.2002 DK 200200415**

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

**27.05.2016**

73 Titular/es:

**NUEVOLUTION A/S (100.0%)**

**RØNNEGADE 8, 5TH FLOOR**

**2100 COPENHAGEN, DK**

72 Inventor/es:

**PEDERSEN, HENRIK;**

**GOUILAEV, ALEX HAAHR;**

**SAMS, CHRISTIAN KLARNER;**

**SLØK, FRANK ABILGAARD;**

**FRESKGÅRD, PER-OLA;**

**HOLTMANN, ANETTE;**

**KAMPMANN OLSEN, EVA;**

**HUSEMOEN, GITTE NYSTRUP;**

**FELDING, JAKOB;**

**FRANCH, THOMAS;**

**THISTED, THOMAS;**

**HYLDTOFT, LENE;**

**NØRREGAARD-MADSEN, MADS;**

**GODSKESEN, MICHAEL ANDERS y**

**SCHRØDER GLAD, SANNE**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 571 835 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**Moléculas y métodos con plantilla para el uso de tales moléculas****Descripción**5 **Área técnica del invento**

10 **[0001]** Los sistemas biológicos permiten la síntesis dirigida por plantillas de los  $\alpha$ -péptidos. Éste invento habilita un sistema que permite la síntesis dirigida por plantillas de otros tipos de polímeros, así como de  $\alpha$ -péptidos. Éste invento se refiere a moléculas de plantillas y moléculas modeladas vinculadas a una plantilla predeterminada. Las moléculas de plantillas comprenden una secuencia de grupos funcionales que están enlazados entre sí. Cada grupo funcional es enlazado inicialmente a un elemento capaz de complementar un elemento de codificación predeterminado de la plantilla. Después de la complementación de un elemento codificador, o la complementación de una pluralidad de elementos codificadores, los grupos funcionales anexados son enlazados y las moléculas de plantillas son formadas.

15 **Antecedentes**

20 **[0002]** El dogma central en la biología describe el flujo de información como un proceso de una vía desde el ADN al ARN al polipéptido. Asimismo, el ADN es transcrito por una polimerasa de ARN a ARNm; y el ARNm es traducido subsiguientemente a proteínas por los ribosomas y por los ARNts.

25 **[0003]** La relación directa entre el ADN y la proteína, es decir, el hecho de que la secuencia de codones trillizos definen la secuencia de los residuos de los  $\alpha$ -aminoácidos en un polipéptido, ha permitido el desarrollo de numerosos métodos biológicos moleculares, en los cuales el experimentador manipula el ADN (muta, recombina, elimina, inserta, etc.), y luego lo usa en sistemas in vivo (por ejemplo, microbios) o sistemas in vitro (por ejemplo, Zubay en sistemas de expresión in vitro) para transferir los cambios resultantes del nivel de ADN al nivel del polipéptido de plantillas, es decir, mutar, recombinar, eliminar, insertar, etcétera al polipéptido.

30 **[0004]** Algunos sistemas han sido inventados que permiten un flujo de información desde el polipéptido al ADN. Estos sistemas son la presentación de fagos, la presentación de ribosomas/polisomas, la presentación de péptidos en plásmidos, y otros sistemas. Estos sistemas introducen un vínculo físico entre la plantilla (por ejemplo, el ADN) y la molécula de la plantilla (el polipéptido). Como resultado de esto, es posible, a partir de una población de moléculas de plantilla enlazada a la plantilla que formó la síntesis de la molécula, enriquecer primero una característica deseada de la molécula de la plantilla (por ejemplo, enlazar a la molécula de la plantilla a una columna de afinidad), y entonces amplificar la población enriquecida de moléculas de plantilla por medio de la amplificación de su plantilla (ADN o ARN), seguido de la interpretación de las plantillas amplificadas. Estos métodos han sido utilizados para identificar a polipéptidos con características nuevas y/o mejoradas a partir de bibliotecas que varían desde 1,000,000 a alrededor de  $10^{15}$  polipéptidos.

40 **[0005]** La característica crítica de los sistemas anteriores en la industria es la capacidad de amplificación de la molécula de la plantilla, a través de la amplificación de su plantilla. Por lo tanto, después del paso de selección en el cual las moléculas con la propiedad deseada son enriquecidas, la población enriquecida podría ser amplificada y tomada a través de un paso de selección, etc.- el proceso de selección y amplificación podría ser repetido muchas veces. En esta forma la "interferencia" del ensayo de selección es promediado a través de algunas rondas de selección-y-amplificación, y aún si el paso de selección individual sólo enriquece, por ejemplo, 10 veces, un enriquecimiento teórico de  $10^{12}$  puede ser alcanzado después de 12 rondas de selección-y-amplificación. Si las moléculas no tuviesen la capacidad de ser amplificadas, el mismo enriquecimiento tendría que ser alcanzado en un solo paso de examinación, lo que significa que el enriquecimiento en este paso único tendría que ser de  $10^{12}$ , y el ensayo todavía debería tener la misma rigidez general (precisión). Esto es prácticamente imposible con las tecnologías actuales.

55 **[0006]** En el campo de la química, un método combinatorio diferente ha sido desarrollado. Éste método involucra la síntesis en paralelo de millones de compuestos relacionados, en una matriz (donde cada posición definida es un compuesto específico), o en micro-esferas (donde una micro - esfera portaba muchas copias del mismo compuesto). La población de los compuestos fue entonces examinada para detectar características deseadas. En una forma importante, este tipo de biblioteca combinatoria no tiene forma de amplificarse, y por lo tanto requiere el uso de métodos de examinación muy exigentes, tal como se explicó anteriormente. Recientemente, la tendencia en, por ejemplo, la química médica, ha sido, por lo tanto, el uso de bibliotecas menos diversas, pero que son caracterizadas en una mejor forma.

60 **[0007]** Principios para marcar bibliotecas químicas también han sido desarrollados. Por ejemplo, sistemas que utilizaron oligos de ADN para marcar bibliotecas de moléculas han sido desarrollados tal como se expone en forma de ejemplo en este documento más adelante. La marcación es utilizada como un medio de identificación, pero no puede ser utilizada para modelar la síntesis de la molécula marcada. Por lo tanto, a pesar de la marcación, estos sistemas todavía requieren un método de examinación muy eficiente.

65

[0008] Las referencias listadas a continuación ilustran algunas de las fallas que se mencionaron anteriormente de los métodos anteriores en la industria en el campo del invento.

5 [0009] EP 0 604 552 B1 describe un método para sintetizar diversas colecciones de oligómeros. El invento comprende el uso de una marcación de reconocimiento para identificar la secuencia de monómeros en un oligómero. Las marcaciones identificadoras facilitan la identificación subsiguiente de las reacciones a través de las cuales los miembros de una biblioteca de diferentes compuestos sintéticos han sido sintetizados en forma de un componente a la vez.

10 [0010] EP 0 643 778 B1 se refiere a bibliotecas químicas combinatorias codificadas. Cada colección de polipéptidos es etiquetada por medio de una marcación "genética" anexa, construida por medio de síntesis química, para suministrar una vía "retro-genética" para especificar a cada polipéptido.

15 [0011] EP 0 773 227 A1 se refiere a un método para preparar un nuevo medicamento farmacéutico o reactivo de diagnóstico, que incluye el paso de examinar, en relación a un ligando o receptor, una biblioteca de diferentes compuestos sintéticos que son obtenibles por medio de la síntesis en forma de un componente a la vez.

20 [0012] US 4,863,857 se refiere a un método para determinar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido que es complementario a por lo menos una porción de un péptido o proteína original. En un aspecto, el método comprende: (a) determinar una primera secuencia de nucleótidos de una primera codificación de ácidos nucleicos para la biosíntesis de por lo menos una porción del péptido o de la proteína original; (b) determinar una 2ª secuencia de nucleótidos de un 2º ácido nucleico del cual su base se empareja con la primera secuencia de nucleótidos del primer ácido nucleico, el primer y 2º ácidos nucleicos se emparejan en direcciones anti-paralelas; y (c) determinar la secuencia de aminoácidos del polipéptido complementario por la 2ª secuencia de nucleótidos cuando se lee en el mismo marco de lectura que la primera secuencia de nucleótidos.

25 [0013] US 5,162,218 se refiere a composiciones de polipéptidos que tienen un lugar específico de enlace para un ligando objetivo específico y además tienen una funcionalidad activa en las proximidades del lugar del enlace. La funcionalidad activa podría ser una molécula reportadora, en cuyo caso las composiciones de los polipéptidos son útiles para realizar ensayos en relación al ligando objetivo. Además, se presentan métodos para preparar polipéptidos que tienen funcionalidades activas en las proximidades de sus lugares de enlace, cuyo método comprende el paso de combinar el polipéptido específico para el ligando objetivo con una marcación de afinidad que tiene un grupo reactivo anexado a este. El grupo reactivo es adherido covalentemente a una cadena lateral del aminoácido en la proximidad del lugar de enlace y separada del sustrato. El sustrato es eluido subsiguientemente, dejando una partícula del grupo reactivo adherida en forma covalente al polipéptido. La funcionalidad activa puede ser adherida entonces a la partícula.

30 [0014] US 5,270,170 se refiere a una biblioteca de péptidos aleatorios construida al transformar a células anfitrionas con una colección de vectores recombinantes que codifican a una proteína de fusión comprendida de una proteína enlazadora de ADN y un péptido aleatorio y también codifican a un lugar de enlaces para la proteína enlazadora de ADN. La proteína de fusión puede ser utilizada para examinar ligandos. El método de examinación resulta en la formación de un complejo que comprende a la proteína de fusión enlazada con un receptor a través del ligando de péptidos aleatorios y al vector recombinante de ADN a través de la proteína enlazadora de ADN.

35 [0015] US 5,539,082 se refiere a una nueva clase de compuestos, conocida como ácidos nucleicos de péptidos capaces de enlazar a ADNss y a hebras de ARN más fuertemente que el ADN correspondiente. Los ácidos nucleicos de péptidos generalmente comprenden a ligandos tales como bases de ADN que ocurren naturalmente adheridas a una estructura de péptido a través de un enlazador adecuado.

40 [0016] US 5,574,141 se refiere a materiales portadores funcionales lisados para la síntesis simultánea y la marcación directa de oligonucleótidos en calidad de cebadores para síntesis de ácidos nucleicos enzimáticos que dependen de plantillas. Los portadores poliméricos son cargados con bloques de construcción de ácidos nucleicos que a su vez contienen grupos de marcación o sus precursores. El portador polimérico cargado de esta forma sirve como una fase sólida o líquida para el ensamblaje de oligonucleótidos que pueden ser utilizados como cebadores para una síntesis enzimática de ácidos nucleicos que depende de plantillas tal como en un análisis de secuencias o en una reacción en cadena de polimerasas (PCR - polymerase chain reaction).

45 [0017] US 5,573,905 se refiere a una biblioteca química combinatoria codificada que comprende una pluralidad de moléculas bifuncionales que tienen un polímero químico y una secuencia identificadora de oligonucleótidos que define la estructura del polímero químico. También se describen a moléculas bifuncionales de la biblioteca, y a métodos para el uso de la biblioteca para identificar estructuras químicas dentro de la biblioteca que se enlazan a moléculas biológicamente activas en interacciones preseleccionadas de enlace.

50 [0018] US 5,597,697 se refiere a un ensayo de examinación para inhibidores y activadores de polimerasas de ácidos nucleicos que dependen del ARN y del ADN. El invento suministra métodos para la identificación y el descubrimiento de agentes que son inhibidores y activadores de polimerasas de ácidos nucleicos que dependen del ARN y del ADN.

La característica esencial del invento es la incorporación de una secuencia del lugar de enlace de la polimerasa funcional (PBS - polymerase binding site) a una molécula de ácido nucleico que es escogida por su habilidad de conferir una característica discernible por medio de su actividad específica secuencial de tal forma que la incorporación del PBS presenta a la molécula de ácido nucleico a una plantilla funcional para una polimerasa de ácido nucleico dirigida por una plantilla de ARN o de ADN. En la presencia de la polimerasa, de moléculas cebadoras adecuadas, y de cualquier molécula tipo accesorio necesaria, ocurre una extensión catalítica de la hebra de ácidos nucleicos complementarios a la plantilla, resultando en una eliminación parcial o total de (o un incremento de) la actividad que confiere la característica de la molécula reportadora-plantilla descrita debido a los efectos antisentido de la hebra complementaria u otros efectos regulados por la polimerasa.

**[0019]** US 5,639,603 se refiere a un método para sintetizar y examinar la diversidad molecular promedio de un método estocástico general para sintetizar compuestos. El método puede ser utilizado para generar colecciones grandes de compuestos marcados que pueden ser examinados para fortificar y aislar compuestos con propiedades útiles.

**[0020]** US 5,698,685 se refiere a una biblioteca combinatoria de morfolinos-sublimidades y un método para generar compuestos capaces de interactuar específicamente con un ligando seleccionado macromolecular. El método involucra contactar al ligando con una biblioteca combinatoria de oligómeros compuesta de subunidades de morfolinos con una variedad de cadenas laterales de bases nitrogenadas y de bases no nitrogenadas. Las moléculas de oligómeros que se enlazan específicamente al receptor están aisladas y sus secuencias de partículas base es determinada. También se presenta una biblioteca combinatoria de oligómeros útiles en los métodos y en composiciones poliméricas nuevas de morfolinos- subunidades.

**[0021]** US 5,708,153 se refiere a un método para la síntesis de colecciones diversas de compuestos marcados por medio de un método estocástico general para sintetizar oligómeros aleatorios en las partículas. Un aspecto adicional del invento se refiere al uso de marcaciones de identificación en las partículas para facilitar el reconocimiento de la secuencia monomérica en el oligómero.

**[0022]** US 5,719,262 se refiere a una clase nueva de compuestos, conocida como ácidos nucleicos de péptidos, que se enlazan a hebras complementarias de ADN y de ARN en una forma más fuerte que las hebras de ADN o de ARN correspondientes, y exhiben una especificidad y una solubilidad de secuencia incrementada. Los ácidos nucleicos de péptidos comprenden a ligandos seleccionados de un grupo que consiste de bases nitrogenadas que ocurren naturalmente y bases nitrogenadas que no ocurren naturalmente adheridas a una estructura de poliamida, y que contienen cadenas laterales de alquilaminas.

**[0023]** US 5,721,099 se refiere a bibliotecas químicas combinatorias codificadas con marcadores. La química combinatoria codificada es suministrada, por la cual los esquemas sintéticos secuenciales son registrados utilizando moléculas orgánicas, las cuales definen las opciones de los reactivos, y las etapas, como las mismas o diferentes porciones de información. Varios productos pueden ser producidos en la síntesis multi-etapa, tal como oligómeros y moléculas orgánicas no repetitivas sintéticas. Particularmente, pluralidades de identificadores pueden ser utilizadas para suministrar un código binario o más alto, para definir una pluralidad de opciones con solamente unas pocas marcaciones que puedan separarse. Las partículas pueden ser examinadas para detectar una característica de interés, particularmente afinidad de enlaces, donde los productos pueden ser separados de la partícula o retenidos en la partícula. El historial de reacciones de las partículas que son positivas para la característica puede determinarse por medio de la liberación de marcaciones y análisis para definir el historial de reacciones de la partícula.

**[0024]** US 5,723,598 se refiere a una biblioteca química combinatoria codificada conformada de una pluralidad de moléculas bifuncionales que tienen un polímero químico y una secuencia de oligonucleótidos identificadora que define la estructura del polímero químico. También se describe a las moléculas bifuncionales de la biblioteca, y los métodos para utilizar la biblioteca para identificar estructuras químicas dentro de la biblioteca que se enlazan a moléculas biológicamente activas en interacciones enlazadoras preseleccionadas.

**[0025]** US 5,770,358 se refiere a bibliotecas marcadas de oligómeros sintéticos y a un método estocástico general para sintetizar oligómeros aleatorios. El método puede ser utilizado para sintetizar compuestos para examinarlos para detectar propiedades deseadas. El uso de marcaciones de identificación en los oligómeros facilita la identificación de oligómeros con propiedades deseadas.

**[0026]** US 5,786,461 se refiere a ácidos nucleicos de péptidos que tienen cadenas laterales de aminoácidos. Una nueva clase de compuestos, conocida como los ácidos nucleicos de péptidos, enlazan a hebras complementarias de ADN y de ARN más fuertemente que las hebras correspondientes de ADN o de ARN, y exhiben una especificidad y una solubilidad secuencial incrementada. Los ácidos nucleicos de péptidos comprenden al ligando seleccionados de un grupo que consiste de bases nitrogenadas que ocurren naturalmente y bases nitrogenadas que no ocurren naturalmente adheridas a una estructura de poliamidas, y contienen cadenas laterales de alquilaminas.

**[0027]** US 5,789,162 narra un método para sintetizar colecciones diversas de oligómeros. Se presenta un método

estocástico general para sintetizar oligómeros aleatorios en partículas. Un aspecto adicional del invento narra el uso de marcaciones de identificación en las partículas para facilitar la identificación de la secuencia de los monómeros en el oligómero.

5 **[0028]** US 5,840,485 se refiere bibliotecas de fase sólida codificadas y segregadas topológicamente. Las bibliotecas de compuestos de prueba sintéticos son adheridas para separar soportes de síntesis de fases que también contienen moléculas purificadoras que codifican la estructura del compuesto sintético de prueba. Las moléculas pueden ser polímeros o varias moléculas no poliméricas. El compuesto sintético de prueba puede tener estructuras esenciales con vinculaciones tales como de amidas, de ureas, de carbamatos (es decir, de uretanos), de ésteres, de  
10 aminos, de sulfuros, de disulfuros, o de carbonos-carbonos, tal como de alcanos y de alquenos, o cualquiera de sus combinaciones. El compuesto sintético de prueba también puede ser un portador molecular, u otra estructura capaz de actuar en forma de un portador. El invento también narra métodos de síntesis de aquellas bibliotecas y el uso de aquellas bibliotecas para identificar y caracterizar moléculas de interés de la biblioteca de los compuestos sintéticos de prueba.

15 **[0029]** US 5,843,701 narra una evolución sistemática de polipéptidos por medio de interpretaciones reversa y un método para preparar ligándos de polipéptidos de moléculas objetivo donde mezclas candidatas comprendidas de complejos de ribosomas o de co-polímeros de ARNm:polipéptidos son divididos en relación a su afinidad para con el objetivo y amplificados para crear una nueva mezcla candidata enriquecida en complejos de ribosomas o co-polímeros de ARNm:polipéptidos con una afinidad para con el objetivo.

20 **[0030]** US 5,846,839 relata un método de marcación firme de una biblioteca sintética codificada. Se presentan métodos de codificación química para determinar la estructura de los compuestos formados in situ en soportes sólidos por medio del uso de marcaciones específicas aminas que, después de la síntesis del compuesto, pueden ser decodificadas para suministrar la estructura del compuesto encontrado en el soporte.

25 **[0031]** US 5,922,545 relata métodos y composiciones para identificar péptidos y anticuerpos de una sola cadena que se enlazan a receptores predeterminados o epítomos. Aquellos péptidos y anticuerpos son identificados por medio de métodos de examinación de la afinidad de polisomas que muestran péptidos nacientes.

30 **[0032]** US 5,958,703 relata métodos para la examinación de bibliotecas de complejos para compuestos que tienen una propiedad deseada tal como la capacidad de enlazarse a un receptor celular. Los complejos en aquellas bibliotecas comprenden un compuesto bajo prueba, una marcación que registra por lo menos un paso de la síntesis del compuesto, y una atadura susceptible a modificaciones por una molécula reportadora. La modificación de la atadura es utilizada para señalar que un complejo contiene a un compuesto que tiene una propiedad deseada. La marcación puede ser decodificada para revelar por lo menos un paso de la síntesis de aquel compuesto.

35 **[0033]** US 5,986,053 relata complejos de ácidos nucleicos de péptidos de 2 hebras de ácidos nucleicos de péptidos y de una sola hebra de ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos de péptidos y los análogos de ácidos nucleicos de péptidos son utilizados para formar estructuras duplex, triples y de otros tipos con ácidos nucleicos y para modificar a ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos de péptidos y sus análogos también son utilizados para modular la actividad proteínica a través de, por ejemplo, una suspensión de transcripción, una iniciación de transcripción, y una división de lugar específica de ácidos nucleicos.

40 **[0034]** US 5,998,140 describe métodos y composiciones para formar complejos intracelulares entre ADNds y oligómeros de heterociclos, aminoácidos alifáticos, particularmente aminoácidos Omega, y un grupo polar extremo. Por medio de una opción apropiada de secuencias objetivo y la composición de oligómeros, complejos son obtenidos con constantes bajas de disociación.

45 **[0035]** US 6,060,596 describe una biblioteca química combinatoria codificada comprendida de una pluralidad de moléculas bifuncionales que tienen a un polímero químico y a una secuencia identificadora de oligonucleótidos que definen a la estructura del polímero químico. También se describen a moléculas bifuncionales de la biblioteca, y a métodos para el uso de la biblioteca para identificar estructuras químicas dentro de la biblioteca que se enlazan a moléculas biológicamente activas en interacciones de enlace preseleccionadas.

50 **[0036]** US 6,080,826 describe a la polimerización de metátesis de clausura y de apertura de anillos dirigida por plantillas de dienos funcionalizados. Se presentan a olefinas cíclicas funcionalizadas y métodos para elaborarlas. Los métodos incluyen la metátesis de clausura anular dirigida por plantillas ("RCM" - (ring-closing metathesis)) de dienos funcionalizados acrílicos y la despolimerización dirigida por plantillas de polímeros funcionalizados que poseen regularmente lugares separados de insaturación. Aunque las especies de plantillas pueden ser cualquier anión, catión, o compuesto dipolar, las especies catiónicas, especialmente los metales alcalinos, son preferidos. También se presentan a polímeros funcionalizados con lugares separados regularmente de insaturación y métodos para elaborarlos. Un método para la síntesis de estos polímeros es por medio de la polimerización de metátesis de apertura a anular ("ROMP" - ring-opening metathesis polymerization) de olefinas cíclicas funcionalizadas.

55 **[0037]** US 6,127,154 describe los compuestos que poseen una estructura complementaria a una molécula deseada,

tal como una biomolécula, en particular se presentan compuestos poliméricos u oligoméricos, que son útiles como agentes de diagnóstico y terapéuticos in vivo o in vitro. Además, se presentan varios métodos para la producción de aquellos compuestos.

5 **[0038]** US 6,140,493 describe un método para sintetizar colecciones diversas de oligómeros. Se presenta un método estocástico general para sintetizar a oligómeros aleatorios y puede ser utilizado para sintetizar compuestos para examinar y detectar propiedades deseadas. Marcaciones de identificación en los oligómeros facilita la identificación de oligómeros con las propiedades deseadas.

10 **[0039]** US 6,140,496 describe a bloques de construcción para preparar oligonucleótidos que portan bases nitrogenadas que no son estándar que puede emparejarse con bases nitrogenadas complementarias que no son estándar para cuadrar dentro de la geometría Watson-Crick. La pareja base resultante se une a un anillo monocíclico de 6 miembros con un sistema anular de heterocíclico bicíclico fusionado compuesto de un anillo de 5 miembros fusionado con un anillo de 6 miembros, con la orientación de los heterociclos entre sí y con relación a la  
15 cadena estructural análoga a aquella encontrada en el ADN y en el ARN, pero con un patrón de enlaces de hidrógeno que mantienen a la pareja base junta y es diferente de aquella encontrada en las parejas base de AT y de GC (una "pareja base no estándar").

**[0040]** US 6,143,497 describe un método para sintetizar colecciones diversas de oligómeros aleatorios en partículas por medio de un método estocástico general. Además, se presentan marcaciones de identificación ubicadas en las partículas y utilizadas para facilitar la identificación de la secuencia de los monómeros en el oligómero.

**[0041]** US 6,165,717 describe un método estocástico general para sintetizar oligómeros aleatorios en partículas. También se presentan marcaciones de identificación ubicadas en las partículas para facilitar la identificación de la  
25 secuencia de los monómeros en el oligómero.

**[0042]** US 6,175,001 describe nucleósidos y nucleótidos funcionalizados de pirimidina y ADNs que incorporan a los mismos. Los nucleósidos modificados de pirimidina son derivados en el C5 para contener un grupo funcional que  
30 mimetiza la propiedad de residuos de aminoácidos que ocurren naturalmente. También se suministran moléculas de ADN que contienen a los nucleótidos modificados.

**[0043]** US 6,194,550 B1 describe la evolución de polipéptidos sistemáticos por medio de interpretaciones en reversa, en particular un método para preparar ligandos de polipéptidos de moléculas objetivas donde las mezclas candidatas comprendidas de complejos de ribosomas o co-polímeros de ARNm:polipéptidos son divididas en  
35 relación a su afinidad para con el objetivo y amplificadas para crear una nueva mezcla candidata enriquecida con complejos de ribosomas o co-polímeros de ARNm:polipéptidos con una afinidad en relación al objetivo.

**[0044]** US 6,207,446 B1 se refiere a los métodos y a los reactivos para la selección de moléculas proteínicas que utilizan a fusiones proteínicas de ARN.

40 **[0045]** US 6,214,553 B1 se refiere a métodos y reactivos para la selección de moléculas proteínicas que hacen uso de fusiones proteínicas de ARN.

**[0046]** WO 91/05058 se refiere a un método para la síntesis libre de células y el aislamiento de genes y polipéptidos nuevos. Una unidad de expresión es construida en la cual están adheridas las secuencias semi-aleatorias de  
45 nucleótidos. Las secuencias semi-aleatorias de nucleótidos son transcritas primero para producir el ARN, y luego se interpretan bajo condiciones tales como las que fueron usadas para producir a los polisomas. Los polisomas que se enlazan a una sustancia de interés son aislados entonces y por ende interrumpidos; y el ARNm relacionado es recuperado. El ARNm es utilizado para construir una cADN que es expresada para producir nuevos polipéptidos.

50 **[0047]** WO 92/02536 describe un método para preparar ligandos de polipéptidos de moléculas objetivo donde la mezcla candidata comprende a complejos de ribosomas de co-polímeros de ARNm:polipéptidos que son divididos en relación a su afinidad en relación al objetivo y amplificadas para crear una nueva mezcla candidata enriquecida con complejos de ribosomas o co-polímeros de ARNm:polipéptidos con una afinidad en relación al objetivo.

55 **[0048]** WO 93/03172 describe un método para preparar ligandos de polipéptidos de moléculas objetivo donde las mezclas candidatas son conformadas de complejos de ribosomas o co-polímeros de ARNm:polipéptidos que son divididas en relación a su afinidad para con el objetivo y amplificadas para crear una nueva mezcla candidata enriquecida con complejos de ribosomas de co-polímeros de ARNm:polipéptidos con una afinidad en relación al  
60 objetivo.

**[0049]** WO 93/06121 describe un método estocástico general para sintetizar oligómeros aleatorios en partículas. También se presentan marcaciones de identificación ubicadas en las partículas para facilitar la identificación de la  
65 secuencia de los monómeros en el oligómero.

**[0050]** WO 00/47775 describe un método para generar fusiones proteínicas de ARN que involucran un paso

posterior interpretación de altos niveles salinos.

**[0051]** WO 00/32823 describe métodos para marcar covalentemente a proteínas con sus secuencias codificadores de ADN.

5 **[0052]** Kurz et al. ChemBioChem. vol. 2, 2001, 666-672, describe un método para la síntesis de fusiones proteínicas covalentes de ADNc para aplicaciones de muestras proteínicas.

10 **[0053]** Gartner et al. J. Am. Chem. Soc. Vol. 123, 2001, 6961-6963, describe síntesis de ADN por medio de plantillas.

**[0054]** WO 02/074929 describe una síntesis de ADN por medio de plantillas.

15 **[0055]** WO 00/61775 describe un método para la síntesis de sustancias biológicamente activas de estructuras determinadas directamente en las células de los organismos vivos.

20 **[0056]** WO 00/23458 describe bibliotecas químicas combinatorias por medio de plantillas conformadas de una pluralidad de moléculas bifuncionales que tienen un compuesto químico y una marcación de ácidos nucleicos que define la estructura del compuesto químico y dirige su síntesis.

**[0057]** Walder et al. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 76, 1979, 51-55, describe un método para la síntesis de péptidos y que es propuesta en base a un esquema dirigido por plantillas.

25 **[0058]** EP 0 962 527 A1 describe moléculas que homologan a genotipos y a fenotipos.

**[0059]** WO 98/31700 describe métodos para la selección de moléculas proteínicas.

30 **[0060]** DE 196 46 372 describe a compuestos que comprenden una unidad estructural A (genotipo) y una unidad estructural adicional B (fenotipo), en la cual el genotipo y el fenotipo están vinculadas permanentemente entre sí.

**[0061]** Liu et al. Meth. Enzymol. Vol. 318, 2000, 268-293, describe un método para la síntesis de fusiones proteínicas de ARN.

35 **[0062]** Nazarenko et al. Nucl. Acids (Ácidos) Res. Vol. 25, 1997, 2516-2521, describe a un formato de tubo cerrado para la amplificación y detección de ADN que se basa en la transferencia de energía.

**[0063]** Visscher y Schwartz. J. Mol. Evol. Vol. 28, 1988, 3-6, describe una síntesis dirigida por plantillas de análogos de oligonucleótidos acíclicos.

40 **[0064]** Keiler et al. Science. Vol. 271, 1996, 990-993, describen un sistema de marcación de péptidos con degradación de proteínas sintetizadas a partir de ARN mensajeros dañados.

45 **[0065]** Salas et al. J. Am. Biol. Soc. Vol. 243, 1012-1015, describe a polideoxynucleotidos biosintéticos en forma de plantillas directas para la síntesis de polipéptidos.

**[0066]** Bruick et al. Curr. Biol. Vol. 3, 1996, 49-56, describen la ligación dirigida por medio de plantillas de péptidos a oligonucleótidos.

50 **[0067]** WO 98/56904 describe la formación de complejos enzimáticos combinatorios in vivo para su uso en la detección de agentes de medicamentos candidatos para detectar su bioactividad.

**[0068]** Giebel et al. Biochem. Vol. 34, 1995, 15430-15435, describe la examinación de bibliotecas de fagos de péptidos cíclicos y la identificación de ligandos.

55 **[0069]** Ladner et al. Trends Biotechnol. Vol. 13, 1995, 426-430, describe entidades enlazadoras en la forma de péptidos restringidos.

**[0070]** Koivunen et al. Bio/Technol. Vol. 13, 1995, 265-270, describe bibliotecas de fagos que muestran péptidos cíclicos con diferentes tamaños anulares.

60 **[0071]** Referencias adicionales que tiene relevancia para este invento incluyen a Bain et al. Nature (Naturaleza), vol. 356, 1992, 537-539; Barbas et al. Chem. Int. Ed. vol. 37, 1998, 2872-2875; Benner Reviews (Revisiones de Benner); Blanco et al. Analytical Biochemistry (Bioquímica Analítica) vol. 163, 1987, 537-545; Brenner et al. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 89, 1992, 5381-5383; Bresler et al. Biochimica et Biophysica (Bioquímica y Biofísica) Acta vol. 155, 1968, 465-475; Dewey et al. J. Am. Chem. Soc. Vol. 117, 1995, 8474-8475; Dietz et al. Photochemistry and photobiology (Fotoquímica y fotobiología) vol. 49, 1989, 121-129; Gryaznov et al. J. Am. Chem. Soc. vol. 115, 1993, 3808-3809;

Gryaznov et al. Nucleic Acids Research (Investigación de Ácidos Nucleicos) vol. 21, 1993, 1403-1408; Elmar Gocke Mutation Research (Investigación de Mutaciones) vol. 248, 1991, 135-143; Haeuptle et al. Nucleic Acids Research (Investigación de Ácidos Nucleicos), 14, 1986, 1427-1448; Hamburger et al. Biochimica et Biophysica (Bioquímica y Biofísica) Acta, 213, 1970, 115-123; Hamza A. El-Dorry Biochimica et Biophysica (Bioquímica y Biofísica) Acta vol. 867, 1986, 252-255; Herrera-Estrella et al. The EMBO Journal (La Revista EMBO), 7, 1988, 4055-4062; Heywood et al. Biochemistry (Bioquímica) vol. 57, 1967, 1002-1009; Heywood et al. J. Biol. Chem. Vol. 7, 1968, 3289-3296; Hooper et al. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Vol. 10, 1991, 223-231; Houdebine et al. Eur. J. Biochem., 63, 1976, 9-14; Johnson et al. Biochemistry (Bioquímica) vol. 25, 1986, 5518-5525; Kinoshita et al. Nucleic Acids Symposium Series (Series de Simposios de Ácidos Nucleicos) vol. 34, 1995, 201-202; Leon et al. Biochemistry (Bioquímica) vol. 26, 1987, 7113-7121; Maclean et al. Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América vol. 94, 1997, 2805-2810; Mattheakis et al. Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América vol. 91, 1994, 9022-9026; Menninger et al. Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Agentes Antimicrobianos y Quimioterapia), 21, 1982, 811-818; Menninger. Biochimica et Biophysica (Bioquímica y Biofísica) Acta, 240, 1971, 237-243; Mirzabekov Methods in Enzymology (Métodos de Enzimología) vol. 170, 1989, 386-408; Nikolaev et al. Nucleic Acids Research (Investigación de Ácidos Nucleicos) vol. 16, 1988, 519-535; Noren et al. Science (Ciencia) vol. 24, 1989, 182-188; Pashev et al. TIBS vol. 16, 1991, 323-326; Pargellis et al. The Journal of Biological Chemistry (La Revista de Química Biológica), 263, 1988, 7678-7685; Pansegrau et al. The journal of biological chemistry (La Revista de Química Biológica) vol.265, 1990, 10637-10644; Peeters et al. FEBS Lett. vol. 36, 1973, 217-221; Roberts et al. Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América vol. 94, 1997, 12297-12302; Schmidt et al. Nucleic Acids Research (Investigación de Ácidos Nucleicos) vol. 25, 1997, 4797-4802; Schutz et al. Nucleic Acids Research, (Investigación de Ácidos Nucleicos) 4, 1977, 71-84; Solomon et al. Proc. Natl. Acad. Sci Estados Unidos de América vol. 82, 1985, 6470-6474; Sugino et al. Nucleic Acids Research (Investigación de Ácidos Nucleicos), 8, 1980, 3865-3874; Tarasow et al. Nucleic Acids Sciences (Ciencias de Ácidos Nucleicos) vol. 48, 1998, 29-37; Wiegand et al. Chemistry and Biology (Química y Biología) vol. 4, 1997, 675-683; y Wower et al. Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América., 86, 1989, 5232-5236.

25

## Resumen del invento

**[0072]** Este invento resuelve en una forma general los problemas mencionados anteriormente y las fallas previas en la industria. El invento describe un sistema para modelar moléculas en general, tales como polímeros, y la plantilla permite la síntesis modelada de los polímeros, permitiendo, en secciones importantes, la amplificación del polímero. El sistema, por lo tanto, tiene las mismas características generales que el sistema natural (flujo de información desde la plantilla a la molécula modelada), así como las características de los sistemas mediados por ribosomas recientemente inventados (por ejemplo, la presentación de fagos), específicamente el enlace físico entre la plantilla y la molécula modelada. Sin embargo, este invento no involucra a ribosomas o a ARNs, y, por lo tanto, habilita la modelación de una amplia gama de polímeros diferentes, incluyendo a polímeros que no pueden ser sintetizados en un sistema natural que se basa en la interpretación mediada por ribosomas de los ácidos nucleicos.

**[0073]** El proceso de modelaje del invento tiene ventajas significativas en lo que se refiere al conocimiento de la industria. Puesto que la amplificación de las moléculas recuperadas (es decir, sus plantillas) puede realizarse por un proceso en paralelo en el cual todas las plantillas recuperadas están presentes en el mismo compartimiento (por ejemplo, un tubo reactivo o un pozo de placas de micro titulación), y donde las moléculas son amplificadas proporcionalmente, ningún invento humano tal como la secuenciación de moléculas individuales es necesario. Esta es una ventaja enorme puesto que una recuperación típica después de la primera ronda selectiva involucra a, por ejemplo,  $10^{10}$  moléculas diferentes, cuando el material inicial es una biblioteca de, por ejemplo,  $10^{15}$  moléculas. Cuando se trabaja con aquellos números altos de moléculas, es prácticamente imposible el "amplificar"  $10^{10}$  moléculas al copiar las moléculas una a la vez, es decir, "amplificar" las moléculas en un proceso en serie.

**[0074]** Este invento describe generalmente las moléculas modeladas y los complejos que comprenden a aquellas moléculas enlazadas a la plantilla que ha dirigido la síntesis de la molécula modelada. En un aspecto, las moléculas modeladas y los complejos son capaces de obtenerse de acuerdo a los métodos de este invento.

**[0075]** Este invento también presenta métodos para la síntesis de aquellas moléculas modeladas y/o complejos, métodos para la dirección de aquellas moléculas y/o complejos para una especie objetiva. Las moléculas modeladas son preferiblemente sintetizadas a partir de bloques de construcción que comprenden una entidad funcional que tiene un grupo funcional y un grupo reactivo capaz de enlazarse covalentemente a grupos funcionales y formar una molécula modelada. La entidad funcional de un bloque de construcción es separada de un elemento complementario por medio de un enlazador divisible, o un enlazador selectivamente divisible. El elemento complementario es capaz de complementar un elemento codificador predeterminado de la plantilla, asegurando, entonces, una relación de uno a uno entre el elemento codificador-o un elemento complementario-y una entidad funcional, o un grupo funcional.

**[0076]** También se presentan métodos para identificar la secuencia de grupos funcionales de una molécula modelada, así como métodos para la terapia y el diagnóstico que aprovechan a moléculas modeladas de acuerdo al invento.

**[0077]** Los métodos del invento no involucran a la interpretación mediada por ribosomas de ácidos ribonucleicos. Además, cuando las moléculas modeladas son péptidos que comprenden a ya sea i) exclusivamente  $\alpha$ -aminoácidos,

o ii) aminoácidos que ocurren sustancialmente exclusivamente naturalmente, tal como por lo menos el 80%, por ejemplo, el 90%, tal como el 95%, los aminoácidos que ocurre naturalmente. La plantilla no comprende o consiste esencialmente de un ácido ribonucleico.

5 **[0078]** Una plantilla denota una secuencia de elementos de codificación, donde cada elemento de codificación está enlazado a un elemento de codificación cercano. Una plantilla complementaria denota una secuencia de elementos complementarios, donde cada elemento complementario está enlazado a un elemento complementario cercano.

10 **[0079]** Después de la complementación de un elemento codificador por un elemento complementario, o la complementación de una pluralidad de elementos codificadores por una pluralidad de elementos complementarios, cada elemento complementario definirá un grupo funcional anexo capaz de enlazarse sin formar parte de la plantilla complementaria en sí a un grupo funcional cercano definido por un elemento complementario cercano. Asimismo, en una sección importante, el grupo funcional no participa en la complementación de un elemento codificador mientras no exista una reacción o hibridación directa entre el elemento codificador y el grupo funcional. El término "reacción" significa cualquier contacto reactivo que resulta en la formación de una interacción-covalente o no covalente entre el grupo funcional y el elemento codificador. En otra sección, el grupo funcional de una molécula modelada forma parte de la plantilla complementaria.

20 **[0080]** Puesto que cada elemento complementario es capaz de reconocer un elemento codificador predeterminado de una plantilla, y puesto que cada elemento codificador a su vez define un grupo funcional predeterminado, la secuencia de los elementos de codificación de la plantilla modelarán la síntesis de la molécula modelada conformada de una secuencia predeterminada de grupos funcionales enlazados covalentemente.

25 **[0081]** De acuerdo a secciones importantes de este invento, es posible:  
 i) enlazar una molécula modelada que comprende una pluralidad de grupos funcionales a la plantilla que modela la síntesis de la molécula modelada,  
 ii) enlazar grupos funcionales cercanos simultáneamente con la complementación de los elementos codificadores cercanos por medio de elementos complementarios que definen a dichos grupos funcionales,  
 30 iii) enlazar a grupos funcionales cercanos después de la complementación de los elementos codificadores cercanos por medio de elementos complementarios que definen a dichos grupos funcionales,  
 iv) enlazar a grupos funcionales cercanos simultáneamente con la formación de una plantilla complementaria,  
 v) enlazar a grupos funcionales cercanos después de la formación de una plantilla complementaria,  
 vi) dividir uno o más enlaces entre elementos complementarios de una plantilla complementaria sin dividir enlaces entre grupos funcionales de una molécula modelada, y viceversa, y  
 35 vii) dividir por lo menos a un enlazador separando al a por lo menos una entidad funcional del por lo menos un elemento complementario de un bloque de construcción sin dividir la plantilla complementaria,  
 viii) dividir al por lo menos un enlazador separando a la por lo menos una entidad funcional del por lo menos un elemento complementario de un bloque de construcción sin separar el enlace entre los grupos funcionales de la molécula modelada, y  
 40 ix) dividir al por lo menos un enlazador separando a la por lo menos una entidad funcional de por lo menos un elemento complementario de un bloque de construcción sin dividir a la plantilla complementaria y sin dividir al enlace entre los grupos funcionales de la molécula modelada.

45 **[0082]** Siempre y cuando el complemento de los elementos codificadores cercanos se logre, los grupos funcionales cercanos de la molécula modelada son capaces de enlazarse sin importar si una plantilla complementaria es formada. Además, es posible enlazar a grupos funcionales cercanos y subsiguientemente dividir al enlazador divisible separando la entidad funcional del elemento complementario definiendo a dicha entidad funcional sin dividir el enlace entre los grupos funcionales cercanos de una molécula modelada. Los enlazadores divisibles son separables bajo condiciones donde un enlazador selectivamente divisible no es separable. Asimismo, es imposible el dividir enlazadores separables que enlazan a elementos complementarios y a grupos funcionales en una molécula modelada sin al mismo tiempo dividir selectivamente a enlazadores separables que enlazan en la misma molécula modelada a un subconjunto de elementos complementarios y grupos funcionales. Es, por lo tanto, posible obtener un complejo comprendido de una molécula modelada y la plantilla que ha dirigido a la síntesis regulada por la plantilla de la molécula modelada, donde la plantilla y la molécula modelada están enlazadas por uno o más,  
 50 preferiblemente un, enlazador divisible selectivamente.

60 **[0083]** La generación de moléculas modeladas puede dirigirse por la plantilla sin ninguna necesidad de secuenciaciones o cualquier otra forma de caracterizaciones. Esto no es posible utilizando las "marcaciones" generadas previamente en la industria producidas por síntesis paso a paso. Asimismo, los complejos del invento que comprenden una molécula modelada enlazada a una plantilla facilitan una selección rápida y una amplificación deseable de moléculas modeladas.

65 **[0084]** En un primer aspecto, este invento suministra un método para la síntesis de moléculas modeladas que comprende a una pluralidad de grupos funcionales, donde dicho método comprende los pasos de:  
 i) suministrar por lo menos una plantilla que comprende a una secuencia de n elementos codificadores, donde cada elemento codificador comprende a por lo menos un grupo de reconocimiento capaz de reconocer un

elemento complementario predeterminado, y  
donde n es un número entero de más de uno,

ii) suministrar una pluralidad de bloques de construcción, donde cada bloque de construcción está conformado por:

5 a) por lo menos un elemento complementario que comprende a por lo menos un grupo de reconocimiento capaz de reconocer a un elemento codificador predeterminado,

b) por lo menos una entidad funcional comprendida de por lo menos un grupo funcional y por lo menos un grupo reactivo, y

10 c) Por lo menos un enlazador que separa a la por lo menos una entidad funcional del por lo menos un elemento complementario,

iii) contactar a cada uno de dichos elementos codificadores con un elemento complementario capaz de reconocer a dichos elementos codificadores,

15 iv) opcionalmente, obtener un elemento complementario, y

v) obtener una molécula modelada que comprende a grupos funcionales enlazados covalentemente por medio de enlaces, por medio de una reacción que comprende a grupos reactivos, a un grupo funcional de por lo menos una entidad funcional a un grupo funcional de otra entidad funcional,

20 donde la molécula modelada es capaz de ser enlazada por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada, y  
donde la síntesis de la molécula modelada no involucra la interpretación regulada por ribosomas de un ácido nucleico.

25 **[0085]** En otro aspecto, este invento describe una molécula modelada, una pluralidad de la misma o de diferentes moléculas modeladas, donde preferiblemente cada una de las moléculas modeladas es obtenible por medio de un método de síntesis de moléculas modeladas de acuerdo a este invento.

30 **[0086]** En la magnitud en que la molécula modelada y la plantilla son entidades separadas capaces de ser enlazadas por un solo enlazador, el invento también describe complejos que comprenden una molécula modelada enlazada a la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada. La plantilla que es capaz de modelar la síntesis de la molécula modelada comprende a una secuencia de elementos codificadores o a una secuencia de elementos complementarios, en cuyo caso la plantilla es una plantilla complementaria. Asimismo, es posible dividir enlaces entre grupos funcionales de una molécula modelada sin dividir una plantilla complementaria o una plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada.

35 **[0087]** En otro aspecto se suministra un método para la síntesis de un complejo que comprende una molécula modelada enlazada a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada, donde la molécula modelada y el complejo comprenden a la molécula modelada enlazada a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada son obtenibles por el método de su síntesis de acuerdo al invento.

40 **[0088]** En aspectos adicionales del invento se suministra una composición comprendida de una pluralidad de moléculas modeladas, donde cada una o por lo menos algunas de las moléculas modeladas están enlazadas a la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada, en cuyo caso se suministra una prioridad de complejos donde cada uno comprende una molécula modelada enlazada a la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada. Las composiciones también podrían comprender una molécula modelada y -desvinculada a esta- la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada.

45 **[0089]** La capacidad de amplificación de las moléculas modeladas de una biblioteca suministra una biblioteca con una característica única. Esta característica única comprende, por ejemplo, que un número enorme de moléculas modeladas puede ser examinado al tomar la biblioteca a través de procesos repetitivos de selección-y-amplificación, en un proceso paralelo donde la biblioteca de moléculas es tratada como una unidad, y donde no es necesario caracterizar a moléculas individuales (o inclusive la población de moléculas) entre rondas de selección-y-amplificación.

50 **[0090]** Es posible, de acuerdo a varias secciones preferidas del invento, el examinar, por ejemplo, más de alrededor de  $10^3$  moléculas modeladas diferentes, tal como más de o alrededor de  $10^4$ , por ejemplo más de o alrededor de  $10^5$  moléculas modeladas diferentes, tal como más de o alrededor de  $10^6$  moléculas modeladas diferentes, por ejemplo más de o alrededor de  $10^7$  moléculas modeladas diferentes, tal como más de o alrededor de  $10^8$  moléculas modeladas diferentes, por ejemplo más de o alrededor de  $10^9$  moléculas modeladas diferentes, tal como más que o  
55 alrededor de  $10^{10}$  moléculas modeladas diferentes, por ejemplo más de o alrededor de  $10^{11}$  moléculas modeladas diferentes, tal como más que o alrededor de  $10^{12}$  moléculas modeladas diferentes, por ejemplo más que o alrededor de  $10^{13}$  moléculas modeladas diferentes, tal como más de o alrededor de  $10^{14}$  moléculas modeladas diferentes, por ejemplo más de o alrededor de  $10^{15}$  moléculas modeladas diferentes, tal como más de o alrededor de  $10^{16}$  moléculas modeladas diferentes, por ejemplo más de o alrededor de  $10^{17}$  moléculas modeladas diferentes, tal como  
60 más de o alrededor de  $10^{18}$  moléculas modeladas diferentes.

[0091] Puesto que una persona puede realizar rondas repetitivas de selección en paralelo y procesos de amplificación en paralelo, es posible enriquecer únicamente, por ejemplo, 100 veces en cada ronda, y todavía obtener un enriquecimiento muy eficiente, de, por ejemplo,  $10^{14}$  veces sobre un número de rondas de selección y amplificación (teóricamente un enriquecimiento de  $10^{14}$  veces es obtenido después de 7 rondas que enriquecen cada  $1 \times 100$  veces). Para obtener un enriquecimiento similar al de  $10^{14}$  veces utilizando una biblioteca que no tiene la capacidad de amplificarse, eso requeriría condiciones de examinación que permitan un enriquecimiento de  $10^{14}$  veces en una "ronda"-y esto no es posible desde un punto de vista práctico utilizando tecnologías de examinación de última tecnología. Las moléculas modeladas y/o las plantillas pueden enlazarse además a un soporte sólido o semisólido.

[0092] Incluso en aspectos adicionales los métodos del invento-individualmente o en combinación-describen un método para la examinación de una composición de complejos o moléculas modeladas que tienen potencialmente una actividad predeterminada, un método para ejecutar ensayos de la actividad predeterminada que es asociada potencialmente con los complejos o las moléculas modeladas, un método para seleccionar complejos o moléculas que tienen una actividad predeterminada, un método para amplificar la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada que tiene, o que tiene potencialmente, una actividad predeterminada y un método para amplificar la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada que tiene, o que tiene potencialmente, una actividad predeterminada, donde dicho método comprende el paso adicional de obtener la molécula modelada en un monto mínimo correspondiente a un incremento de 2 veces.

[0093] En otro aspecto adicional se suministra un método para alterar la secuencia de una molécula modelada, incluyendo la generación de una molécula modelada que comprende una secuencia nueva o alterada de grupos funcionales, donde el método comprende el paso de mutar la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada original. El método comprende preferiblemente los pasos de:

i) suministrar una primera plantilla capaz de modelar a la primera molécula modelada, o una pluralidad de aquellas plantillas capaces de modelar una pluralidad de primeras moléculas modeladas, ii) modificar la secuencia de la primera plantilla, o la pluralidad o primeras plantillas, y generar una 2ª plantilla, o una pluralidad de segundas plantillas. Donde dicha 2ª o segundas plantillas son capaces de modelar la síntesis de una 2ª molécula modelada, o una pluralidad de segundas moléculas modeladas, donde dicha o dichas segundas moléculas modeladas comprenden una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente que no es idéntica a la secuencia de los grupos funcionales de la primera o de las primeras moléculas modeladas, y opcionalmente iii) modelar por medios de dicha o dichas segundas plantillas a una 2ª molécula modelada, o una pluralidad de aquella 2ª molécula modelada.

[0094] El método que se menciona anteriormente aprovecha que una síntesis modelada (figura 1) en una sección involucra un intermediador modificable de una sola hebra en la forma de una plantilla. En el caso en que esta plantilla comprende a una hebra de nucleótidos que comprende a deoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, la mayoría de métodos biológicos moleculares puede aplicarse para modificar la plantilla, y, por lo tanto, modificar el polímero modelado.

[0095] La lista que se menciona más adelante de métodos biológicos moleculares que pueden aplicarse a los polímeros modelados de este invento, es, por lo tanto, incompleto, pero simplemente sirve para ilustrar que casi cualquier método biológico molecular relevante puede ser aplicado a los polímeros modelados como un resultado de este invento.

[0096] En casos en los que los nucleótidos que no tienen bases naturales son parte de la plantilla, algunas de las metodologías biológicas moleculares podrían no ser aplicables. Esto dependerá principalmente de la especificidad de los sustratos de las enzimas involucradas (por ejemplo, la polimerasa de ADN de Taq en una reacción PCR; la restricción enzimática en protocolos USE, etcétera). Además, métodos que involucran un paso in vivo (por ejemplo, la transformación de E. coli para la amplificación del ADN de un plásmido) podría tener sólo una factibilidad limitada para aquellos nucleótidos. Algunos nucleótidos que no tienen bases naturales, son, sin embargo, conocidos por estar incorporados a nucleótidos por medio de algunas polimerasas de tipo silvestre y mutantes, y, por lo tanto, el uso de nucleótidos con bases que no son naturales no limita seriamente el número de métodos biológicos moleculares in vitro que pueden aplicarse a moléculas modeladas.

#### Tabla 1. Biología molecular aplicable a los polímeros modelados de este invento

- Amplificación, recombinación y mutagénesis in vivo e in vitro.
- Mutagénesis de Kunkel dirigida por el sitio, utilizando uno o varios (por ejemplo, 50) óligos mutagénicos diferentes a concentraciones por debajo de la saturación, es decir, generando una biblioteca combinatoria.
- USE (Eliminación dirigida por Sitios Únicos - Unique Site-directed Elimination), usando uno o varias (por ejemplo, 50 óligos mutagénicos diferentes) concentraciones por debajo de la saturación, es decir, generando una biblioteca combinatoria.

- PCR (Reacción en Cadena de Polimerasas - Polymerase Chain Reaction).
- LCR (Reacción en Cadena de Ligasas - Ligase Chain Reaction).
- Mezcla aleatoria de PCR, incluyendo mezclas aleatorias de familias (mezclando secuencias aleatoriamente que contienen bloques con una homología particular), y mezclas aleatorias dirigidas en las que los óligos son agregados a la reacción para dirigir el proceso de mezcla aleatoria en una dirección específica.
- Otros tipos de mezclas aleatorias, por ejemplo, recombinaciones homólogas en levadura; protocolos de mezclas aleatorias tal como se han desarrollado en las compañías Phyllos, Energy Biosystems, Diversa y por Frances Arnold.
- Mutagénesis de cintas
- Otros métodos que se basan en polimerasas o PCR, por ejemplo, extensión de superposición, síntesis genética, y PCR propenso a errores.
- Mutagénesis inducida por medio de química o de UV.
- Síntesis de plantillas de tipo silvestre o de variaciones y la interpretación a polímeros modelados (tipo silvestre en este sentido significa la secuencia de la plantilla que modelada la síntesis del polímero conocido ("tipo silvestre"); la variación en este sentido significa una secuencia de plantilla parcialmente aleatoria o agregada que modelada la síntesis de una variación del polímero conocido).
- División específica por medio de enzimas de restricción.
- Ligación por medio de ligasas de ADN o de ARN; "división genética".
- Selecciones de afinidad (utilizando el complejo polimérico plantilla-modelado).
- Secuenciaciones
- Formaciones de polímeros en "chips de ADN", al usar la plantilla como una marcación que enlaza a un grupo de ADN.

**[0097]** En vez de aislar a la hebra plantilla (no derivadas), podría ser deseable aplicar los métodos biológicos moleculares a la doble hélice de la plantilla que complementa a la plantilla o a la plantilla complementaria del derivado. La plantilla derivada podría, en este momento, contener entidades funcionales no polimerizadas; entidades funcionales polimerizadas; o un vestigio que fue dejado atrás proveniente de la división del enlazador que conectó a la entidad funcional y al elemento complementario. Muchas polimerasas y otras enzimas son conocidas por aceptar plantillas de ADN o de ARN con un alto nivel de derivación. Por lo tanto, muchos métodos in vitro que involucran a polimerasas y otras enzimas tienen altas probabilidades de ser alcanzables utilizando la plantilla complementaria (derivada) como un punto inicial dependerá principalmente de la especificidad del sustrato o de la plantilla de las enzimas involucradas si es que es posible utilizar a la plantilla complementaria derivada como un punto de inicio para el método biológico molecular en cuestión. Una persona con conocimiento en la industria será capaz de evaluar la posibilidad de varios métodos prácticos en este sentido.

**[0098]** Este invento también se refiere a bloques de construcción utilizados para la síntesis de moléculas modeladas y a complejos que contienen a aquellos bloques de construcción. En otro aspecto, se suministra el uso de un bloque de construcción para la síntesis de una molécula modelada de acuerdo al invento. En una sección importante de este aspecto, la molécula modelada es comprendida o consiste esencialmente de una entidad molecular capaz de enlazar a otra entidad molecular en la forma de una entidad molecular objetivo o un compañero de enlace.

**[0099]** La molécula modelada es preferiblemente un medicamento capaz de ser administrado en un monto farmacéuticamente efectivo en una composición farmacéutica a un individuo y de tratar una condición clínica en dicho individuo que necesita a aquel tratamiento.

**[0100]** En otros aspectos del invento se suministra una composición pesticida, una composición insecticida, una composición bactericida, y una composición fungicida, así como métodos para preparar aquellas composiciones y sus usos, donde cada una de las composiciones comprende una molécula modelada de acuerdo al invento en un monto efectivo para lograr el efecto deseado.

**[0101]** En aspectos adicionales se suministra un método para identificar un agente farmacéutico, o un agente de diagnóstico, donde dicho método comprende el paso de examinar una pluralidad de objetivos fármacos con por lo menos una molécula modelada predeterminada, e identificar un agente farmacéutico o un agente de diagnóstico en la forma de moléculas modeladas candidatas capaces de interactuar con dichos objetivos fármacos.

**[0102]** En otro aspecto, se suministra un método para identificar a un objetivo incluyendo un objetivo fármaco, donde dicho método comprende el paso de examinar una pluralidad de ligandos o de partículas receptoras con por lo menos una molécula modelada predeterminada e identificar objetivos fármacos en la forma de ligandos o partículas receptoras capaces de interactuar con dichas moléculas modeladas.

**[0103]** Este invento también describe cualquier molécula modelada aislada o purificada que tiene una afinidad en relación a un objetivo predeterminado, incluyendo un objetivo fármaco, así como objetivos, incluyendo objetivos fármacos en la forma de ligandos, partículas receptoras, enzimas, superficies celulares, superficies sólidas o semisólidas, así como cualquier otra entidad física o molecular o superficie que tenga una afinidad en relación a una molécula modelada predeterminada.

[0104] En aspectos adicionales del invento se suministra un método para el tratamiento de un individuo que tenga la necesidad de este tratamiento, donde dicho método comprende el paso de administrar al individuo un monto farmacéuticamente efectivo de una molécula identificada por un método de este invento y que tenga una afinidad para con un objetivo predeterminado, incluyendo un objetivo fármaco.

[0105] En otro aspecto de este invento se suministra un método para el tratamiento de un individuo que tenga la necesidad de este, donde dicho método comprende el paso de administrar al individuo un monto farmacéuticamente efectivo de un ligando aislado o purificado o una partícula receptora que tenga una afinidad para con una molécula modelada predeterminada de acuerdo al invento. El ligando aislado o purificado o la partícula receptora es identificada preferiblemente por cualquiera de los métodos mencionados anteriormente de identificación del invento.

[0106] Este invento puede ser realizado de acuerdo con algunas secciones. En una primera sección el paso de contactar al elemento complementario con el elemento codificador involucra una o más polimerasas o transcriptasas. Por lo tanto, de acuerdo con esta sección los bloques de construcción son un derivado de nucleótidos. En un aspecto de esta primera sección, los bloques de construcción son mononucleótidos, sin embargo, los bloques de construcción podrían ser di- u oligonucleótidos. Aunque los mononucleótidos son el sustrato natural para las polimerasas y transcriptasas, los oligonucleótidos son incorporables de acuerdo con el método de WO 01/16366. El derivado del mono- u oligonucleótido sirve como el elemento complementario. Uno o más enlazadores están adheridos a un extremo en el derivado del mono- u oligonucleótido y en el otro extremo a una entidad funcional. Especialmente, en el caso en el cual el elemento complementario es un derivado mono nucleótidos, se prefiere que el enlazador esté adherido para que la entidad funcional se proyecte en la ranura principal de una hélice de doble hebra para permitir a entidades funcionales adyacentes formar un enlace entre sí.

[0107] En una 2ª sección del invento, bloques de construcción que comprenden un mono- u oligonucleótido como un elemento complementario son vinculadas químicamente entre sí. Algunos métodos para la vinculación química son conocidos en la industria, tales como el método de 5'-fosfoimidazolida (Visscher, J.; Schwartz, A. W. Journal of Molecular Evolution (Revista de Evolución Molecular) 1988, 28, 3-6. Y Zhao, Y.; Thorson, J. S. J. Org. Chem. 1998, 63, 7568-7572) o el método de 3'-fosfotioato (Alvarez et al. J. Org. Chem. (1999), 64, 6319-28 Pirrung et al. J. Org. Chem. (1998), 63, 241-46).

[0108] En una 3ª sección del invento, bloques de construcción que comprenden a un oligonucleótido como elemento complementario se ligan utilizando enzimas ligasas.

[0109] En una 4ª sección del invento, los bloques de construcción comprenden un oligonucleótido que sirve como elemento complementario, donde dicho oligonucleótido tiene una longitud suficiente para adherirse a la plantilla sin la necesidad de ligarse a un cebador o a otro elemento complementario.

[0110] Los bloques de construcción son adaptados en general al método utilizado para contactar al elemento complementario con la plantilla y para la producción de la molécula modelada. Como un ejemplo, el enlazador podría ser relativamente corto cuando un derivado de mono nucleótidos es utilizado mientras que el enlazador necesita ser considerablemente más largo cuando un oligonucleótido es utilizado como bloque de construcción.

#### **Descripción breve de las figuras**

[0111] Los siguientes símbolos son utilizados en las siguientes figuras para indicar características generales del sistema: en las figuras 1, 7C, 8C, 11, 11 ex.1, 12, 13, 14, 14 ex. 1 - 2, 15, 15 ex. 1 - 7, 17, 17 ex. 1, 17, 17 ex. 1 - 2, 19, 19 ex. 1 - 3, 20, 21, y 22A, una línea larga horizontal simboliza una plantilla, una plantilla complementaria o el complejo de la plantilla con la plantilla complementaria. Para propósitos de claridad, en algunas de las figuras solamente, el paso de polimerización, sin el paso de activación, ha sido incluido. Rx denota a grupos funcionales.

#### **Figura 1. Presentación química de moléculas modeladas - El principio**

[0112] El protocolo para la presentación química de moléculas modeladas puede dividirse en 6 etapas, i) la incorporación, ii) la polimerización, iii) la activación, iv) la selección/examinación, v) la amplificación, y vi) la caracterización. La incorporación involucra la incorporación de bloques de construcción en la plantilla complementaria, cuya secuencia es determinada por la plantilla. La incorporación podría ser regulada por enzimas tales como polimerasas o ligasas. La plantilla comprende lugares de enlaces de cebadores en uno o ambos extremos (permitiendo la amplificación de la plantilla). La porción remanente de la plantilla podría ser una secuencia aleatoria, parcialmente aleatoria o predeterminada. Los elementos complementarios comprenden preferiblemente a una entidad funcional, un elemento complementario y un enlazador que conecta la entidad funcional y al elemento complementario. Ejemplos detallados de elementos complementarios seleccionados, sus incorporaciones, polimerizaciones y activaciones se muestran en este documento (figura 7 y figura 8).

[0113] La polimerización involucra reacciones entre los bloques de construcción incorporados, formando, por lo tanto, a enlaces covalentes entre las entidades funcionales, junto con los enlaces funcionales que ya existen entre los elementos complementarios. La activación involucra la división de algunos, todos excepto uno, o a todos los enlazadores que conectan la secuencia de entidades funcionales a la plantilla o que complementan a la plantilla que modelo a la molécula modelada que es conformada de entidades funcionales. La activación también podría involucrar separar la plantilla y la plantilla complementaria sin separar a los enlazadores que conectan a las entidades funcionales y a la plantilla complementaria.

La selección o examinación involucra enriquecer a la población de parejas plantilla-molécula modelada para una propiedad deseada.

[0114] La amplificación involucra el producir más de las parejas plantilla-molécula modelada, por medio de la amplificación de la plantilla o de la plantilla complementaria, y producir más de las parejas plantilla-molécula modelada, para rondas adicionales de selección/examinación, o para la secuenciación de otra caracterización.

Clonar y secuenciar involucra la clonación de plantillas aisladas o plantillas complementarias, seguidas por una caracterización. En algunos casos, podría ser deseable secuenciar la población de plantillas aisladas o plantillas complementarias, por lo que la clonación de secuencias individuales no es requerida.

#### **Figura 2A y 2B. Un conjunto expandido de parejas base.**

[0115] La figura presenta un conjunto de parejas base naturales y no naturales que obedecen las reglas de enlace de hidrógeno de Watson-Crick. Las parejas base son presentadas en US 6,037,120, y son incorporadas a este documento por referencia.

#### **Figura 3. Un bloque monomérico de construcción.**

[0116] Un bloque de construcción comprende o consiste esencialmente de una entidad funcional, conectada a través de un enlazador selectivamente divisible a un elemento complementario. Cada elemento complementario tiene 2 grupos reactivos (tipo I), que podrían reaccionar con otros 2 elementos complementarios. El elemento complementario contiene un grupo de reconocimiento que interactúa con un elemento codificador complementario (el elemento codificador no se muestra). La entidad funcional en este ejemplo comprende o consiste esencialmente de 2 grupos reactivos (tipo ii), que podrían reaccionar con grupos reactivos de otras entidades funcionales, y un grupo funcional, también llamado una funcionalidad. Los grupos reactivos de tipo 2, y la partícula molecular que los conecta, se volverán (parte de) la estructura en el polímero codificado resultante.

#### **Figura 4. Un bloque monomérico de construcción con sólo un grupo reactivo tipo II.**

[0117] Un bloque de construcción comprende o consiste esencialmente de una entidad funcional, conectada a través de un enlazador selectivamente divisible a un elemento complementario. Cada elemento complementario tiene 2 grupos reactivos (tipo I), que podría reaccionar con otros elementos complementarios. El elemento complementario contiene un grupo de reconocimiento que interactúa con un elemento codificador complementario (elemento codificador que no se muestra). La entidad funcional en este ejemplo comprende o consiste esencialmente de un grupo reactivo tipo II, que podría reaccionar con grupos reactivos de otras entidades funcionales, y un grupo funcional, también llamado funcionalidad. El grupo reactivo tipo II se volverá (parte de) la estructura en el polímero codificado resultante.

#### **Figura 5. Bloques de construcción y los polímeros resultantes de la incorporación dirigida por plantillas de los bloques de construcción y sus polimerizaciones y activaciones.**

[0118] La figura 3 presenta una descripción detallada de las características de bloques de construcción individuales. 3 elementos complementarios diferentes son mostrados, cada uno enlazado a una entidad funcional específica. La mitad derecha de la figura incluye la plantilla que dirige la incorporación de los bloques de construcción por medio de un emparejamiento de bases complementarias.

A). Los grupos reactivos tipo I del elemento complementario reaccionan, por lo cual una parte del grupo reactivo se pierde (por ejemplo, PPI en la incorporación de trifosfatos de nucleósidos). En el ejemplo mostrado, la polimerización de los grupos reactivos tipo II también resulta en la pérdida de parte de los grupos reactivos. La estructura del polímero resultante comprende o consiste esencialmente de parte de los grupos reactivos originales tipo II y de la entidad molecular que conecta a los grupos reactivos. Parte del enlazador permanece adherido a la entidad funcional.

B). Los grupos reactivos tipo I reaccionan tal como en (A). Los grupos reactivos tipo II no reaccionan directamente, pero en vez de eso se agrega una "molécula de conexión". En el momento de la reacción con su molécula de conexión, parte del grupo reactivo se pierde. El enlazador divisible utilizado en este ejemplo se denomina "enlazador sin rastros" y por lo tanto la entidad funcional es liberada sin rastros de la molécula enlazadora.

C). La incorporación de este caso no involucra el acoplamiento de elementos complementarios individuales, es decir, no conlleva a la reacción de los grupos reactivos tipo I. Los grupos reactivos tipo II reaccionan con moléculas de conexión tal como en (B).

D). La entidad funcional contiene solamente un grupo reactivo tipo II. El grupo reactivo tipo II reacciona con una molécula de conexión.

#### Figura 6. Un nucleótido derivado en calidad de un bloque de construcción.

[0119] El bloque de construcción de nucleótidos comprende o consiste esencialmente del elemento complementario (el nucleótido) y una entidad funcional (en este caso un ácido dicarboxílico) conectado por medio de un enlazador selectivamente divisible (en este caso un disulfuro). Los grupos reactivos tipo I del nucleótido son el trifosfato y el grupo hidroxilo, tal como fue indicado. El grupo de reconocimiento del nucleótido es la base. La entidad funcional comprende o consiste esencialmente de un grupo funcional (un hidroxilo), 2 grupos reactivos tipo II (ácidos carboxílicos), y una estructura esencial (anillo aromático) que conecta a los 2 grupos reactivos. Finalmente, el enlazador (disulfuro) es divisible por medio de, por ejemplo, DTT.

#### Un di-nucleótido derivado en calidad de bloque de construcción

[0120] El elemento complementario es un di-nucleótido de dA-dU que comprende el grupo de reconocimiento, en este caso las bases de adenina y de uracilo. Es conectado a la entidad funcional (aquí un aminoácido) por medio de un enlace de propargiléster divisible. En la división básica, el enlazador libera al grupo funcional, un ácido carboxílico. Los grupos reactivos de tipo I del di-nucleótido son el grupo hidroxilo y la foforo(2-metil)imidazolidina. Los grupos reactivos de tipo II son el grupo amino y el ácido carboxílico del aminoácido tal como es indicado.

#### Un oligonucleótido derivado en calidad de bloque de construcción

[0121] El elemento complementario es las 20 últimas bases del oligonucleótido mostrado. Es enlazado a la entidad funcional, un aminoácido Beta *N*-Boc, por medio de un oligonucleótido comprendido de 40 bases (B es una biotina interna incorporada que usa a la fosoramidita que es disponible comercialmente (10-1953-95 de Glen research) incluyendo a un deoxirribonucleótido de citosina que ha sido modificado en el grupo 5'-fosfato con un separador mercapto-hexano conectado a una partícula N-hidroxisuccinimida. El grupo reactivo de tipo II es el ácido carboxílico enlazado al átomo de oxígeno de la partícula N-hidroxisuccinimida. Es susceptible a ataques nucleofílicos de, por ejemplo, una amina.

#### Figura 7. Marcación de la C- terminal de un $\beta$ -dipéptido - incorporación, polimerización y activación.

A) las estructuras del cebador y de 2 bloques monoméricos de construcción. La molécula iniciadora es adherida a la posición del dU de la terminal 3' del cebador. El iniciador es una amina protegida por Fmoc. El derivado de dUTP porta un grupo hidroxilo foto - protegido. El grupo hidroxilo es acoplado a la estructura anular N-tiocarboxianhidrida (NTA). El derivado de dATP es modificado en la posición 7. La amina foto-protegida es acoplada a la NTA.

B) El cebador (el cual es recosido a la plantilla, no se muestra en la figura) es extendido desde su extremo 3' por medio de la incorporación de dUTP y dATP por una polimerasa. Luego el iniciador es activado por una piperidina, que libera a la amina primaria. La amina primaria ataca a la NTA cercana, que abre la estructura anular NTA, libera al CSO, y como resultado, produce una amina primaria. Esta amina primaria ahora ataca a la siguiente unidad NTA en la formación. Como resultado, se forma un polímero, adherido a través de sus grupos funcionales (OH y NH<sub>2</sub>) a la hebra de ADN. Finalmente, los enlazadores que conectan a la hebra de ADN con las unidades NTA, son divididas. El polímero resultante en este caso es un  $\beta$ -péptido, que porta a los grupos funcionales OH y NH<sub>2</sub>, codificado por el dUdA de la secuencia ADN. En el ejemplo mostrado, la secuencia 5'-dUdA-3' codifica al  $\beta$ -péptido en la terminal C en dirección hacia la terminal N. El  $\beta$ -péptido es adherido al ADN codificador a través del extremo de la terminal C.

C) La representación esquemática de la incorporación, de la polimerización y de la activación. El polímero codificado se adquiere a la molécula codificadora (ADN) a través de la molécula iniciadora.

#### Figura 8. Marcación de la terminal N de un $\beta$ -dipéptido - incorporación, polimerización y activación.

A) Las estructuras del cebador, 2 bloques monoméricos de construcción, y un óligo. La molécula iniciadora es adherida a la posición 5 de la U de la terminal 3' del cebador. El cebador es complementario a la parte corriente arriba de la plantilla. El iniciador es una amina protegida por Fmoc. El derivado de UTP porta un grupo hidroxilo fotoprotectado. El grupo hidroxilo es adherido a la estructura anular N-tiocarboxianhidrida (NTS). El derivado de ATP es modificado en la posición 7. Una amina fotoprotectada es adherida a la NTA. El óligo es complementario a la secuencia corriente abajo de la plantilla. El óligo porta un tioéster adherido a la U en el extremo 5' del óligo. La

estabilidad del tioéster en agua puede modificarse tal como sea deseado por medio de cambios en la estructura del componente del tioéster (en el ejemplo, el componente tiol es un tiofenol).

5 B) El cebador (el cual es recosido a la plantilla, no se muestra la figura) es extendido desde su extremo 3' a través de la incorporación de la UTP y de la ATP por una polimerasa. Entonces el iniciador es activado por medio de una piridina, que libera a la amina primaria. La amina primaria ataca a la NTA cercana, que abre la estructura anular NTA, libera al CSO, y como resultado, produce una amina primaria. Esta amina primaria ahora ataca a la siguiente unidad NTA en la formación. Como resultado se forma un polímero, adherido a través de sus grupos funcionales (OH y NH<sub>2</sub>) a la hebra de ARN. Finalmente, los enlazadores que conectan a la hebra de ARN con las unidades NTA son divididas. El polímero resultante es un β-péptido, que porta a los grupos funcionales-OH y -NH<sub>2</sub>, codificados por la UA de la secuencia del ácido ribonucleico. La secuencia 5'-UA-3' codifica al β-dipéptido en la terminal N hacia la dirección de la terminal C, así como la forma en que la naturaleza codifica a los α-péptidos. El β-péptido es adherido al ARN codificador a través de su extremo de la terminal N.

15 C) Representación esquemática de la incorporación, polimerización y activación. En el momento de la división de un subconjunto de enlazadores, el polímero codificado se adhiere al oligonucleótido corriente abajo.

**Figura 9. Derivados de nucleótidos que son conocidos por estar incorporados a hebras de ARN y de ADN por medio de polimerasa de ADN o de ARN.**

20 Parte Superior: nucleótido, las 4 bases en el lugar de adherencia de la partícula molecular (R).  
Centro: nucleótidos con apéndices que son aceptados como sustratos por las polimerasas.  
Parte inferior: nucleótidos con apéndices (R) que podrían ser utilizados con este invento. El compuesto (a) sería utilizado en, por ejemplo, experimentos de relleno (refiérase a la figura 15). El compuesto (b) sería utilizado por ejemplo en reacciones de polimerización de compresión (refiérase a la figura 14 y 14, ejemplo 1). El compuesto (c) sería utilizado, por ejemplo, en reacciones de polimerización de apertura anular (refiérase a la figura 18 y 18, ejemplo 1).

**Figura 10. Enlazadoras divisibles y grupos protectores.**

30 Las enlazadoras divisibles y los grupos de protección, agentes que podrían ser utilizados por su división y por sus productos de división.

**Figura 11. Polimerización por medio de reacciones entre grupos reactivos cercanos tipo II.**

35 Para cuestiones de claridad, sólo la reacción de polimerización (y no la de activación) se muestra en la figura. X representa a los grupos reactivos de tipo II de la entidad funcional. En este caso, los 2 grupos reactivos tipo II son idénticos. La polimerización (reacción de X con X para formar a XX) pasa espontáneamente cuando el bloque de construcción ha sido incorporado, o es inducido por un cambio de condiciones (por ejemplo, pH), o por la adición de un factor inductor (exposición química o de ultravioleta, por ejemplo).

**Figura 11 ex. 1. Por liberación que se basa en la cumarina.**

45 Una reacción inducida por la luz de las unidades cumarinas, seguida por la activación (división del enlazador), resulta en una estructura polimérica de estructuras anulares aromáticas y alifáticas. Se muestran ejemplos de grupos funcionales (fosfatos, ácidos carboxílicos y anilinas).

**Figura 12. Polimerasa entre grupos reactivos cercanos no idénticos de tipo II.**

50 En este ejemplo, X podría reaccionar con Y, pero no otro X. Asimismo, Y no reacciona con Y. La polimerización puede pasar durante la incorporación de bloques de construcción (tal como se muestra en la figura), o después de la incorporación de algunos bloques de construcción.

**Figura 13. Formación de aglutinamientos en la ausencia de la polimerización direccional.**

55 Cuando los monómeros incorporados no están fijados en relación a la rotación sobre el enlace que vincula a las entidades funcionales en relación a los elementos complementarios, una formación de aglutinamiento podría resultar, tal como se muestra la figura.

60 Esto representa un problema significativo para polímeros más largos. El problema podría ser resuelto al (i) fijar los monómeros incorporados en una orientación preferida que no permite que X y Y (los grupos reactivos de tipo II) intercambien posiciones en la formación (por ejemplo, al acoplar a la entidad funcional y al elemento complementario por medio de un doble enlace o de los enlaces, por ejemplo, acoplando a la entidad funcional a la base y al ribosoma de un nucleótido, o a las 2 bases de un dinucleótido), (ii) utilizar una polimerización direccional ("compresión", refiérase, por ejemplo, a la figura 17), o (iii) establecer condiciones que aseguren que los monómeros reaccionen durante o justo después de la incorporación en la plantilla complementaria, es decir, cada monómero reacciona con el monómero previamente incorporado antes de que el siguiente monómero sea incorporado (refiérase, por ejemplo,

a la figura 14, con el ejemplo).

**Figura 14. Compresión-polimerización y activación simultánea.**

5 Resultados de polimerizaciones en la activación del polímero. La geometría de la reacción entre X y Y que está en este ejemplo es la misma para todos los monómeros que participan en la polimerización.

**Figura 14, ejemplo 1. Incorporación, polimerización y activación simultáneas-formación de péptidos.**

10 A). Se incorporan derivados de nucleótidos, a los cuales los tioésteres de aminoácidos han sido anexados. Durante o después de la incorporación de un derivado de nucleótidos, la amina ataca al carbonilo del nucleótido cercano (previamente incorporado). Esto resulta en la formación de un enlace de amidas, que se extiende a la unidad de péptido uno. Cuando el siguiente monómero es incorporado, éste podría atacar al carbonilo de tioéster, resultando en la separación del dipéptido del nucleótido, para formar un tripéptido. El proceso continúa más allá corriente abajo  
 15 con la plantilla complementaria, hasta que la incorporación de derivados de nucleótidos se detenga. Importantemente, la geometría del ataque nucleofílico permanece sin cambios. Puesto que la concentración local de aminas nucleofílicas es mucho mayor en la plantilla que en el aislamiento, la reacciones en la solución no se espera que afecten significativamente la formación del polímero codificado correcto. Además, la reactividad de la amina con el éster podría ajustarse de varias formas. Los parámetros que afectarán a la reactividad incluyen a: (i) el pH y la temperatura, (ii) la longitud, el punto de adherencia al nucleótido, y las características (carga, rigidez, hidrofobicidad, estructura) del enlazador que conecta al éster y al nucleótido, (iii) la naturaleza del éster (tio-, fosfo-, o hidroxí-éster);  
 20 (iv) la naturaleza del sustituyente en el sulfuro (refiérase a (B) a continuación). Adicionalmente, la eficiencia de la formación polimérica correcta también es afectada por la tasa de incorporación y la tasa de reacción una vez incorporada. La tasa de incorporación es determinada por  $k_{cat}$  y  $K_m$ . Los valores  $k_{cat}$  y  $K_m$  podrían ser afinados al cambiar las condiciones (pH, la concentración de nucleótidos, sales, plantillas y enzimas), por medio de la elección de la enzima, o al cambiar las características de la enzima por medio de ingeniería proteínica. Además, la naturaleza y el tamaño de los derivados de nucleótidos podrían influenciar su tasa de incorporación.  
 25 Este esquema general que involucra la incorporación, la polimerización y la activación durante o justo después de la incorporación del bloque de construcción, puede aplicarse a la mayoría de reacciones de polimerizaciones nucleofílicas, incluyendo la formación de varios tipos de péptidos, amidas y polímeros similares a amidas (por ejemplo,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\Omega$ - péptidos mono-, di-, tri- y tetra-sustituidos, poliésteres, policarbonatos, policarbonatos, poliureas), utilizando estructuras similares.

35 B) 4 diferentes tioésteres con diferentes sustituyentes y por lo tanto diferente reactividad hacia los nucleófilos.

**Figura 14, ejemplo 2. Incorporación, polimerización y activación simultáneas-formación de una poliamina.**

40 Esta figura muestra una "reacción de polimerización de círculo rodante" donde la cadena que contiene al centro nucleofílico ataca al electrófilo adherido a la parte del ADN, utilizando esta parte de ADN como el grupo que abandona.

**Figura 15. Por liberación de "relleno" (monómeros XX simétricos).**

45 La polimerización de relleno por medio de reacción entre los grupos reactivos tipo II ("X" en la figura) y las moléculas de conexión (Y-Y en la figura).

Para propósitos de claridad, solamente la reacción de polimerización (no la activación) se muestra en la figura. La línea gruesa representa ácidos nucleicos de doble o de una sola hebra o análogos de ácidos nucleicos. X representa los grupos reactivos tipo II de la entidad funcional. En este caso, los 2 grupos reactivos tipo II son idénticos. (Y-Y) es agregado a la mezcla antes, durante o después de la incorporación de los bloques monoméricos de construcción.  
 50 Asimismo, la reacción significativa entre X y Y puede tomar lugar durante o después de la incorporación de los monómeros.

**Figura 15, ex. 1, formación de poli-iminas por medio de polimerizaciones de relleno.**

55 Se agrega dialdehído en exceso a diaminas incorporadas. Como resultado, se forma una poli-imina. En el ejemplo, el polímero porta a la siguiente secuencia de grupos funcionales: ciclopentadienilo, hidroxilo y ácido carboxílico.

**Figura 15, ejemplo 2. Formación de poliamidas**

60 Después de la incorporación de nucleótidos a los cuales se han anexado di-aminas, EDC (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y ácido carboxílico se agregan en exceso a las aminas primarias en el oligonucleótido utilizando condiciones estándar de acoplamiento. Alternamente, un di-(N-hidroxi-succinimida éster) podría agregarse en exceso, con un pH de 7-10. Como resultado, 2 enlaces de amidas se forman entre los 2 apéndices de nucleótidos cercanos. Después de esta polimerización, los apéndices son separados de la estructura del oligonucleótido (activación), dejando un enlazador intacto, y los grupos funcionales protegidos son desprotegidos para exponer a los grupos funcionales. El resultado final es una poliamida marcada con ADN.  
 65

Una ruta alterna a las poliamidas sería el incorporar nucleótidos a los cuales se han anexado ácidos di-carboxílicos, y entonces agregar di-aminas y EDC, para formar enlaces de amidas entre nucleótidos individuales del oligonucleótido. Alternamente, los derivados de oligonucleótidos podrían contener ésteres de N-hidroxi-succinimidilo (NHS), que reaccionarían con las aminas agregadas sin la necesidad de agregar EDC. Inicialmente, este 2º método fue considerado como problemático en casos en los cuales la incorporación es mediada por una polimerasa, tal como reaccionarían probablemente los ésteres de NHS con aminas en la polimerasa, inhibiendo potencialmente la actividad de las polimerasas. Sin embargo, experimentos prácticos han demostrado que es posible incorporar nucleótidos derivados de NHS.

(A). La estructura del polímero resultante comprende o consiste esencialmente de anillos aromáticos enlazados por amidas. Los sustituyentes de este ejemplo son una amina primaria protegida, un grupo permitido ramificado, una amina terciaria y un pirimidilo. La amina primaria es protegida para evitar su reacción con el ácido dicarboxílico. Grupos protectores apropiados serían por ejemplo Boc-, Fmoc, benciloxicarbonilo (Z, cbz), trifluoracetilo, ftaloilo, u otros grupos protectores de aminos descritos, por ejemplo, en (T. W. Green y Peter G. M. Wuts (1991), Protective Groups in Organic Synthesis (Grupos Protectores en Síntesis Orgánica)).

(B). La estructura comprende o consiste esencialmente de anillos aromáticos, conectados por enlaces de amidas. Los sustituyentes son indanilo, difenilfosfinilo, carboxamidoetilo y guanidilpropilo, representando los últimos 2 la cadena lateral de la asparagina, y la cadena lateral de la arginina, respectivamente. La función del guanidilo es protegida, puesto que es más activa que las aminas estándar. Un grupo protector apropiado sería el Mtr (4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenesulfonilo), Mts (mesitileno-2-sulfonilo) o Pbf (2,2,4,6,7-pentametildihidro-bencifurano-5-sulfonilo).

#### Figura 15, ejemplo 3. Formación de poliureas.

Los derivados de los nucleótidos incorporados reaccionan con fosgeno o un equivalente de fosgeno como CDI para formar una poliurea.

Los enlazadores son separados y el hidroxilo protegido es desprotegido.

Grupos apropiados que abandonan (Lv - leaving groups) son cloruro, imidazol, nitrotriazol, u otros grupos buenos que abandonen utilizados comúnmente en la síntesis orgánica.

#### Figura 15, ejemplo 4. Formación quiral y aquiral de la estructura de la poliurea.

En este ejemplo, el grupo funcional Rx es utilizado como un enlazador separable, que genera al grupo funcional deseado en la activación. En (A) y (B), se forma una poliurea. En (A), el grupo funcional es adherido a la estructura por medio de un carbón quiral. El hidrógeno en este carbón es sacado para enfatizar esto. Antes de la polimerización, existe una rotación libre alrededor del enlace que conecta al carbón quiral y al grupo funcional. Cuando los grupos reactivos de tipo II (las aminas) reaccionan con el equivalente al fosgen (por ejemplo, un carbonildiimidazol) para formar el polímero, los bloques de construcción podrían ser insertados en cualquiera de 2 orientaciones (tal como se indica por la posición del hidrógeno, a la izquierda o a la derecha) como un resultado, cada residuo del polímero tiene 2 formas quirales posibles. Por lo tanto, una molécula codificadora específica codificará a un polímero con una secuencia específica de residuos, pero un polímero codificado de 5 o de 15 residuos tendrá  $2^5 = 32$  o  $2^{15} = 32,768$  estereoisómeros, respectivamente. En ciertos casos, podría ser ventajoso el incorporar aquella diversidad estructural adicional en una biblioteca (por ejemplo, cuando el polímero es relativamente corto). En otros casos, tal diversidad adicional no es deseable, puesto que la eficiencia de la examinación podría comprometerse, o podría volverse demasiado difícil de descifrar la estructura de un polímero que ha sido aislado en un proceso de examinación, junto con otros estereoisómeros codificados por la misma molécula codificadora (por ejemplo, cuando el polímero es demasiado largo). En (B) el carbono quiral de (A) ha sido reemplazado con un nitrógeno. Como resultado, la estructura polimérica resultante es aquiral, y la molécula codificadora codifica una estructura específica.

#### Figura 15, ejemplo 5. Formación de polifosfodiésteres.

Los derivados incorporados de nucleótidos reaccionan con el fosfodiéster activado para formar el polifosfodiéster. Luego los enlazadores son separados, resultando en un polifosfodiéster, adherido a través de un enlazador a la molécula codificadora. Un ejemplo de grupos apropiados que abandonan (Lv - leaving groups) es el imidazol.

#### Figura 15, ejemplo 6. Formación de polifosfodiésteres con un grupo reactivo tipo II en cada bloque monomérico de construcción.

Cada nucleótido incorporado contiene un fosfodiéster activado. En el momento de la adición de un compuesto dihidroxilado tal como la 1,3-dihidroxipiridina, se forma un polifosfodiéster funcionalizado. Finalmente, los grupos funcionales Rx son liberados de la plantilla de complementación por medio de la separación de grupos de protección/enlazadores separables que los conectaron al oligonucleótido.

#### Figura 15, ejemplo 7. Pericíclico, polimerización de "relleno".

Después de la incorporación de los derivados de los oligonucleótidos, se agrega en exceso 1,4-benzoquinona, resultando en la formación de un compuesto poli cíclico. Finalmente, la estructura polimérica es activada al separar a los enlazadores que conectan al polímero a los nucleótidos, excepto por un enlazador (no separable) que queda intacto.

**Figura 16. “Relleno” codificado.**

Un relleno por medio de codificaciones se realiza por el método descrito. La partícula de relleno codificada es el Y-Rx-Y del 2º bloque de construcción. Utilizando este método es posible enlazar 2 entidades funcionales X-Rx-X por medio de una entidad funcional predeterminada Y-Rx-Y. En algunas secciones, esto podría ser ventajoso porque la entidad funcional de relleno codificada Y-Rx-Y no tiene que ser la misma a lo largo de la molécula, tal como es el caso para el método mostrado en la figura 15.

**Figura 17. Polimerización de “relleno” (monómeros XS asimétricos).**

Una polimerización de relleno por medio de reacciones entre los grupos reactivos tipo 2 (“X” y “S” en la figura) y moléculas de conexión (T-Y) en la figura).

Para propósitos de claridad, solamente la reacción de polimerización (no la de activación) se muestra. La línea gruesa representa ácidos nucleicos o análogos de ácidos nucleicos de doble o de una sola hebra. X y S representan los grupos reactivos tipo II de la entidad funcional. En este caso, los 2 grupos reactivos tipo II no son idénticos. (T-Y) es agregado a la mezcla antes, durante o después de la incorporación de bloques monoméricos de construcción. Asimismo, una reacción significativa entre X y Y, y entre S y T podría tomar lugar durante o después de la incorporación de los monómeros.

**Figura 17, ejemplo 1. Polimerización de relleno por medio de una ligación modificada de Staudinger y una reacción de cetona-hidracina.**

Los grupos reactivos (tipo II) X y S de los bloques de construcción son azidas e hidrazidas. La molécula agregada que llena los vacíos entre los bloques de construcción portan una cetona y una partícula fosfina. Las reacciones entre una cetona y una hidracina, y entre una azida y una fosfina, son muy químicamente selectivas. Por lo tanto, la mayoría de grupos funcionales Rx pueden ser utilizados sin la necesidad de protección durante las reacciones de polimerización. Ejemplos de partículas moleculares R, R1, X y Y podrían encontrarse en (Mahal et al. (1997), Science (Ciencia) 276, pp. 1125-1128; Saxon et al. (2000), Organic Letters (Cartas Orgánicas) 2, pp. 2141-2143).

**Figura 18. Polimerización por “compresión”.**

La molécula iniciadora (comúnmente ubicada en uno de los extremos del polímero naciente) es activada, por ejemplo, por medio de desprotección o por medio de un cambio en el pH. El iniciador entonces reacciona con el grupo reactivo X del monómeros cercano. Esto activa al grupo reactivo Y para atacar al X cercano. La polimerización viaja en voces al otro extremo de la molécula en una forma de “compresión”, hasta que todos los monómeros deseados hayan sido conectados. La activación del iniciador (y los grupos reactivos Y) podrían ser atacados por este en el grupo reactivo cercano, o la activación de este para que sea atacado por el grupo reactivo cercano.

**Figura 18, ejemplo 1. Polimerización radical.**

La molécula iniciadora, un yodo, es activada por la adición de un iniciador radical, por ejemplo, persulfato de amonio, AIBN (azobis-isobutironitrilo) u otros iniciadores de reacciones radicales en cadena. El radical ataca al monómero cercano, para formar un nuevo radical y un enlace entre los primeros 2 monómeros. Eventualmente, todo el polímero es formado, y el polímero podría ser activado, lo que crea simultáneamente a los grupos funcionales Rx.

**Figura 18, ejemplo 2. Polimerización catiónica.**

Un catión es creado por medio de la exposición de la formación a un ácido de Lewis fuerte. El doble enlace del monómero cercano reacciona con este catión, haciendo posible que la carga positiva migre al monómero cercano. Eventualmente, todo el polímero es formado, y finalmente es activado.

**Figura 19. Polimerización por compresión por medio de una apertura anular.**

El iniciador reacciona con el grupo reactivo X en la estructura anular, la cual abre el anillo, haciendo que el grupo reactivo Y en la misma entidad funcional se active para una reacción con el grupo reactivo X en una entidad funcional cercana.

**Figura 19, ejemplo 1. Polimerización por compresión de N-tiocarboxianhidridos, para formar β-péptidos**

Después de la incorporación de los bloques de construcción, el iniciador es desprotegido. La amina primaria ataca entonces al carbonilo de la unidad N-tiocarboxianhídrida (NTA) cercana. Como resultado, se libera CSO, y una amina primaria es generada. Esta amina ahora reaccionara con la siguiente unidad NTA en la formación, y eventualmente todas las unidades NTA habrán reaccionado, para formar un b-péptido. Finalmente, el oligómero es activado.

Varios cambios a esta configuración pueden concebirse. Por ejemplo, en vez de tiocarboxianhídridos, uno podría utilizar carboxianhídridos. El iniciador podría ser protegido con una base- o un grupo fotolábil. Si un grupo de protección base-lábil es escogido, la estabilidad del carboxianhídrido debe ser considerada. A un pH más alto podría ser ventajoso utilizar carboxianhídridos en vez de tiocarboxianhídridos. Finalmente, el iniciador podría estar desprotegido y, por ejemplo, podría estar acoplado al cebador. En este caso, la concentración del iniciador en la solución será muy pequeña (comúnmente nanomolar a micromolar), por lo que únicamente un monto significativo del iniciador reaccionara con los carboxianhídridos. Después de, o durante, la incorporación de los bloques de construcción la concentración local del iniciador y del carboxianhídrido será mucho más alta, conllevando a una

polimerización eficiente.

Otros tipos de péptidos y polímeros similares a péptidos (por ejemplo,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\Omega$ - péptidos, poliésteres, policarbonatos, policarbamatos, poliureas mono-, di-, tri-, y tetra-sustituidos) pueden elaborarse, utilizando estructuras cíclicas similares. Por ejemplo, los  $\alpha$ -péptidos pueden elaborarse por medio de polimerizaciones de anillos de carboxianhídridos de 5 miembros.

**Figura 19, ejemplo 2. Polimerización por “compresión” de unidades 2,2-difeniltiacinonas para formar  $\beta$ -péptidos**

El nucleófilo desprotegido, una amina primaria, ataca al carbonilo del tioéster cercano, formando, por lo tanto, un enlace de amida. El tiol liberado se organiza, para formar una tioacetona. Como resultado una amina primaria libre es generada, la cual ataca al carbonilo de un tioéster cercano, etcétera. Eventualmente, un  $\beta$ -péptido sustituido por  $\alpha$  es formado, y enlazado por medio de su extremo terminal C. La reactividad de la amina primaria con el éster podría modificarse, por ejemplo, por la elección del éster (un tioéster o un éster regular), del pH durante la reacción de polimerización y la elección de sustituyentes en el anillo o los anillos aromáticos. La reactividad relativa de la amina secundaria contenida en la partícula cíclica, y la amina primaria liberada en el momento de la apertura anular, podrían ajustarse por el lote en el carbono entre la amina secundaria y el tioéster. Por ejemplo, reemplazando los 2 anillos aromáticos con un anillo aromático reducido en el lote alrededor de la amina secundaria, haciéndolo más nucleofílico, por lo que la capacidad nucleofílica de la amina primaria que se forma en la apertura del anillo no es afectada por el lote en esta posición. Otros péptidos y polímeros similares a amidas pueden formarse por medio de este principio. Por ejemplo, los  $\gamma$ -péptidos pueden formarse por medio de la polimerización de anillos de tiacinonas de 7 miembros.

**Figura 19, ejemplo 3. Formación de poliéteres por medio de polimerizaciones de apertura anular.**

El iniciador es desprotegido por medio de, por ejemplo, una base o un ácido. El anión formado ataca entonces al epóxido del monómero cercano, para formar un enlace de éter. Como resultado, un anión es formado en la unidad cercana. Éste ataca al siguiente monómero en la formación, y eventualmente, se forma el poliéter de longitud completa. Dependiendo de las condiciones, el ataque será en el carbono más o menos obstaculizado del epóxido (bajo condiciones ácidas o básicas, respectivamente).

En el paso final, el poliéter codificado es activado. En este caso, el polímero es liberado completamente desde la molécula codificadora. La examinación para detectar características relevantes (por ejemplo, efecto en una formación que se basa en células o actividades enzimáticas) podría realizarse en pozos o micelas de micro titulación, donde cada compartimento contiene una molécula de plantilla específica y el poliéter modelado, en muchas copias. De esta forma, la plantilla y la molécula modelada son asociadas físicamente (por los límites de los compartimentos), y por lo tanto los poliéteres que codifican a las plantillas con características interesantes podrían ser recaudados de aquellos compartimentos, agrupados, amplificados e “interpretados” a más copias de poliéteres los cuales pueden ser expuestos entonces a una nueva ronda de examinación.

**Figura 20. Polimerización por compresión y activación por reorganización.**

El iniciador es activado para que sea atacado por Y. La reacción del iniciador y de Y resulta en la liberación del iniciador del elemento complementario. En el momento de la reacción con el iniciador, una reorganización de la molécula del bloque de construcción ocurre, resultando en la activación de X para su reacción con Y. Después de varias reacciones y reorganizaciones, se forma un polímero.

**Figura 21. Polimerización por compresión y activación por apertura anular.**

La reacción del iniciador con X en la estructura anular abre el anillo, resultando en la activación de Y. Y ahora puede reaccionar con X en una entidad funcional cercana. Como resultado de la apertura anular, las entidades funcionales son liberadas desde los elementos complementarios.

**Figura 22. Formación direccional de polímeros utilizando unidades funcionales fijas.**

(A) La entidad funcional de un bloque de construcción podría adherirse al elemento complementario a través de 2 enlazadores. Esto podría fijar a la entidad funcional en una orientación específica en relación a la plantilla complementaria. Como resultado, la rotación entorno al enlazador que conecta a la entidad funcional y al elemento complementario (tal, se mostró en la figura 3C) no es posible, y la formación de un aglutinamiento es, por lo tanto, poco posible.

(B) 2 enlazadores conectan las 2 bases de un derivado de un dinucleótido con la unidad funcional, que, en este caso, es un dipéptido. La incorporación de aquellos derivados de dinucleótidos a una estructura helicoidal doble posicionada a la amina (X en (A) descrito anteriormente) en proximidad al éster (Y en (A) descrita anteriormente). Este éster podría ser activado, por ejemplo, como un éster de N-hidroxisuccinimida. Después de la reacción de la amina y del éster, se forma un polipéptido. Éste polipéptido será un polímero direccional, con una direccionalidad de N a C. En este caso, la reacción de polimerización separara al éster de la base a la cual está enlazado. Por lo tanto, la activación del polímero formado solamente requiere una separación del enlazador que conecta la base en el extremo 3' del dinucleótido con el extremo terminal amino de la entidad funcional.

La fijación dotacional de la entidad funcional en relación al elemento complementario podría lograrse de otras maneras. Por ejemplo, la entidad funcional podría acoplarse al elemento complementario a través de un doble enlace, o podría adherirse a través de 2 enlaces a la base y a la partícula ribosa de un nucleótido, respectivamente,

o podría acoplarse a posiciones diferentes en la ribosa o en la base. Finalmente, también es posible enlazarse a la partícula de fosfato, especialmente de dinucleótidos.

**La figura 23** muestra 4 ejemplos de FEs bifuncionales adheridos por medio de un solo enlazador al nucleótido padre (izquierda) o con un enlazador adicional utilizando un 2º punto de adherencia (derecha). La 2ª adherencia puede ubicarse en cualquier lugar en un nucleótido cercano (A), en la partícula de azúcar del nucleótido padre (B, enlazado a través de la funcionalidad del éster o C, con una funcionalidad libre del éster, y D, también con libre funcionalidad del éster), podría ser otra posición base del nucleótido padre (no se muestra), o el FE podría enlazarse a la estructura de fosfato (no se muestra).

**La figura 24** muestra una hélice doble de ADN (la hebra superior 5'-GCTTTTITAG-3') que tiene un enlazador-FE 1A adherido en formas diferentes. Las estructuras de ADN se muestran como flechas, los azúcares y las bases como anillos. Átomos enlazadores de FE se muestran en representación de barras y coloreados por átomo. A. ejemplo de una conformación que tiene FEs adheridos en forma individual. B. El producto más probable de A. C. ejemplo de una configuración de FE adherido individualmente que conlleva al aglutinamiento y por lo tanto a un producto incompleto, D. E. Conformación de energía mínima que tiene FEs adheridos doblemente y el único producto posible, F. G. Representación de barras del producto liberado de G. H. Representación de barras del producto liberado de B. I. Representación de barras del producto liberado de D.

**La figura 25** muestra una hélice doble de ADN (la hebra superior 5'-GCTTTITAG-3') que tiene un enlazador-FE 1 B adherido en diferentes formas. Las estructuras de ADN se muestran como flechas, los azúcares y las bases como anillos. Los átomos enlazadores de FE se muestran en representación de barras y se colorean por átomo. A. conformaciones de energía mínima que tienen FEs adheridos individualmente. B. Producto más probable de A. C. ejemplo de una configuración de FE adherido individualmente que conlleva a aglutinamiento sí y por lo tanto a un producto incompleto, D. E. Conformación de energía mínima que tiene FEs adheridos doblemente y el único producto posible, F. G. Representación de barras del producto liberado de B y F. H. Representación de barras del producto liberado de D.

#### **La figura 26. Modelación de moléculas - principio y variaciones.**

En las figuras 26-27, 29-31, 33-35, 37-49 y 53, la plantilla, la plantilla complementaria, la plantilla y la plantilla complementaria juntas, o un elemento complementario son indicados por una línea horizontal (en negrillas). En las figuras 26-28, 35-37, y 39, un círculo es utilizado para indicar una entidad funcional.

A. Bloques monoméricos de construcción utilizados en esta figura. Un punto negro indica un enlazador separable.

B. Principio general

Paso 1 - Incorporación. Los bloques monoméricos de construcción son incorporados específicamente a una plantilla complementaria, por medio de la interacción específica entre los elementos codificadores (de la plantilla) y los elementos complementarios (de los bloques monoméricos de construcción).

Paso 2 - Reacción. Una reacción es inducida por la cual las entidades funcionales (FE - functional entities) de los bloques monoméricos de construcción individuales se acoplan, por la reacción de grupos reactivos tipo II.

Paso 3 - Activación. Algunos o todos los enlazadores que conectan a las unidades FE con elementos complementarios son separados, liberando, por lo tanto, parcialmente o completamente, a la molécula modelada.

Paso 4 (no se muestra en la figura) - Examinación, amplificación y modificación. Los complejos plantilla-molécula modelada podrían ser expuestos a un proceso de examinación que enriquece la agrupación de los complejos con las características deseadas. Entonces, las plantillas de la agrupación enriquecida podrían ser amplificadas y modificadas por medio de, por ejemplo, PCR mutagénico y las moléculas modeladas regeneradas al realizar los pasos uno-3.

C. Modelación de plantillas lineales, ramificadas y circulares. Plantillas lineales, ramificadas y circulares podrían generar moléculas lineales, ramificadas y circulares. En el ejemplo mostrado, la plantilla ramificada podría ser generada por la incorporación de un nucleótido modificado (por ejemplo, que contenga a un tiol) en un oligonucleótido, seguido por la reacción con un oligonucleótido que contenga un componente reactivo tiol (por ejemplo, una unidad maleimida en un extremo). La plantilla circular podría, de esa misma forma, ser un oligonucleótido, que porte grupos reactivos en el extremo que podrían reaccionar para cerrar covalentemente el círculo (por ejemplo, tioles en ambos extremos del oligonucleótido podrían formar un enlace de disulfuro). En el momento de la separación de todos excepto uno de los enlazadores que conectan a los FEs y elementos complementarios, una molécula modelada circular es formada y adherida a la plantilla en un punto.

D. Modelación de moléculas lineales, ramificadas, circulares y lineales mixtas por medio de una plantilla lineal.

(a) Una molécula lineal modelada con la misma secuencia de los FEs tal como fueron obtenidas después de la incorporación, pero antes de la reacción, de los bloques monoméricos de construcción. (b) una molécula lineal modelada con una secuencia mixta, es decir, la secuencia de los FEs en la molécula modelada no corresponde a la secuencia obtenida después de la incorporación, pero antes de la reacción de los FEs. (c) una molécula modelada circular obtenida por la reacción en parejas de los siguientes FEs entre sí: FE1/FE2, FE2/FE3, FE3/FE5, FE5/FE4,

FE4/FE1. (d) una molécula ramificada obtenida por medio de reacciones de parejas de las siguientes entidades funcionales entre sí: FE1/FE2, FE2/FE3, FE2/FE4, y FE4/FE5. (e) una molécula ramificada obtenida por medio de reacciones en parejas de las siguientes entidades funcionales entre sí: FE1/FE2, FE2/FE4, FE2/FE5, FE2/FE3.

(b)

5 **Figura 27. Número no igual de grupos reactivos (X) y (Y).** El número de grupos reactivos (X) puede ser más alto que, o igual a, o más bajo que el número de grupos reactivos (Y). Cuando el número de (X) y (Y) son diferentes, hay resultados mixtos. En la figura, el portador (la partícula molecular a la cual los grupos funcionales de los bloques monoméricos de construcción) es adherido directamente a la plantilla. El portador también podría ser parte de un bloque de construcción monomérico (es decir, la entidad funcional del bloque monomérico de construcción comprende una partícula portadora, incluyendo a los grupos reactivos tipo II (Y).

(A). El número de grupos reactivos codificados X por plantilla es igual al número de grupos reactivos (Y) en el punto de anclaje (también llamado el portador).

15 (B). Número de grupos reactivos codificados X por plantilla es menor que el número de posiciones sustituyentes codificables Y en el portador. Esto conlleva a resultados mixtos en referencia a los grupos reactivos (Y) en el portador (punto de anclaje) que reaccionaran con un (X) en los bloques monoméricos de construcción.

20 C. El número de grupos reactivos codificados X por plantilla es mayor que el número de grupos reactivos en el portador. Esto conlleva a resultados mixtos en referencia a cuáles de los grupos reactivos (Y) en el portador (punto de anclaje) reaccionaran con un grupo reactivo (X) en los bloques monoméricos de construcción.

#### **Figura 28. Bloques monoméricos de construcción.**

(A) Un bloque monomérico de construcción con un grupo reactivo tipo II (X), que se conecta al grupo funcional (RX) con el elemento complementario. Este tipo de bloques monoméricos de construcción podría ser utilizado para la reacción simultánea y para el protocolo de activación (figura 14).

25 (B). Un bloque monomérico de construcción con 2 grupos reactivos tipo II (X y Y), que conectan al elemento complementario y al grupo funcional (RX).

(C) Un bloque monomérico de construcción con un grupo reactivo tipo II (X). El grupo reactivo (X) no enlaza al grupo funcional (RX) y el elemento complementario, por lo cual, un enlazador (L) es necesario para el paso de activación (para liberar a la entidad funcional del elemento complementario).

30 (D) Un bloque monomérico de construcción con 4 grupos reactivos tipo II (Y). Los 4 grupos reactivos y el grupo funcional RX podría servir como un portador, en el cual sustituyentes (codificados por los monómeros complementarios de la misma plantilla) están acoplados a través de una reacción de los grupos reactivos (X) en estos bloques monoméricos de construcción con los grupos reactivos (Y) en este bloque monomérico de construcción. En este ejemplo, ningún enlazador separable es indicado. Por lo tanto, después de las reacciones de modelación, la molécula modelada podría estar adherida a la plantilla por medio del enlazador de este bloque monomérico de construcción.

#### **Figura 29. Modelación que involucra reacciones y activaciones simultáneas.**

Modelar utilizando 4 bloques monoméricos de construcción cada uno con un grupo reactivo tipo II. (X), y un punto de anclaje que tenga 4 grupos reactivos (Y). La reacción de X y Y involucra la activación simultánea (separación) que libera a X del elemento complementario.

(A) Los grupos reactivos tipo II (X) son de clase similar.

45 (B) Los grupos reactivos tipo II (X1, X2, X3, X4) son de diferentes tipos, es decir, las reacciones en parejas entre reacciones X1/Y1, X2/Y2, X3/Y3, y X4/Y4 son ortogonales o parcialmente ortogonales. Por ejemplo, X1 reacciona preferiblemente con Y1, no Y2, Y3 o Y4. El punto de anclaje podría ser adherido directamente a la plantilla, o a la plantilla complementaria. En caso de que el punto de anclaje este adherido a un elemento complementario, en general se lo considera un bloque monomérico de construcción.

#### **Figura 30. Tipos de reacción que permiten reacciones y reactivaciones simultáneas.**

Diferentes clases de reacciones son demostradas que regulan la translocación de un grupo funcional de un bloque monomérico de construcción a otro, o a un punto de anclaje. Las reacciones han sido agrupadas entre diferentes clases: sustituciones nucleofílicas, reacciones de adición - eliminación, y reacciones catalizadas de transición metálica. Estas reacciones son compatibles con reacciones y activaciones simultáneas (tal como se describe en términos generales en la figura 14).

(A) Reacción de nucleófilos y carbonilos. Como resultado de la sustitución nucleofílica, el grupo funcional R es translocado al bloque monomérico de construcción que inicialmente porta el nucleófilo.

(B) Ataque nucleofílico por la amina en el tioéster conlleva a la formación de un enlace de amidas, translocando, en efecto, al grupo funcional R del tioéster a otro bloque monomérico de construcción.

60 (C) La reacción entre la hidracina y el  $\beta$ -cetoéster conlleva a la formación de pirazolona, translocando, en efecto, a los grupos funcionales R y R' al otro bloque monomérico de construcción.

(D) La reacción de hidroxilaminas con  $\beta$ -cetoésteres conlleva a la formación de isoxazolonas, translocando, por lo tanto, a los grupos R y R' del otro bloque monomérico de construcción.

65 (E) La reacción de la tiourea con el  $\beta$ -cetoéster conlleva a la formación de pirimidinas, translocando, por lo tanto, a los grupos R y R' del otro bloque monomérico de construcción.

(F) La reacción de la urea con el malonato conlleva a la formación de la pirimidina, translocando, por lo tanto, al

grupo R al otro bloque monomérico de construcción.

(G) Dependiendo de si  $Z = O$  o  $Z = NH$ , una reacción Heck seguida por una sustitución nucleofílica conlleva a la formación de una cumarina o quinolinona, translocando, por lo tanto, a los grupos R y R' al otro bloque monomérico de construcción.

5 (H) La reacción de la hidracina y las ftalimidias conlleva a la formación de la ftalhidracida, translocando, por lo tanto, a los grupos R y R' al otro bloque monomérico de construcción.

(I) La reacción de ésteres aminoácidos conlleva a la formación de dicetopiperacinas, translocando, por lo tanto, al grupo R al otro bloque monomérico de construcción.

10 (J) La reacción de la urea con ésteres sustituidos con  $\alpha$  conllevan a la formación de hidantoína, y la translocación los grupos de R y R' al otro bloque monomérico de construcción.

(K) La alquilación puede lograrse por la reacción de varios neutrófilos, sulfonatos. Esto transloca a los grupos funcionales R y R' al otro bloque monomérico de construcción.

(L) La reacción de un alqueno di-activado contiene un electrón que se retira y un grupo que abandona, haciendo que el alqueno será translocado al nucleófilo.

15 (M) La reacción del disulfuro con mercaptano conlleva la formación de un disulfuro, translocando, por lo tanto, al grupo R' al otro bloque monomérico de construcción.

(N) La reacción de ésteres de aminoácidos y de cetonas amino conllevan a la formación de benzodiazepinonas, translocando, por lo tanto, al grupo R al otro bloque monomérico de construcción.

20 (O) La reacción de fosfonatos con aldehídos o cetonas conlleva a la formación de alquenos sustituidos, translocando, por lo tanto, al grupo R' al otro bloque monomérico de construcción.

(P) La reacción de boronatos con arilos o heteroarilos resulta en la transferencia de un grupo arilo al otro bloque monomérico de construcción (para formar un biarilo).

(Q) La reacción de arilsulfonatos con boronatos conlleva a la transferencia del grupo arilo.

25 (R) La reacción de boronatos con fenilos (o alquinos) resulta en la transferencia de un grupo arilo al otro bloque monomérico de construcción para formar un vinilareno (o un alquínareno).

(S) La reacción entre boronatos alifáticos y arilhaluros, por las cuales el grupo alquilo es translocado para generar un alquilareno.

(T) La alquilación alfa catalizada por transiciones metálicas a través de la reacción entre el enoléter y un arilhaluro, translocando de esa forma, a la parte alifática.

30 (U) Condensaciones entre, por ejemplo, enaminas o enoléteres con aldehídos conllevan a la formación de carbonilos alfa-hidroxi o carbonilos alfa no saturados beta. La reacción transloca a la parte nucleofílica.

(V) La alquilación de alquilaruros por medio de, por ejemplo, enaminas o enoléteres. La reacción transloca a la parte nucleofílica.

(W) Las ciclo-adiciones [2 + 4], translocan a la parte de dieno.

35 (X) Las ciclo-adiciones [2 + 4], translocan a la parte de eno.

(Y) Las ciclo-adiciones [3 + 2] entre azidas y alquenos, que conllevan a triazoles por medio de la translocación de la parte de eno.

(Z) Las ciclo-adiciones [3 + 2] entre nitrilóxidos y alquenos, conllevan a isoxazoles por la translocación de la parte de eno.

40 **Figura 31. Modelación que involucra a reacciones y activaciones que no son simultáneas: La reacción de los grupos reactivos (tipo II), seguido de una separación de los enlazadores que conectan a las entidades funcionales con elementos complementarios.**

Modelación utilizando 4 bloques monomérico de construcción cada uno con un grupo reactivo tipo II (X), y un punto de anclaje que porta a 4 grupos reactivos (Y). La reacción de X y Y no involucra una activación simultánea (separación), por lo cual la reacción de X y Y es seguida por la separación del enlazador L, que libera al grupo funcional RX del elemento complementario.

50 (A) Los grupos reactivos tipo II (X) son de tipo similar, es decir, podrían reaccionar con el mismo tipo de grupos reactivos (Y). (B) los grupos reactivos tipo II (X1, X2, X3, X4) son de tipos diferentes, es decir, las reacciones entre X1/Y1, X2/Y2, X3/Y3 y X4/Y4 son ortogonales o parcialmente ortogonales. Por ejemplo, X1 reacciona preferiblemente con Y1, no con Y2, Y3 o Y4. El punto de anclaje podría estar adherido directamente a la plantilla, o a la plantilla complementaria. En el caso de que el punto de anclaje este adherido al elemento complementario, en general, se los considera un bloque monomérico de construcción.

55 **Figura 32. Parejas de grupos reactivos (X) y (Y), y el enlace resultante (XY).** Se muestra una colección de grupos reactivos que podrían ser utilizados para síntesis modeladas, junto con los enlaces formados en sus reacciones. Después de la reacción, se podría requerir una activación (separación) (refiérase a la figura 31).

**Figura 33. Lugares de anclaje para la molécula modelada.**

60 La molécula modelada podría estar adherida a la plantilla que la codifica (A) a través de un enlazador que es conectado directamente a la plantilla cerca del extremo de la plantilla, o (B) a través de un enlazador que está conectado directamente con la plantilla, en una posición más central en la plantilla, o (C) en forma de un bloque monomérico de construcción que porta al punto de anclaje (un grupo reactivo que se vuelve el vínculo con la molécula modelada).

65 **Figura 34. Mezcla.**

Cuando las entidades funcionales reaccionan después de la incorporación de los bloques monoméricos de construcción, la posición o secuencia de los grupos funcionales en la molécula modelada podría no siempre ser determinada únicamente por la secuencia modelada.

(1) Los grupos funcionales R1, R2, R3 y R4 podrían tomar cualquiera de 4 posiciones en la molécula portadora (es decir, el grupo reactivo X de un bloque monomérico de construcción podría reaccionar con cualquiera de los grupos reactivos Y en el punto de anclaje).

(2) La secuencia de un brazo de esta molécula ramificada podría ser, por ejemplo, R5-R3-R2 (tal como se muestra) o R5-R2-R3 (no se muestra), o R5-R4-R3 (no se muestra) o cualquier otro número de secuencias posibles. Además, la identidad del grupo funcional acoplado a, por ejemplo, la parte izquierda de la molécula, podría estar en cualquiera de R1, R2, R3 o R4.

(3) Tal como en (2), varias posibles secuencias de grupos funcionales son posibles, adicionalmente a la secuencia mostrada de R1-R2-R5-R4-R3.

(4) Aquí una molécula modelada no mixta se muestra, en la cual la secuencia de entidades funcionales cuando estas son incorporadas corresponde a la secuencia de la molécula modelada (R1-R2-R3-R4-R5). Cuando se desee, las mezclas podrían evitarse parcialmente o completamente por medio de una codificación direccional o el uso de, por ejemplo, cajas de compresión en los enlazadores (refiérase a las figuras 40, 44-47).

(5) tal como en (2) y (3), varias posibles secuencias y posiciones de las entidades funcionales son posibles.

**Figura 35. Bloques monoméricos de construcción-ejemplos de diseños enlazadores.** Diferentes diseños de bloques monoméricos de construcción se muestran, y son utilizados en varios esquemas de modelación.

El elemento complementario podría estar representado por un oligonucleótido, al cual está adherido un enlazador que porta a la entidad funcional. El enlazador podría ocupar una posición interna en relación al elemento complementario o alternamente podría ocupar una posición terminal. Ambos, el elemento complementario y el enlazador podrían estar hechos de un oligonucleótido (ADN, ARN, LNA, PNA, otros oligómeros capaces de hibridarse al enlazador de un bloque monomérico de construcción y sus mezclas). La parte horizontal representa al elemento complementario, y la parte vertical representa al enlazador.

La porción del enlazador marcada "a" podría estar presente o ausente. La región "a" representa una región interactiva de la cual una sección importante es una secuencia de nucleótidos. La región "a" podría ser recocida para una secuencia de nucleótidos "a" complementaria de una sola hebra para hacer que el enlazador sea más rígido.

Alternamente la región "a" podría ser utilizada para su interacción con otros bloques monoméricos de construcción (es decir, la caja de compresión, refiérase a la figura 42), por lo cual, las entidades funcionales de aquellos 2 bloques monoméricos de construcción serán puestos en una proximidad cercana, lo cual incrementará la probabilidad de reacción entre estas 2 entidades funcionales. Otros usos de aquellas regiones incluyen la interacción entre diferentes bloques monoméricos de construcción por la cual una codificación direccional podría lograrse. "Nu" es un nucleófilo que podría reaccionar con un electrófilo "E". Diseños diferentes de bloques monoméricos de construcción se muestran, y se usan en varios esquemas de modelación.

(A) El elemento complementario podría ser un oligonucleótido, al cual un enlazador que porta a la entidad funcional está adherido específicamente a la parte central del oligonucleótido. La porción del enlazador marcada como "a" podría representar una secuencia de nucleótidos a la cual un nucleótido de una sola hebra podría estar recosido para hacer que el enlazador sea más rígido.

(B) Ambos, el elemento complementario y el enlazador podrían estar hechos de un oligonucleótido. La parte horizontal aquí representa al elemento complementario, y la parte vertical representa al enlazador. El enlazador podría contener una secuencia "a" que funciona como una caja de compresión (refiérase a la figura 42).

(C) El bloque monomérico de construcción de (C) es un iniciador o un punto de anclaje que puede ser utilizado para iniciar el proceso de codificación.

**Figura 36. Preparación de entidades funcionales a bloques monoméricos de construcción que se basan en oligonucleótidos.**

Se muestran reacciones y reactivos que podrían ser utilizados para el acoplamiento de entidades funcionales a oligonucleótidos modificados (modificados con tioles, ácidos carboxílicos, haluros o aminas), sin una reacción significativa con la parte no modificada del oligonucleótido o alternamente, reacciones conectoras para la vinculación de enlazadores a elementos complementarios. Comercialmente, los mono nucleótidos están disponibles para la producción de oligonucleótidos de inicio con las modificaciones mencionadas.

**Figura 37. Bloques monoméricos de construcción que se basan en oligonucleótidos. Ejemplos de diseño y síntesis de enlazadores y de entidades funcionales (FE - functional entity).**

Se muestran ejemplos de los cuales elementos complementarios de los bloques monoméricos de construcción comprenden a oligonucleótidos de un largo de, por ejemplo, 8-20 nucleótidos (los oligonucleótidos son dibujados como una línea negra gruesa). Parte de o todo el oligonucleótido podría conformar un elemento complementario. En los casos en los cuales sólo una parte del oligonucleótido representa al elemento complementario, la porción remanente del oligonucleótido podría constituir un enlazador. En los ejemplos, un enlazador está adherido a la base en el extremo 3'- o 5'- del oligonucleótido. Este enlazador podría estar adherido a cualquier nucleótido en la secuencia de oligonucleótidos, y también, podría estar adherido a cualquier partícula molecular en el oligonucleótido, siempre y cuando no evite interacciones específicas del elemento complementario con la plantilla.

(A) Un bloque monomérico de construcción en el cual el enlazador (L) conecta la base del nucleótido terminal con la entidad funcional.

(B) Un bloque monomérico de construcción en el cual un enlazador polietilenglicol (PEG) de entre 1 y 20 unidades etilenglicoles conectan al elemento complementario con la entidad funcional que contiene al nucleófilo (una amina primaria).

5 (C) Un bloque monomérico de construcción en el cual un enlazador (L) conecta a la entidad funcional que contiene a un electrófilo (un éster o un tioéster).

(D) Un bloque monomérico de construcción conformado de una amina protegida por Boc (que puede ser desprotegida con un ácido moderado), y un éster. La amina desprotegida podría reaccionar con un éster de otro bloque monomérico de construcción, para dar un enlace de amida.

10 **Figura 38. Bloques monoméricos de construcción que se basan en oligonucleótidos. Ejemplo de codificación y diseño del elemento complementario, lo que permite una alta diversidad monomérica.**

(A) Una plantilla que contiene a 6 elementos codificadores (CAJA 1-6), donde cada una contiene una secuencia parcialmente aleatoria (X específica a C o G), y una secuencia constante que es idéntica para todas las secuencias en el grupo (por ejemplo, todas las secuencias CAJA 1 portan una secuencia central ATATTT). Al usar C y G  
15 únicamente (o, alternativamente, A y T únicamente), las secuencias individuales (por ejemplo, las secuencias que pertenecen al grupo de secuencias de la CAJA 1), tienen temperaturas casi idénticas de recosido por lo cual un recosido erróneo es insignificante. En el ejemplo, la CAJA 2 y la CAJA 3 son idénticas por lo cual la CAJA 2 y la CAJA 3 podrían codificar al mismo tipo de entidades funcionales (que comprenden el mismo tipo de grupos reactivos del tipo II). El punto de adherencia del enlazador que conecta a los elementos complementarios y a la entidad  
20 funcional no está especificado en la figura. Idealmente, el enlazador está adherido a un nucleótido en la región constante, para evitar una parcialización en el proceso de recosido.

(B) Ejemplo de secuencias de elementos de codificación. Se muestran Secuencias de ejemplo de la CAJA 1 y de la CAJA 6. La secuencia de ejemplo de la CAJA 1 representa a una secuencia específica de 1024 secuencias diferentes que recosen específicamente a los elementos complementarios correspondientes de la CAJA 1; la  
25 secuencia de ejemplo de la CAJA 6 representa una secuencia específica de 128 secuencias diferentes que recosen a los elementos complementarios correspondientes de la CAJA 6.

(C) Modelaje utilizando 6 monómeros. 5 clases de elementos de codificación son utilizados (la CAJA 2 y la CAJA 3 son de la misma clase, es decir, los elementos complementarios correspondientes de esta clase pueden recoserse a la CAJA 2 y a la CAJA 3). Los grupos reactivos tipo II, X y Y, reaccionan; S y T reaccionan; A y B reaccionan; y C y  
30 D reaccionan. En el ejemplo, la pareja X/Y es ortogonal a S/T que es ortogonal a A/B, que es ortogonal a C/D. La reacción de X con Y resulta en la separación de R1 del elemento complementario y la translocación a R4. La reacción de S y T, seguido por la separación del enlazador L conlleva a la translocación de R2 y R3 a R4. La reacción de A con B, y C con D transloca a R5 y R6 a R4. En este ejemplo, la entidad funcional de los enlaces monoméricos a la CAJA 4 sirve como un "portador" en el cual se agregan varios sustituyentes.  
35

**Figura 39: Un protocolo típico de vista panorámica para la selección de moléculas modeladas**

Plantillas que representan a las varias variaciones moleculares pequeñas son producidas por tecnología codificadora de ADN. Estas moléculas modeladas son incubadas con la molécula objetivo inmovilizada. Las moléculas  
40 modeladas con una baja afinidad en relación al objetivo se lavan y se separan. Las moléculas modeladas que quedan son eluidas y la plantilla es amplificada utilizando PCR. Las plantillas enriquecidas están listas entonces para ser utilizadas como una hebra codificadora para el siguiente ciclo.

**Figura 40: Formación de moléculas modeladas**

45 La figura muestra un chip de molécula modelada. Una biblioteca de ADN es localizada en un formato de ensayo en una superficie adecuada. La biblioteca de moléculas modeladas (ADN plantilla de una sola hebra) es agregada y esto permitirá la inmovilización específica del lugar de las moléculas modeladas. Una muestra biológica que contiene moléculas objetivo es agregada y el material no enlazado es lavado y separado. El paso final es la detección del material enlazado en cada lugar individual.  
50

**Figura 41. Uso de enlazadores rígidos o parcialmente rígidos para incrementar la probabilidad de reacción entre las entidades funcionales de los bloques monoméricos de construcción incorporados.**

(A) Al usar enlazadores que contienen una o más regiones flexibles ("bisagras") y una o más regiones rígidas, la probabilidad de que 2 entidades funcionales entren en un contacto reactivo se puede incrementar.  
55

(B) El símbolo utilizado para un bloque monomérico de construcción con una parte rígida y 2 bisagras flexibles.

(C) Un bloque monomérico de construcción con las características descritas en (B): el bloque monomérico de construcción contiene un oligonucleótido como elemento complementario (línea horizontal), y un oligonucleótido como enlazador que conecta a la entidad funcional (FE - funcional entity) con el elemento complementario. Un recosido de una secuencia complementaria a la parte central del enlazador conlleva a la formación de una doble hélice rígida; en cualquiera de los extremos del enlazador queda una región de una sola hebra, que constituye las 2  
60 bisagras flexibles.

**Figura 42. Uso de una caja de compresión para incrementar la probabilidad de reacción entre las entidades funcionales y los bloques monoméricos de construcción incorporados.**

65 (A) Los enlazadores en este ejemplo portan cajas de compresión (a) o (a'), que son complementarias. Al operar a una temperatura que permite la interacción transitoria de (a) y (a'), los grupos reactivos X y Y son acercados a una

proximidad cercana durante varios eventos de recosido, lo cual tiene el efecto de mantener a X y a Y en una distancia cercana en una fracción más grande del tiempo que si se lo hiciera otra forma. Alternamente, uno podría hacer ciclos de la temperatura entre una temperatura baja (en la cual las cajas de compresión interactúan establemente en forma de parejas), y una temperatura más alta en la cual las cajas de compresión se separan, pero el elemento complementario permanece adherido establemente al elemento codificador de la plantilla). Por medio de varios ciclos entre temperaturas altas y bajas, un grupo reactivo específico X es expuesto a varios grupos reactivos Y, y eventualmente reaccionan para formar un enlace XY.

(B) Secuencias de 2 bloques monoméricos de construcción que se basan en oligonucleótidos. Se indica a la región que constituye al elemento complementario, al enlazador y a la caja de compresión.

#### **Figura 43. Síntesis modelada de compuestos orgánicos-ejemplos.**

(A) 3 bloques monoméricos de construcción son utilizados. Cada bloque monomérico de construcción comprende un éster activado (grupo reactivo de tipo II, (X)) donde la partícula de éster porta a un grupo funcional RX. En el momento de la reacción entre los ésteres y las aminas en el portador (el portador podría estar adherido a la plantilla), se forman enlaces de amidas, y los grupos RX se acoplan ahora al portador por medio de enlaces de amidas. Esto es, por lo tanto, un ejemplo de una reacción simultánea (formación de amidas) y activación (liberación de la partícula RX de los elementos complementarios), refiérase a la figura 29.

(B) De la misma forma que en (A), 3 aminas reaccionan con 3 ésteres para formar 3 enlaces de amidas, acoplando, por lo tanto, a los grupos funcionales RX a la partícula portadora. Sin embargo, en contraste con (A), el portador aquí es codificado por la plantilla.

(C) El 3<sup>er</sup> bloque monomérico de construcción es utilizado. La amina nucleofílica a la derecha (parte del punto de anclaje) ataca al carbonilo del éster del 3<sup>er</sup> monómero; la amina del 3<sup>er</sup> monómero ataca al tioéster del 2<sup>o</sup> monómero, y el reactivo Horner-Wittig Emmons del primer monómero reacciona con el aldehído del 3<sup>er</sup> monómero bajo condiciones alcalinas. Esto forma la molécula modelada. El enlace doble puede ser modificado después del modelaje por medio de una hidrogenación para formar un enlace saturado, o alternamente, ser sujeto a una adición Michael.

(D) El tiol del portador reacciona con la pirimidina-disulfuro del monómero 1. La amina del portador reacciona con el éster del 2<sup>o</sup> monómero. La posición alfa activada por un doble nitrilo es acilada por el tioéster del 3' del monómero en presencia de la base. El arilyoduro es expuesto a un acoplamiento Suzuki con el arilboronato del monómero 4 para generar la partícula biarila.

(E) El monómero uno acila a la amina principal. El arilyoduro experimenta un acoplamiento Suzuki por el monómero 2 y la amina bencílica es acilada por el monómero 3.

La acilación de la hidracina seguida por la cristalización conlleva a la formación de un hidroxipirazol. El arilbromuro experimenta un acoplamiento Suzuki con el boronato de arilo del monómero uno y, finalmente, las reacciones de aldehídos con el reactivo Horner-WittigEmmons del monómero 4 para generar una amida Alfa que no es saturada por beta, que podría funcionalizarse aún más por la reducción de H<sub>2</sub>/Pd-C o podría experimentar una adición Michael con nucleófilos.

#### **Figura 44. $\alpha$ - y $\beta$ -Péptidos, péptidos de hidracinas y peptoides. Codificación mediante el uso de bloques monoméricos de construcción que se basan en oligonucleótidos.**

Se ha demostrado como la síntesis modelada podría utilizarse para generar  $\alpha$ - y  $\beta$ -péptidos, péptidos de hidracinas y peptoides.

#### **Figura 45. Modelaje de $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -, y $\omega$ - péptidos a través del uso de anhídridos cíclicos.**

Se demuestra como la síntesis modelada podría ser utilizada para generar  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\omega$ -péptidos a través del uso de anhídridos cíclicos.

#### **Figura 46. La generación de nuevos grupos reactivos mediante la reacción de los grupos reactivos X y Y.**

En los casos en los cuales la reacción de X y Y conlleva a la formación de un nuevo grupo reactivo Z, esto podría ser aprovechado para incrementar la diversidad de la molécula modelada, al incorporar a bloques monoméricos de construcción que portan a grupos reactivos como para que reaccionen con Z.

(A) X y Y reaccionan para formar a Z, la cual en sí conlleva a la liberación del elemento complementario. En el momento de la reacción de Z con Q, y de la separación del enlazador que conecta a Z al elemento complementario, la molécula modelada es formada.

(B) En este caso, la reacción de X y Y para formar a Z separa simultáneamente al enlazador que conecta a X al elemento complementario. En el momento de la reacción de Z con Q, la molécula modelada es formada.

#### **Figura 46. Ejemplo 1. Síntesis modelada al generar un nuevo grupo reactivo.**

La reacción de las entidades funcionales de los primeros 3 bloques monoméricos de construcción conllevan a la formación de 2 enlaces dobles, que podría reaccionar con 2 hidroxilaminas portadas por los bloques monoméricos de construcción agregados en el 2<sup>o</sup> paso, y esto conlleva a la formación de un éster, que podría reaccionar con una hidroxilamina, portada por el monómero agregado en el 2<sup>o</sup> paso. Finalmente, los enlazadores son separados, generando a la molécula modelada.

#### **Figura 47. Enlazadores separables.**

Se muestran a los enlazadores separables, las condiciones para su separación, y los productos resultantes.

**Figura 48. Modificación después de la modelación de una molécula modelada.**

Después de que el proceso de modelación ha sido realizado, las moléculas modeladas podrían ser modificadas para introducir características nuevas. Esta lista describe algunas de estas modificaciones post-modelación.

- 5 La figura 49 muestra el resultado del ejemplo 64.  
La figura 50 muestra el resultado del ejemplo 65.  
La figura 51 muestra el resultado del ejemplo 66.  
La figura 52 muestra el resultado del ejemplo 67.  
La figura 53 muestra resultados del ejemplo 68.  
10 La figura 54 muestra el resultado del ejemplo 72.  
La figura 55 muestra la presentación de una molécula templada adherida a la plantilla complementaria.  
La figura 56 muestra el resultado del ejemplo 99.  
La figura 57 A y B muestran el resultado del ejemplo 99.  
La figura 58 A y B muestra el resultado del ejemplo 99.  
15 La figura 59 muestra el resultado del ejemplo 99.  
La figura 60 muestra el resultado del ejemplo 102.  
La figura 61 muestra el resultado del ejemplo 104.  
La figura 62 muestra el resultado del ejemplo 105.  
La figura 63 muestra el resultado del ejemplo 106.  
20 La figura 64 muestra el resultado del ejemplo 112.

**Definiciones**

- 25 **[0122]**  $\alpha$ -péptido: es un péptido que comprende o consiste esencialmente de por lo menos dos  $\alpha$ -aminoácidos enlazados entre sí por un enlazador que incluye a un enlace de péptidos.  
**[0123]** Aminoácido: entidad que comprende una parte terminal de amino ( $\text{NH}_2$ ) o una parte terminal de carboxilo ( $-\text{COOH}$ ) separada por una parte central que comprende a un átomo de carbono, o una cadena de átomos carbonos, que comprende por lo menos una cadena lateral o un grupo funcional.  $\text{NH}_2$  se refiere al grupo amino que está presente en el extremo terminal amino de un aminoácido o péptido, y  $\text{COOH}$  se refiere al grupo carboxi que está presente en el extremo de la terminal carboxi de un aminoácido o péptido. El término genérico aminoácido comprende a aminoácidos naturales y no naturales. Aminoácidos naturales de nomenclatura estándar tal como se lista en J. Biol. Chem., 243:3552-59 (1969) y tal como se adopta en 37 C.F.R., Sección 1.822(b)(2) pertenecen al grupo de aminoácidos listados en la tabla 2 que se muestra a continuación en este documento. Aminoácidos no naturales son aquellos que no están listados en la tabla 2. Ejemplos de aminoácidos no naturales son aquellos listados en, por ejemplo, 37 C.F.R. Sección 1.822(b)(4), todos los cuales están incorporados en este documento por referencia. Ejemplos adicionales de aminoácidos no naturales están listados en este documento más adelante. Residuos aminoácidos descritos en este documento pueden estar en la forma isométrica de "D" o "L".

Tabla 2. Aminoácidos naturales y sus códigos respectivos

Símbolos		Aminoácido
Y	Tyr	Tirosina
G	Gly	Glicina
F	Phe	Fenilalanina
M	Met	Metionina
A	Ala	Alanina
S	Ser	Serina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
P	Pro	Prolina
K	Lys	Lisina
H	His	Histidina
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico
W	Trp	Triptófano
R	Arg	Arginina
D	Asp	Ácido aspártico
N	Asn	Asparagina
C	Cys	Cisteína

- 65 **[0124]** Precursor de aminoácidos: partícula capaz de generar un residuo de aminoácidos después de la incorporación del precursor a un péptido.

**[0125]** Amplificar: cualquier proceso o combinación de pasos de procesos que incrementan el número de copias de

una molécula modelada. La amplificación de moléculas modeladas podría ejecutarse por cualquier método tecnológicamente avanzado incluyendo, pero sin limitarse a, una reacción en cadena de polimerasas para incrementar el número de copias de cada plantilla, y utilizar las plantillas para la síntesis de copias adicionales de moléculas modeladas que comprenden una secuencia de grupos funcionales que resultan de la síntesis de la molécula modelada que se está modelando por la plantilla. Cualquier reacción de amplificación o combinación de aquellas reacciones conocidas en la industria pueden ser utilizadas tal como sea apropiado y reconocido fácilmente por aquellas personas con conocimiento en la industria. Asimismo, las moléculas modeladas pueden ser amplificadas al usar la reacción en cadena de polimerasa (PCR - polymerase chain reaction), reacción en cadena de ligasas (LCR - ligase chain reaction), y amplificación in vivo de ADN clonado, y similares. El método de amplificación debería resultar preferiblemente en las proporciones de mezcla amplificada que están siendo representadas, esencialmente de las proporciones de las plantillas de secuencias diferentes en una mezcla antes de su amplificación.

**[0126]** Base: partícula de base nitrogenada de un nucleótido natural o no natural, o un derivado de aquel nucleótido que comprende partículas alternas de azúcar o fosfato. Las partículas base incluyen a cualquier partícula que es diferente de una partícula que ocurre naturalmente y que es capaz de complementar una o más bases de la hebra opuesta de nucleótidos de una hélice doble.

**[0127]** Bloque de construcción: especies que comprenden a) por lo menos un elemento complementario que comprende a por lo menos un grupo de reconocimiento capaz de reconocer a un elemento codificador predeterminado, b) por lo menos una entidad funcional que comprende a un grupo funcional y a un grupo reactivo, y c) por lo menos un enlazador que separa a la por lo menos una entidad funcional del por lo menos un elemento complementario, donde el bloque de construcción no comprende un ribosoma. Los bloques preferidos de construcción son capaces de ser incorporados a una hebra de nucleótidos y/o son capaces de ser enlazados por reacciones que involucran a grupos reactivos de tipo I y/o tipo II tal como se describe en este documento.

**[0128]** Enlazador separable: residuo o enlace capaz de ser separado bajo condiciones predeterminadas.

**[0129]** Separar: romper un enlace químico. El enlace podría ser un enlace covalente o un enlace no covalente.

**[0130]** Elemento codificador: elemento de una plantilla que comprende un grupo de reconocimiento y que es capaz de reconocer a un elemento complementario predeterminado de un bloque de construcción. El reconocimiento podría resultar de la formación de un enlace covalente o de la formación de un enlace no covalente entre las parejas correspondientes de elementos codificadores y elementos complementarios capaces de interactuar entre sí.

**[0131]** Complementación de los elementos de codificación: contactar a un elemento de codificación con un elemento complementario predeterminado capaz de reconocer a dicho elemento de codificación.

**[0132]** Complementar: el proceso de conectar a un elemento codificador a un contacto reactivo con un elemento complementario predeterminado capaz de reconocer a dicho elemento de codificación. Cuando el elemento codificador y el elemento complementario comprenden un nucleótido natural que tiene una partícula base, los conjuntos predeterminados de nucleótidos son capaces de complementarse entre sí por medio de enlaces de hidrógeno formados entre las partículas base.

**[0133]** Elemento complementario: elemento de un bloque de construcción. Enlazado a por lo menos una entidad funcional por medio de un enlazador. Refiérase al elemento codificador.

**[0134]** Plantilla complementaria: una secuencia de elementos complementarios, donde cada elemento complementario es enlazado covalentemente a un elemento complementario cercano. Un elemento complementario es capaz de reconocer un elemento codificador predeterminado. La plantilla complementaria podría ser lineal o ramificada.

**[0135]** Complejo: molécula modelada enlazada a la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada. La plantilla puede ser una plantilla complementaria tal como se define en este documento que es opcionalmente hibridada o adherida de otra forma a la plantilla correspondiente de los elementos codificadores enlazados.

**[0136]** Contactar: conectar, por ejemplo, a grupos reactivos correspondientes o compañeros de enlace correspondientes o compañeros de hibridación en contacto reactivo entre sí. El contacto reactivo es evidente a partir de la reacción o de la formación de un enlace o una hibridación entre compañeros.

**[0137]** Compañeros de enlace correspondientes: compañeros de enlaces que son capaces de reaccionar entre sí.

**[0138]** Grupos reactivos correspondientes: grupos reactivos capaces de reaccionar entre sí.

**[0139]** Entidad funcional: entidad que forma parte de un bloque de construcción. La entidad funcional comprende a un grupo funcional y a un grupo reactivo capaz de enlazar a grupos funcionales cercanos.

**[0140]** Grupo funcional: grupo que forma parte de una molécula modelada. La secuencia de grupos funcionales en una molécula modelada es un resultado de la capacidad de la plantilla de modelar la síntesis de la molécula modelada.

**[0141]** Interactuar: usado intercambiamente con contactar. Traer a especies, tales como, por ejemplo, compañeros de enlaces correspondientes en la forma de, por ejemplo, elementos codificadores y elementos complementarios a un contacto reactivo entre sí. La reacción podría ser regulada por grupos de reconocimiento que forman a compañeros de enlaces correspondientes por medio de enlaces covalentes o no covalentes. La interacción podría ocurrir como resultado de la mezcla de una plantilla que comprende una pluralidad de elementos codificadores con una pluralidad de bloques de construcción.

**[0142]** Ligando: utilizado en este documento para describir una molécula modelada capaz de dirigirse a una molécula objetivo. En una población de moléculas modeladas candidatas, un ligando es una que se enlaza con mayor afinidad que alguna de la población del lote. En una mezcla candidata puede existir más de un ligando para un objetivo específico. Los ligando se pueden diferenciar de otras en sus afinidades de enlace en relación a la molécula objetivo.

**[0143]** Enlazador: un residuo o enlace químico que separa a por lo menos dos especies. Las especies podrían ser retenidas a una distancia esencialmente fija, o el enlazador podría ser flexible y permitir que las especies tengan un poco de libertad de movimiento entre sí. El enlace puede ser un enlace covalente o un enlace no covalente. Las especies enlazadas incluyen, por ejemplo, un elemento complementario y una entidad funcional de un bloque de construcción, elementos codificadores cercanos de una plantilla, elementos complementarios cercanos de una plantilla complementaria, y grupos funcionales cercanos de una molécula modelada.

**[0144]** Nucleótido natural: cualquiera de los 4 nucleótidos, dA, dG, dT, y dC (constituyentes del ADN), y los 4 ribonucleótidos, A, G, U, y C (constituyentes del ARN) son los nucleótidos naturales. Cada nucleótido natural comprende o consiste esencialmente de una partícula de azúcar (ribosa o deoxirribosa), una partícula de fosfato, y una partícula base natural/estándar. Nucleótidos naturales se enlazan a nucleótidos complementarios de acuerdo a reglas bien conocidas de emparejamiento de bases (Watson y Crick), en donde la adenina (A) se empareja con la timina (T) o el uracilo (U); y donde la guanina (G) se empareja con la citosina (C), donde las parejas base correspondientes son parte de las hebras de nucleótidos complementarias anti - paralelo. El emparejamiento de las bases resulta en una hibridación específica entre nucleótidos predeterminados y complementarios. El emparejamiento de bases es el fundamento por el cual las enzimas son capaces de catalizar la síntesis de un oligonucleótido que es complementario al oligonucleótido de la plantilla. En esta síntesis, los bloques de construcción (normalmente los trifosfatos de los derivados de ribosa y deoxirribosa de A, T, U, C, o G) son dirigidos a un oligonucleótido de la plantilla para formar un oligonucleótido complementario con la secuencia complementaria correcta. El reconocimiento de una secuencia de oligonucleótidos por su secuencia complementaria es regulado por bases correspondientes y de interacción que forman a las parejas base. En la naturaleza, la interacción específica que conlleva a emparejamiento de bases se rigen por el tamaño de las bases y el patrón de los donantes de enlaces de hidrógeno y los aceptadores de las bases. Una base purina grande (A o G) se empareja con una base pirimidina pequeña (T, U o C). Adicionalmente, el reconocimiento de parejas bases entre las bases es influenciado por enlaces de hidrógeno formados entre las bases. En la geometría de la pareja base de Watson-Crick, un anillo de 6 miembros (una pirimidina en oligonucleótidos naturales) es yuxtapuesto a un sistema anular compuesto de un anillo fusionado de 6 miembros y un anillo de 5 miembros (una purina en oligonucleótidos naturales), con un enlace medio de hidrógeno que vincula a 2 átomos anulares, y enlaces de hidrógeno en cualquier lado que junte a los grupos funcionales adheridos a cada uno de los anillos, con los grupos donantes emparejados con los grupos aceptadores.

**[0145]** Cercano: elementos, grupos, entidades o residuos ubicados juntos entre sí en una secuencia se dice que son cercanos. En los casos en los cuales 2 elementos complementarios, cada uno enlazado a una entidad funcional, están enlazados entre sí a través de uno (o más) elementos complementarios y que no están enlazados a una entidad funcional, los elementos complementarios que se acaban de mencionar se dice que están cercanos y dichos 2 elementos complementarios definen a las entidades funcionales cercanas y a los elementos codificadores cercanos que pueden enlazarse entre sí, ya sea directamente o a través de un (o más) elemento o elementos codificadores.

**[0146]** Aminoácidos naturales: cualquier aminoácido no incluido en la tabla 2 de este documento. Los aminoácidos naturales incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos modificados, L-aminoácidos, y estereoisómeros de D-aminoácidos.

**[0147]** Emparejamiento de bases no naturales: el emparejamiento de bases entre nucleótidos no naturales, o entre un nucleótido natural y un nucleótido natural. Se describen ejemplos en US 6,037,120, donde 8 nucleótidos no estándar son descritos, y donde la base natural ha sido reemplazada por una base no natural. Tal como en el caso de los nucleótidos naturales, las parejas base no naturales involucran a un emparejamiento anular monocíclico de 6 miembros con un sistema anular heterocíclico bicíclico fusionado compuesto de un anillo de 5 miembros fusionado a

un anillo de 6 miembros. Sin embargo, los patrones de los enlaces de hidrógeno a través de los cuales se establece el emparejamiento de bases son diferentes de aquellos encontrados en las parejas base de AT, AU y GC. En este conjunto expandido de las parejas base que obedecen a las reglas de enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, A se empareja con T (o U), G se empareja con C, iso-C se empareja con iso-G, y K se empareja con X. H se empareja con J, y M se empareja con N (figura 2). Bases nitrogenadas capaces de emparejamientos de bases sin obedecer a las reglas de enlaces de hidrógeno de Watson-Crick también han sido descritos (Berger et al., 2000, *Nucleic Acids Research* (investigación de ácidos nucleicos), 28, pp. 2911-2914).

**[0148]** Nucleótido no natural: cualquier nucleótido que no cae dentro de la definición de los nucleótidos naturales.

**[0149]** Nucleótido: nucleótidos tal como son utilizados en este documento, se refiere a nucleótidos naturales y nucleótidos no naturales capaces de ser incorporados en una forma dirigida por plantillas a un oligonucleótido, preferiblemente por medio de una enzima que comprende a una actividad de polimerasas de ADN o ARN que depende de ADN o de ARN, incluyendo variaciones y equivalentes funcionales de polimerasas naturales o recombinante es de ADN o de ARN. Compañeros correspondientes de enlaces en la forma de elementos codificadores y elementos complementarios que comprenden una parte de nucleótidos son capaces de interactuar entre sí por medio de enlaces de hidrógeno. La interacción es denominada generalmente "emparejamiento de bases". Los nucleótidos podrían ser diferentes a los nucleótidos naturales al tener una partícula de fosfato, una partícula de azúcar y/o una partícula base diferente. Los nucleótidos pueden estar enlazados de esa misma forma a sus vecinos respectivos en una plantilla o en una plantilla complementaria por medio de un enlace natural en la forma de un enlace de fosfodiéster, o en la forma de un enlace no natural, tal como, por ejemplo, un enlace de péptidos tal como en el caso de los PNA (ácidos nucleicos de péptidos - peptide nucleic acids).

**[0150]** Análogo de nucleótidos: un nucleótido capaz de emparejar bases con otro nucleótido, pero incapaz de ser incorporado enzimáticamente a una plantilla o a una plantilla complementaria. Los análogos de nucleótidos a menudo incluyen monómeros u oligómeros que contienen bases no naturales o estructuras esenciales no naturales que no facilitan la incorporación a un oligonucleótido en una forma dirigida por plantillas. Sin embargo, la interacción con otros monómeros y/u oligómeros a través de emparejamientos específicos de bases es posible. Oligómeros alternos capaces de emparejamientos específicos de bases, pero que son incapaces de servir como un sustrato de enzimas, tales como polimerasa de ADN y polimerasa de ARN, o sus mutaciones o equivalentes funcionales, son definidos como análogos de nucleótidos en este documento. Los análogos de oligonucleótidos incluyen, por ejemplo, a nucleótidos en los cuales la estructura de fosfodiéster- azúcar de los oligonucleótidos naturales ha sido reemplazada con una estructura alterna que incluye a una estructura de azúcar de ácidos nucleicos de péptidos (PNA - peptide nucleic acid), ácidos nucleicos bloqueados (LNA - locked nucleic acid), y morfolinós.

**[0151]** Derivado de nucleótidos: un nucleótido o análogo de nucleótidos que comprende además una entidad molecular adherida. A menudo, bloques derivados de construcción (nucleótidos a los cuales una entidad molecular ha sido adherida) pueden ser incorporados enzimáticamente a oligonucleótidos por medio de polimerasa de ARN o de ADN, utilizando como sustrato al trifosfato del nucleósido derivado. En muchos casos, aquellos nucleótidos derivados son incorporados a la cadena creciente de oligonucleótidos con una alta especificidad, significando que el derivado es insertado en forma opuesta a un nucleótido predeterminado en la plantilla. Tal incorporación será considerada como una incorporación específica. Los nucleótidos pueden ser derivados en las bases, la unidad ribosa / deoxirribosa, o en el fosfato. Lugares preferidos para la derivación en las bases incluyen a la posición 8 de la adenina, la posición 5 del uracilo, la posición 5 o 6 de la citosina, y la posición 7 de la guanina. Los nucleótidos-análogos descritos más adelante podrían ser derivados en las posiciones correspondientes (Benner, patente de Estados Unidos 6,037,120). Otros lugares de derivación podrían ser utilizados, siempre y cuando la derivación no interrumpa la especificidad del emparejamiento de bases. Lugares preferidos de derivación en las partículas de ribosa o deoxirribosa son las posiciones 5', 4', o 2'. En ciertos casos, podría ser deseable estabilizar a los ácidos nucleicos hacia la degradación, y podría ser ventajoso utilizar nucleótidos con 2' modificados (patente de Estados Unidos 5,958,691). Otra vez, otros sitios podrían ser utilizados, siempre y cuando la especificidad de emparejamiento de las bases no sea interrumpida. Finalmente, los fosfatos podrían ser derivados. Derivaciones preferidas son los fosforotioatos. Análogos de nucleótidos (tal como se describirá en secciones posteriores de este documento) podría ser derivados similarmente a nucleótidos. Es claro que los varios tipos de modificaciones aquí mencionadas anteriormente, incluyendo a i) derivaciones y ii) sustituciones de bases naturales o de estructuras esenciales naturales con bases no naturales y alternas, estructuras esenciales no naturales, respectivamente, pueden ser aplicadas una vez o más de una vez dentro de la misma molécula.

**[0152]** Oligonucleótido: utilizado en este documento intercambiamente con polinucleótido. El término oligonucleótido comprende a oligonucleótidos de nucleótidos naturales y/o no naturales, incluyendo cualquiera de sus combinaciones. Los oligonucleótidos naturales y/o no naturales pueden ser enlazados por medio de enlaces de fosfodiésteres o por medio de enlaces no naturales. El término oligonucleótido es utilizado intercambiamente con poli nucleótido.

**[0153]** Oligómero: molécula que comprende una pluralidad de monómeros que pueden ser idénticos, del mismo tipo, o diferentes. El oligómero es utilizado en forma sinónima con polímero para describir cualquier molécula que comprende más de 2 monómeros. Los oligómeros pueden ser homo-oligómeros que comprenden a una pluralidad

de monómeros idénticos, oligómeros que comprenden a diferentes monómeros del mismo tipo, o hetero-oligómeros que comprenden a diferentes tipos de monómeros, donde cada tipo de monómero podría ser idéntico o diferente.

5 **[0154]** Dividir: proceso por el cual moléculas modeladas, o complejos se comprenden a aquellas moléculas enlazadas a una plantilla, son enlazadas preferencialmente a una molécula objetivo y separadas de las moléculas modeladas, o complejos y comprenden a aquellas moléculas enlazadas a una plantilla, que no tienen una afinidad para -y consecuentemente no está enlazado a- aquellas moléculas objetivo. Dividir puede lograrse por medio de varios métodos conocidos en la industria. El único requerimiento es un sistema para separar moléculas objetivas modeladas enlazadas a una molécula objetivo de moléculas modeladas no enlazadas a moléculas objetivo. La opción del método de división dependerá en las propiedades de la molécula objetivo y de la molécula modelada y pueden ser hechas de acuerdo a principios y propiedades conocidas para aquellas personas con conocimiento en la industria.

15 **[0155]** Péptidos: pluralidad de residuos de aminoácidos enlazados covalentemente que definen una secuencia y que están enlazados por enlaces de amidas. El término es utilizado en forma análoga con oligopéptido y polipéptido. Los aminoácidos podrían ser aminoácidos naturales y aminoácidos naturales, incluyendo cualquiera de sus combinaciones. Los aminoácidos naturales y/o no naturales podrían ser enlazados por medio de enlaces de péptidos o por medio de enlaces que no sean de péptidos. El término péptido también abarca modificaciones post-interpretación introducidas por medio de reacciones químicas o catalizadas por enzimas, tal como es conocido en la industria. Aquellas modificaciones post-interpretación pueden ser introducidas antes de la división, si fuese deseado. Los aminoácidos, tal como se especifica en este documento, serán preferencialmente en la forma L-estereoisomérica. Se pueden utilizar análogos de aminoácidos en vez de los 20 aminoácidos que ocurren naturalmente. Análogos como esos son conocidos, incluyendo a la fluorofenilalanina, a la norleucina, al ácido acetidin-2-carboxílico, a la cisteína de S-aminoetilo, al triptófano de 4-metilo, y similares.

25 Pluralidad: por lo menos 2.

30 **[0156]** Polímero: molécula modelada caracterizada por una secuencia de residuos enlazados covalentemente donde cada uno contiene un grupo funcional, incluyendo a H. Polímeros de acuerdo al invento comprenden a por lo menos 2 residuos.  
Polinucleótido: refiérase a oligonucleótidos.

35 **[0157]** Precursor: partícula que comprende a un residuo y que es capaz de experimentar una reacción durante la síntesis dirigida por plantilla de una molécula modelada, donde la parte del residuo del precursor es construida en la molécula modelada.

40 **[0158]** Grupo reactivo: grupos reactivos correspondientes que son juntados en contacto reactivo entre sí y son capaces de formar un enlace químico vinculándose, por ejemplo, con elementos codificadores y sus elementos complementarios, o el acoplamiento de grupos funcionales de una molécula modelada.

45 **[0159]** Grupo de reconocimiento: parte de un elemento codificador e involucrado en el reconocimiento del elemento complementario capaz de reconocer al elemento codificador. Grupos preferidos de reconocimiento son bases nitrogenadas naturales y no naturales de un nucleótido natural o no natural.

50 **[0160]** Recombinante: un proceso de recombinación recombina a 2 o más secuencias por medio de un proceso, que tiene como resultado a una secuencia que comprende a secuencias de cada una de las 2 o más secuencias. Cuando se involucra a nucleótidos, la recombinación involucra un intercambio de secuencias de nucleótidos entre 2 o más moléculas de nucleótidos en lugares de secuencias de nucleótidos idénticas, o en lugares de secuencias de nucleótidos que no son idénticas, en cuyo caso la recombinación puede ocurrir aleatoriamente. Un tipo de recombinación entre las secuencias de nucleótidos es denominado en la industria como una mezcla aleatoria genética.

55 **[0161]** Secuencia repetitiva: secuencia de por lo menos dos elementos, grupos, o residuos, que ocurren más de una vez en una molécula.

**[0162]** Residuo: un polímero que comprende una secuencia de residuos enlazados covalentemente, donde cada residuo comprende un grupo funcional.

60 **[0163]** Derivado de ribosa: una partícula de ribosa que forma parte de un nucleósido capaz de ser incorporada enzimáticamente a una plantilla o a una plantilla complementaria. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, derivados que distinguen a los derivados de ribosa de las ribosas de ribonucleósidos naturales, incluyendo a la adenosina (A), a la guanosina (G), a la uridina (U) y a la citidina (C). Ejemplos adicionales de derivados de ribosa son descritos en, por ejemplo, US 5,786,461. El término cubre derivados de deoxirribosas, y, asimismo, con la presentación ya mencionada, los derivados en este caso distinguen al derivado de la deoxirribosa de las deoxirribonucleosidas de deoxirribonucleósidos incluyendo a la deoxiadenosina (dA), a la deoxiguanosina (dG), a la deoxitimidina (dT) y a la deoxicitidina (dC).

65

**[0164]** Enlazador selectivamente separable: enlazadores que son selectivamente separables no son separables bajo condiciones donde un enlazador separable es separable. Asimismo, es posible separar a los enlazadores separables enlazando a elementos complementarios y a grupos funcionales en una molécula modelada sin al mismo tiempo separar a enlazadores que son selectivamente separables que enlazan - en la misma molécula modelada- a un subconjunto de elementos complementarios y grupos funcionales. Por lo tanto, es posible obtener un complejo que comprende a una molécula modelada y a la plantilla que ha dirigido la síntesis mediada por plantilla de la molécula modelada, donde la plantilla y la molécula modelada están enlazadas por uno o más, preferiblemente un, enlazador selectivamente separable.

**[0165]** Reconocimiento específico: la interacción de, por ejemplo, un elemento codificador, preferiblemente un elemento complementario predeterminado. Un reconocimiento ocurre cuando la afinidad de un grupo de reconocimiento del elemento codificador para un grupo complementario resulta en la formación predominantemente de un sólo tipo de compañeros correspondientes de enlace. Grupos de emparejamientos erróneos simples no excluyen a un reconocimiento específico de compañeros correspondientes de enlaces. Reconocimiento específico es un término que es definido en una forma individual para cada caso. En el contexto de una interacción específica entre compañeros predeterminados de enlace, por ejemplo, una molécula modelada y una molécula objetivo, se observa una interacción de enlace de la molécula modelada y de la molécula objetivo con una afinidad más alta que aquella medida entre una mezcla de una molécula objetivo y una molécula candidata de plantilla. Para comparar ambas afinidades de enlace, las condiciones de ambas reacciones de enlace deben ser esencialmente similares y preferiblemente las mismas, y las condiciones deberían ser comparables a las condiciones de su intención de uso. Para comparaciones más precisas, se deben hacer medidas que reflejen la interacción entre la molécula modelada completa y el objetivo completo. Las moléculas modeladas del invento pueden ser seleccionadas para ser tan específicas como sea requerido, ya sea al establecer condiciones de selección que demandan una especificidad como requisito, o al personalizar y modificar a las moléculas modeladas.

**[0166]** Subunidad: monómero del elemento codificador que comprende por lo menos a una de esas sub unidades.

**[0167]** Soporte: miembro sólido o semisólido al cual, por ejemplo, los elementos de codificación pueden estar adheridos durante la interacción con por lo menos un elemento complementario de un bloque de construcción. Las moléculas funcionales o las moléculas objetivo también pueden estar adheridas a un soporte sólido durante la dirección. Ejemplos de soportes incluyen superficies planas incluyendo obleas de silicio, así como microesferas.

**[0168]** Marcación: entidad capaz de identificar un compuesto al cual está asociado.

**[0169]** Molécula objetivo: cualquier compuesto de interés al cual una molécula modelada en la forma de un ligando es deseada. Una molécula objetivo puede ser una proteína, una proteína de fusión, un péptido, una enzima, un ácido nucleico, una proteína enlazadora de ácidos nucleicos, un carbohidrato, un polisacárido, una glicoproteína, una hormona, un receptor, un ligando receptor, un componente de membrana celular, un antígeno, un anticuerpo, un virus, un componente de un virus, un sustrato, un metabolito, un análogo de estado de transición, un cofactor, un inhibidor, un medicamento, una sustancia controlada, un colorante, un nutriente, un factor de crecimiento, una toxina, un líquido, un lípidido, etcétera, sin limitaciones.

**[0170]** Plantilla: la plantilla se refiere a una plantilla de elementos de codificación y una plantilla (complementaria) de elementos complementarios a menos que se especifique otra forma. Cuando se hace referencia a una plantilla de elementos codificadores, cada elemento codificador es enlazado covalentemente a un elemento de codificación cercano. Cada elemento de codificación es capaz de reconocer a un elemento complementario predeterminado. La plantilla podría ser lineal o ramificada. Una plantilla de elementos de codificación participa activamente en la síntesis de la molécula modelada, y la actividad modelada involucra la formación de compañeros específicos de emparejamiento en la forma de híbridos de elementos codificadores: elementos complementarios, donde el elemento complementario forma parte de un bloque de construcción que también comprende al grupo funcional que forma parte de la molécula modelada. La plantilla es preferiblemente una cadena de nucleótidos o análogos de nucleótidos. Cuando la plantilla comprende una cadena de nucleótidos, los nucleótidos podrían ser naturales o no naturales, y podrían estar enlazados por medio de, por ejemplo, enlaces de fosforotioatos o enlaces de fosfodiésteres. Los análogos de nucleótidos pueden ser enlazados por medio de, por ejemplo, enlaces de amidas, enlaces de péptidos o cualquier medio equivalente capaz de enlazar análogos de nucleótidos para permitir que la cadena de análogos de nucleótidos se hibride específicamente con otra cadena de nucleótidos o análogos de nucleótidos. La partícula de azúcar de un nucleótido o un análogo de nucleótidos podría ser una ribosa o una deoxirribosa, un derivado de ribosa, o cualquier otra partícula o molécula que permita a la plantilla o a la plantilla complementaria hibridarse específicamente a otra cadena de nucleótidos o de análogos de nucleótidos.

**[0171]** Síntesis dirigida por plantillas: usado en forma de sinónimo con la incorporación dirigida por plantilla y la síntesis de plantilla. La síntesis dirigida por plantillas es el proceso, en el cual, la formación de una molécula modelada comprende una secuencia de grupos funcionales enlazada covalentemente que involucra contactar a una cadena de elementos codificadores con elementos complementarios específicos. El proceso, por lo tanto, define una relación de uno a uno entre los elementos codificadores y los grupos funcionales, y el elemento codificador contactado de la plantilla dirige la incorporación del grupo funcional a la molécula modelada que comprende de una

secuencia de grupos enlazados covalentemente. Asimismo, existe una relación predeterminada de uno a uno entre la secuencia de los grupos funcionales de la molécula modelada y la secuencia de los elementos codificadores de la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada. Por lo tanto, durante la síntesis modelada de la molécula modelada, un grupo funcional está contactando inicialmente -por medio de una partícula enlazadora y/o un elemento complementario, o de otra forma- al elemento codificador capaz de modelar al grupo funcional específico en la molécula modelada. Cuando la plantilla comprende o consiste esencialmente de nucleótidos, una síntesis dirigida por plantillas de un oligonucleótido se basa en una interacción entre cada nucleótido con su compañero de emparejamiento en la plantilla en una forma de emparejamiento de una base a una base. La interacción específica la incorporación de nucleótidos complementarios opuestos a sus compañeros de emparejamiento de base en la plantilla. Consecuentemente, una base, incluyendo una base heterocíclica, de cada hebra de oligonucleótidos interactúa cuando se forman parejas de bases específicas. Esta especificidad de emparejamiento de bases podría alcanzarse a través de interacciones de enlaces de hidrógeno de Watson-Crick entre las bases, donde las bases podrían ser bases naturales (es decir, A, T, G, C, U), y/o no naturales tales como aquellas presentadas en, por ejemplo, US 6,037,120, incorporada a este documento por referencia. Ejemplos adicionales de bases no naturales son, por ejemplo, PNA (ácido nucleico de péptidos - peptide nucleic acid), LNA (ácido nucleico bloqueado - bock nucleic acid) y morfolinos. Emparejamientos de bases de oligonucleótidos que contienen parejas base que no son estándar pueden lograrse por otros métodos aparte de enlaces de hidrógeno (por ejemplo, interacción entre bases nitrogenadas hidrofóbicas y estructuras "complementarias"; Berger et al., 2000, Nucleic Acids Research (Investigación de Ácidos Nucleicos), 28, pp. 2911-2914). Las hebras de oligonucleótidos que interactúan, así como los nucleótidos individuales son denominados complementarios. La especificidad de la interacción entre los oligómeros resulta del emparejamiento específico de bases de un nucleótido con otro nucleótido o un subconjunto predeterminado de nucleótidos, por ejemplo, el emparejamiento las bases de A con U, y el emparejamiento de las bases de C con G.

**[0172]** Modelado: característica de la molécula modelada del complejo que comprende a una plantilla enlazada a la molécula modelada, donde la molécula modelada puede obtenerse por medio de una síntesis dirigida por la plantilla utilizando a la plantilla. Por lo tanto, un componente del complejo (la plantilla) es capaz de modelar la síntesis del otro componente (la molécula modelada). El término también es utilizado para describir la síntesis de la molécula modelada que involucra la incorporación a una molécula modelada de grupos funcionales, donde la incorporación de cada grupo funcional involucra contactar a un elemento codificador con un grupo funcional particular, o con un bloque de construcción que comprende a dicho grupo funcional, donde el elemento codificador contactado de la plantilla dirige la incorporación de los grupos funcionales a la molécula modelada enlazada a la plantilla que modeló de esta forma la síntesis de la molécula modelada. Por lo tanto, durante la síntesis modelada de una molécula modelada, un grupo funcional contacta inicialmente -ya sea directamente o por medio de una partícula enlazadora y/o un elemento complementario- al elemento codificador capaz de modelar a aquel grupo funcional específico a la molécula modelada.

**[0173]** Molécula modelada: molécula que comprende una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada se puede obtener por medio una síntesis dirigida por una plantilla utilizando a la plantilla. Por lo tanto, un componente del complejo (la plantilla) es capaz de modelar la síntesis del otro componente (la molécula modelada). Cuando la plantilla comprende o consiste esencialmente de nucleótidos, la plantilla es capaz de ser amplificada, donde dicha amplificación de la plantilla resulta en una pluralidad de moléculas modeladas, donde cada molécula modelada es generada por una síntesis dirigida por la plantilla utilizando a dicha plantilla. Después de la amplificación de una plantilla, o de una plantilla complementaria, las moléculas modeladas pueden ser generadas por una síntesis dirigida por plantillas utilizando una plantilla de elementos codificadores o una plantilla complementaria de elementos complementarios como una plantilla para la síntesis dirigida por plantilla de la molécula modelada.

**[0174]** Modelar: el proceso de generar una molécula modelada.

**[0175]** Variante: una plantilla o una molécula modelada que exhibe cierto nivel de identidad u homología en relación a una plantilla predeterminada o a una molécula modelada, respectivamente.

### Descripción detallada del invento

**[0176]** En una sección importante de este invento, se suministra una "presentación química de moléculas modeladas" que permite la generación de un número enorme de "polímeros modelados" (por ejemplo desde alrededor de  $10^3$  a alrededor de más de, por ejemplo,  $10^{18}$ , tal como se describe en otras secciones de este documento), donde cada molécula modelada es enlazada individualmente a una "plantilla" que sirve como identificación de aquel polímero individual (su secuencia de residuos), así como un medio de amplificación (muchas copias de la molécula pueden ser preparadas por un proceso que replica la plantilla). Secciones preferidas del invento son presentadas en la figura 1 ilustrando los varios pasos del método del invento.

#### Paso 1. Síntesis

**[0177]** Diferentes bloques monoméricos de construcción son sintetizados. Los bloques de construcción, comprenden

a una entidad funcional y un elemento complementario y son enlazados por medio de enlazadores separables (figuras 3 y 4). Bloques de construcción preferidos comprenden a un nucleótido al cual se ha adherido una entidad funcional a través de un enlazador separable, y donde la entidad funcional comprende o consiste esencialmente de una unidad polimérica "activable" (figura 6).

5

#### Paso 2. Incorporación

**[0178]** Los bloques de construcción son utilizados como sustratos en una síntesis polimérica que depende de la plantilla. En una sección, los bloques de construcción son derivados de nucleótidos y una polimerasa es usada preferiblemente para incorporar a los derivados de nucleótidos a una hebra de oligonucleótidos de acuerdo a las direcciones de una plantilla de oligonucleótidos. Como resultado, una plantilla complementaria (una cadena de bloques incorporados de construcción) es formada, de la cual sobresalen las entidades funcionales. La secuencia de las entidades funcionales es determinada por la secuencia de los elementos codificadores, tales como los nucleótidos, de la plantilla.

15

**[0179]** La figura uno describe el uso de un bloque de construcción que porta al enlazador selectivamente separable el cual, después de una polimerización y activación, es capaz de enlazarse al polímero modelado de su plantilla. Alternamente, el enlazador selectivamente separable puede conformarse de un oligo capaz de un recosido corriente arriba o corriente abajo desde la porción de codificación polimérica de la plantilla (refiérase, por ejemplo, a la figura 7 u 8), o el enlace podría ser hecho directamente a la plantilla.

20

**[0180]** El bloque de construcción puede ser incorporado, preferiblemente, por una enzima, tal como, por ejemplo, una polimerasa de ADN, una polimerasa de ARN, una transcriptasa reversa, una ligasa de ADN, una ligasa de ARN, una polimerasa de ADN Taq, una transcriptasa reversa de VIH-1, un fragmento Klenow, o cualquier otra enzima que catalice de la incorporación de elementos complementarios tales como mononucleótidos o polinucleótidos. En algunos de estos casos, un cebador es requerido (por ejemplo, una polimerasa de ADN). En otros casos, ningún cebador es requerido (por ejemplo, una polimerasa de ARN).

25

#### Paso 3. Dimerización

30

**[0181]** Cada entidad funcional ha reaccionado, preferiblemente, con entidades funcionales cercanas para formar un polímero durante, o después de, la formación de la plantilla complementaria. Un cambio de condiciones, por ejemplo, una fotólisis, un cambio de temperatura, o un cambio de pH, podrían iniciar la polimerización ya sea durante, o después de, complementar la formación de la plantilla.

35

#### Paso 4. Activación

**[0182]** El polímero formado es liberado preferiblemente de los elementos complementarios por medio de una separación de por lo menos un enlazador, o una pluralidad de enlazadores separables, excepto en una o más posiciones predeterminadas, incluyendo una sola posición, donde el enlazador no es separable bajo condiciones que resultan en la separación de los enlazadores que quedan. El resultado es un polímero modelado adherido a una o más posiciones, preferiblemente solo en una posición, a la plantilla que lo codifica.

40

#### Paso 5. Selección y amplificación

45

**[0183]** Un proceso de selección puede ser realizado subsiguientemente, en el cual un número enorme de moléculas modeladas diferentes, cada una adherida a la plantilla que dirigió su síntesis, se le asigna un objetivo molecular o físico (por ejemplo, un receptor biológico de una superficie), o es expuesta a cierta examinación. Las moléculas modeladas que tienen las características deseadas (por ejemplo, afinidad de enlace a un receptor) son recuperadas y amplificadas, al amplificar primero las plantillas, y luego usar las plantillas para una nueva ronda de síntesis polimérica modelada. El proceso de selección y amplificación puede ser repetido varias veces, hasta que un polímero con características apropiadas (por ejemplo, una alta afinidad para el resto) se aísla.

50

**[0184]** Un protocolo típico de selección involucra la adición de una población (una biblioteca) de complejos plantilla-molécula modelada a una columna de afinidad, a la cual un objetivo molecular específico (por ejemplo, un receptor) ha sido inmovilizado. Después de lavar la columna, los enlazadores son eluidos. Este eluido consiste de una población enriquecida de complejos plantilla-molécula modelada con una afinidad en relación a la molécula objetivo inmovilizada. La población enriquecida podría ser obtenida a través de una ronda de amplificaciones, y luego ser sujeta a una ronda de selección, donde las condiciones podrían, opcionalmente, ser más exigentes. Después de varias rondas de selección y amplificación, se obtiene una población enriquecida de enlazadores de alta afinidad.

55

**[0185]** Cuando se selecciona la habilidad de una molécula modelada para internalizarse en una célula, el paso de selección podría involucrar una simple mezcla de la población de los complejos plantilla-molécula modelada con células. Después de la incubación (para permitir la internalización de los complejos plantilla-molécula modelada), las células son lavadas, y los complejos plantilla-molécula modelada podrían ser recuperados por medio de lisis celular. Tal como se menciona anteriormente, los complejos plantilla-molécula modelada podrían ser amplificados y

65

expuestos a más rondas de selección y amplificación. Después de varias rondas de selección y amplificación, se obtiene una población enriquecida de moléculas modeladas con la capacidad de internalizarse.

### **Bloques de construcción-diseño molecular**

5 **[0186]** Los bloques de construcción (también denominados “monómeros”) son preferiblemente del diseño general que se muestra en la figura 3 y 4. El monómero, en una sección, comprende a los siguientes elementos: estructura-enlazadora-de-elementos- complementarios que comprende a grupos reactivos de tipo II - grupo funcional, donde el elemento complementario comprende o consiste esencialmente de un grupo de reconocimiento y grupos reactivos tipo I. En este caso, el enlazador es preferiblemente un “enlazador que no deja vestigios”, es decir, un enlazador que no deja a ninguna entidad molecular (no deseable) en la entidad funcional. Los bloques de construcción con esta composición son utilizados en, por ejemplo, la figura 15, ejemplo 7.

15 **[0187]** alternamente, el monómero podría tener la composición de una estructura -de un grupo funcional-enlazadora-de elementos complementarios que contiene a grupos reactivos de tipo II, en cuyo caso el grupo funcional deseado es creado como un resultado de la separación del enlazador. Los bloques de construcción con esta composición son utilizados en, por ejemplo, la figura 17, ejemplo 1.

20 **[0188]** Los grupos funcionales deben ser compatibles con el método deseado para la incorporación de elementos complementarios, sus polimerizaciones y activación. Obviamente, es importante preservar la integridad de la plantilla y de la molécula modelada en estos procesos.

25 **[0189]** Grupos funcionales que no son compatibles con las condiciones de incorporación, o dimerización o activación deben ser protegidos de estos procesos, o alternamente, los grupos funcionales deben ser introducidos después de que estos procesos hayan ocurrido. La opción posterior es realizada al modelar a un grupo funcional (por ejemplo, un disulfuro activado) que es compatible con la incorporación, polimerización y activación que reaccionará específicamente con una molécula bifuncional (por ejemplo, un tiol conectado al grupo funcional deseable, R<sub>x</sub>), que es agregado después de la activación. Alternamente, puede introducirse funcionalidades por medio de, por ejemplo, oxidaciones, o cualquier otra forma de tratamiento, de las entidades funcionales incorporadas después de la activación. De esta forma, pueden incorporarse las funcionalidades tales como componentes de moléculas ejecutoras naturales o medicamentos sintéticos que son difíciles de manejar de otra forma.

35 **[0190]** En algunas secciones del proceso del invento aquí descrito, no existe la necesidad para un enlazador separable, puesto que la reacción de polimerización involucra la separación del enlazador (figura 14 y figura 14, ejemplo 1).

40 **[0191]** Cuando los elementos complementarios son nucleótidos podrían contener 1, 2 o varios nucleótidos o análogos de nucleótidos. El uso de di-, tri-, o nucleótidos más largos presenta varias ventajas. Primero, una diversidad más alta de monómeros puede ser codificada por la plantilla. 2º, los requerimientos para el lugar de adherencia de la entidad funcional al elemento complementario se vuelven más relajada. 3º, existiría menos aglutinamiento por nucleótido en el polinucleótido formado, potencialmente conllevando a una presentación de eficiencias más altas. 4º permitiría la presentación de polímeros con una longitud más larga de unidades residuales. También, permitiría la presentación de grupos funcionales más grandes.

45 **[0192]** En casos en los que se utiliza una polimerasa para la incorporación del nucleótido que comprende a bloques de construcción, se prefiere que los nucleótidos sean derivados en una forma que permite su incorporación específica y eficiente en la hebra que está creciendo.

50 **[0193]** Más de 100 nucleósidos y derivados de nucleótidos diferentes están comercialmente disponibles o pueden ser hechos utilizando técnicas simples (Eaton, Current Opinion in Chemical Biology (Opinión Actual en Biología Química), 1997, 1: 10-16). Además, muchos derivados de nucleótidos modificados en las bases o en las ribosas, son incorporados eficientemente y específicamente por varias polimerasas, en particular la polimerasa de ARN de T7 y la transcriptasa reversa (figura 9). Nucleótidos con adiciones de hasta 300 Da han sido incorporados específicamente y eficientemente (Wiegand et al., Chemistry and Biology (Química y Biología), 1997, 4: 675-683; Fenn y Herman, Analytical Chemistry (Química Analítica), 1990, 190: 78-83; Tarasow y Eaton, Biopolymers (Biopolímeros), 1998, 48: 29-37). Adicionalmente a las 4 parejas de bases naturales (AT o AU, TA o UA, CG, GC), por lo menos 8 parejas base son conocidas por hibridar específicamente, algunas de las cuales están incorporadas a oligonucleótidos por polimerasas en una forma que depende de plantillas.

60 **[0194]** La incorporación de elementos complementarios puede catalizarse por medio de catalizadores químicos o biológicos. Cuando los bloques de construcción son nucleótidos, los catalizadores relevantes específicos son polimerasas de ADN y de ARN que dependen de plantillas, incluyendo transcriptasas reversas, y ligasas de ADN y ARN, ribozimas y deoxirribozimas. Ejemplos específicos incluyen a la transcriptasa reversa de VIH-1, la transcriptasa reversa de AMV, la polimerasa de ARN de T7 y la polimerasa mutante Y639F de ARN de T7, Secuencias, polimerasas de ADN de Taq, el fragmento de Klenow (fragmento grande de la polimerasa I de ADN), ligasas de ADN, polimerasas de ADN de T7, polimerasas de ADN de T4, Ligasas de ADN de T4, polimerasas de ARN de E.

coli, polimerasas de ADN de rTh, polimerasas de ADN de Vent, polimerasas de ADN de Pfu, polimerasas de ADN de Tte, ribozimas con ligasas o actividades de replicasas tales como aquellas descritas en Johnston et al., Ciencia, 18 de mayo de 2001, pp. 1319-1325, y otras enzimas que aceptan nucleótidos y/u oligonucleótidos en calidad de sustratos. Polimerasas mutantes o diseñadas con características mejoradas, un ejemplo, especificidades más amplias de sustratos nucleótidos, y mutaciones en las cuales la función de revisión ha sido eliminada (por ejemplo, al eliminar a la actividad de las nucleasas), son particularmente relevantes. Las polimerasas podrían utilizar nucleótidos de una o de doble hebra como plantillas, y producir productos de nucleótidos de una o de doble hebra.

[0195] Los lugares de modificación han demostrado ser aceptados por las polimerasas incluyendo a la siguiente lista de ejemplos (refiérase también a la figura 9):

Nucleótido	Lugar de modificación
dATP	Posición 3
dATP	Posición 7
dATP	Posición 8
dATP	2' (partícula de deoxirribosa)
dATP	4' (partícula de deoxirribosa)
dGTP	Posición 7
dCTP	2' (partícula de deoxirribosa)
dUTP	2' (deoxirribosa)
UTP	Posición 5
ATP	Posición 8

[0196] Las transferasas terminales, las ligasas de ARN, las quinasas de polinucleótidos y otras enzimas independientes de plantillas que aceptan a nucleótidos y/u oligonucleótidos en calidad de sustratos, incluyendo a variaciones diseñadas o mutantes, podrían ser utilizadas para algunas de las aplicaciones y variaciones de métodos descritos en este invento.

[0197] Podría ser posible el adherir a entidades funcionales en otros lugares en el nucleótido, sin eliminar la especificidad de hibridación o de incorporación. Particularmente cuando se utilizan a elementos complementarios que son di-, tri- o poli nucleótidos, podría ser posible adherir a entidades funcionales a estos lugares alternos sin inhibir la incorporación específica.

**Enlazadores separables y no separables**

[0198] Una selección de enlazadores separables y grupos de protección, así como los agentes que lo separan, son ilustrados en la figura 10. En un aspecto del invento, el enlazador podría ser seleccionado de la siguiente lista: carbohidratos y carbohidruros sustituidos; vinilos, polivinilos y polivinilos sustituidos; acetilenos, poliacetilenos; arilos/hetarilos, poliarilos/hetarilos y poli arilos/polihetarilos sustituidos; éteres, poliéteres como por ejemplo, polietilenglicol y poliéteres sustituidos; aminas, poliaminas y poliaminas sustituidas; polinucleótidos naturales y no naturales de una sola hebra, de doble hebra o de una doble hebra parcial y polinucleótidos naturales y no naturales sustituidos de doble hebra, de una sola hebra o de una doble hebra parcial; poliamidas y polipéptidos naturales y no naturales y poliamidas sustituidas y polipéptidos sustituidos naturales y no naturales.

[0199] En un aspecto del invento se prefiere que los enlazadores no reaccionen con otros enlazadores, elementos complementarios o entidades funcionales, en el mismo monómero o en otro monómero. Además, en algunos de los esquemas propuestos en este documento, es deseable que el enlazador no pueda separarse por medio de condiciones de polimerización. Finalmente, se prefiere que las condiciones de separación de enlazadores no afecten la integridad de la plantilla, de la plantilla complementaria o de las entidades funcionales.

[0200] Los enlazadores pueden ser separados de varias formas cuando se exponen a condiciones predeterminadas. Los enlazadores pueden separarse, por ejemplo, con ácidos, con bases, con fotólisis, con temperatura incrementada, con agentes agregados, con enzimas, con ribozimas u otros catalizadores. Ejemplos de enlazadores separables y sus grupos respectivos de protección son mostrados en la figura 10, junto con las condiciones para la separación de enlazadores, y los productos de separación.

[0201] Para mantener un enlace físico entre la plantilla y la molécula modelada, es necesario por lo menos un enlazador no separable. Este enlazador no separable es preferiblemente flexible, permitiéndole exponer a la molécula modelada en una forma óptima.

**Grupos funcionales**

[0202] El uno o más grupos funcionales que aparecen en la entidad funcional podrían ser seleccionados de una variedad de grupos químicos que dan a la molécula modelada las propiedades deseadas o sirven otro propósito beneficioso, tal como un lipófilo incrementado para propósitos de recuperación. Una selección no limitante de grupos

funcionales se indica a continuación: hidroxilo, alcoxi, hidrógeno; aminas primarias, secundarias y terciarias; ácidos carboxílicos; ésteres de ácidos carboxílicos; fosfatos, fosfonatos; Sulfonatos, sulfonamidas; Amidas; Carbamatos; Carbonatos; Ureas; Alcanos, Alquenos, Alquinos; Anhídridos; Cetonas; Aldehídos; Nitratos, nitritos; Iminas; fenilos y otros grupos aromáticos; Piridinas, pirimidinas, purinas, indoles, imidazoles, y bases heterocíclicas; Heterociclos; policiclos; Flavinas; Haluros; Metales; Quelatos; inhibidores basados en mecanismos; catalizadores de moléculas pequeñas; Dextrinas, sacáridos; Fluoresceína, Rodamina y otros fluoróforos; Policetidos, péptidos, varios polímeros; enzimas y ribozimas y otros catalizadores biológicos; grupos funcionales para acoplamiento post-polimerización para post-activación de grupos funcionales; medicamentos, por ejemplo, la partícula de taxol, la partícula de aciclovir, "productos naturales"; estructuras supra moleculares, por ejemplo, nano-agrupaciones; lípidos; y oligonucleótidos, análogos de oligonucleótidos (por ejemplo, PNA, LNA, morfolinos).

### **Grupos activos de tipo II**

[0203] una variedad de grupos reactivos 2 podrían ser utilizados en la síntesis modelada. Ejemplos de grupos reactivos incluyen, pero no se limitan a, N-carboxianhídridos (NCA), N-tiocarboxianhídridos (NTA), Aminas, ácidos carboxílicos, cetonas, aldehídos, hidroxilos, tioles, ésteres, tioésteres, sistemas conjugados de enlaces dobles, haluros de alquilo, hidracinas, ésteres de N-hidroxisuccinimida, epóxidos, haloacetilos, sacáridos activados por UDP, sulfuros, cianatos, Carbonilimidazoles, Tiacinonas, fosfinas, Hidroxilaminas, Sulfonatos, nucleótidos activados, vinilcloruros, Alquenos, y quininas.

### **Polimerización**

[0204] Las reacciones que conllevan a la formación de polímeros se denominan reacciones de polimerización. Las clases de reacción importantes son las polimerizaciones aniónicas, las polimerizaciones catiónicas, las polimerizaciones radicales y las polimerizaciones pericíclicas.

[0205] Aunque las reacciones de polimerización en una solución son logradas por medio de métodos de última tecnología, la polimerización de entidades funcionales enlazadas a una formación tal como se describe en este documento no constituyen reacciones de tipo estándar. Únicamente unas pocas reacciones de polimerización han sido realizadas hasta este momento en un formato de formaciones, y no en conexión con los métodos de este invento. Consecuentemente, será un asunto de diseño molecular de las entidades funcionales y sus enlazadores y puntos de adherencia en los elementos complementarios (por ejemplo, la adherencia a la base, a la ribosa o al fosfato de un nucleótido), así como un asunto de optimizar las condiciones de polimerización, para reducir preferiblemente, minimizar o incluso eliminar cualquier reacción no deseable que esté ocurriendo en la solución mientras se incrementa o se maximiza una polimerización correcta dirigida por la plantilla en la formación.

[0206] Este invento, en una sección, utiliza reacciones de polimerización que son en principio, conocidas por la última tecnología en el sentido en que son utilizadas rutinariamente en esquemas de síntesis de soluciones. Sin embargo, en este invento, los reactivos (grupos reactivos) son mantenidos en una proximidad cercana por su adherencia a los elementos de una plantilla complementaria. Esto incrementa la concentración local significativamente. Esquemas típicos de síntesis en las soluciones utilizan a concentraciones que varían entre 1  $\mu\text{M}$  - 1 mM de los reactivos. Cuando se hacen las formaciones tal como se presenta en este documento, la concentración local será comúnmente de desde 1000 veces a 1,000,000 de veces más alta. Como resultado, las reacciones pueden, en principio, ser mucho más eficientes. Sin embargo, las reacciones son diseñadas preferiblemente de tal forma que la incidencia de reacciones colaterales no deseables sea evitada. El diseño molecular y las condiciones de polimerización de acuerdo al invento reflejan este hecho y puede ser optimizadas aún más por una persona con conocimiento y la industria que esté en búsqueda de las condiciones de polimerización y de diseño molecular que maximicen la polimerización relativa dirigida por plantillas en una solución.

[0207] Dependiendo del tipo de iniciador y de grupos reactivos, la polimerización podría ser iniciada y/o catalizada por cambios en el pH y/o la temperatura, la adición de reactivos para catalización, enzimas o ribosomas, o luz, ultravioleta u otra radiación electromagnética, etcétera. Enzimas particularmente relevantes incluyen a proteasas, ligasas proteínicas (por ejemplo, subtiligasas), sintetetasas de UDP-glicógeno, CGTasas y sintetasas de policétidos. En casos en los cuales las condiciones y diseños moleculares han sido ajustados precisamente, para permitir una polimerización eficiente de los reactivos cuando sean expuestos a formaciones en la plantilla complementaria, pero manteniendo una reacción insignificante en la solución, la polimerización no necesita ser iniciada. La concentración local incrementada en la formación simplemente controla a la polimerización.

[0208] En los casos en los cuales la incorporación de bloques monoméricos de construcción son incorporados por una enzima, una persona podría fusionar esta enzima con una de las enzimas mencionadas anteriormente (por ejemplo, la sintetetasa de UDP-glicógeno). Esto permitiría a la proteína de fusión incorporarse por primera vez a un monómero a través de la reacción de sus grupos reactivos tipo I, y justo después (en la medida en que el monómero que ahora está incorporado emerge del lugar activo de la enzima), la otra mitad de la proteína de fusión (por ejemplo, la sintetetasa de UDP-glicógeno) se enlazaría a la entidad funcional de aquel monómero de la entidad funcional del monómero previo en la plantilla complementaria.

**[0209]** Los grupos funcionales (o estructuras esenciales) podrían tener que ser protegidas, para no reaccionar con los grupos reactivos u otros compuestos del sistema durante la incorporación, polimerización y activación. Esto puede lograrse utilizando grupos de protección estándar, algunos de los cuales están mencionados en la figura 10.

5 **[0210]** Las reacciones de polimerización aquí descritas en secciones posteriores de este documento son divididas en 2 grupos principales, que dependen de si la entidad funcional se mantiene en una orientación fija en relación a la plantilla complementaria.

10 **Grupo 1: Las entidades funcionales que pueden rotar en relación a los elementos complementarios (y pueden, por lo tanto, rotar en relación a la plantilla complementaria).**

Enlace directo a los grupos reactivos: el grupo reactivo tipo II de un monómero reacciona directamente con el grupo reactivo tipo II de otro monómero

15 **[0211]**

a). En un ejemplo, la entidad funcional porta 2 grupos reactivos X1 y X2 del mismo tipo. El “mismo tipo” en este respecto se refiere a que una X1 específico puede reaccionar con un X1 idéntico y un X2 no idéntico. En la figura 11, X1 y X2 son idénticos, por lo cual ambos son simbolizados con una X. X podría reaccionar con otra X para formar a XX (figura 11). En forma de ejemplo, X podría ser un tiol (-SH) y el producto resultante, un disulfuro (-SS-). En otro ejemplo, X podría ser una partícula cumarina la cual cuando es expuesta a una foto-inducción reacciona con una partícula cumarina de un monómero cercano (figura 11, ejemplo 1).

20 En la mayoría de casos, la reacción de X con X resulta en la pérdida de un átomo o de una partícula molecular; en el caso del tiol, por ejemplo, se pierden 2 protones cuando se forma el disulfuro. El hecho que XX (el resultado de la reacción entre 2 grupos reactivos tipo 2) no contiene todos los componentes de X más X, es indicado en la figura 5, A) donde, de hecho, ambos tipos de grupos reactivos (tipo I y tipo II) forman, en el momento de la reacción, a una entidad molecular que es ligeramente diferente de los grupos reactivos (simbolizada por círculos que se superponen en la figura).

25 b). Los 2 grupos reactivos tipo 2 podrían ser de un tipo diferente. El término “de tipo diferente” se refiere en este documento a que ellos que reaccionan con diferentes tipos de moléculas. Por ejemplo, X y Y podrían ser nucleófilos y electrófilos, respectivamente. X y Y reaccionan para formar a XY (figura 12). Para moléculas modeladas más largas, una rotación libre de las entidades funcionales en relación a la plantilla complementaria representa un problema potencial, si las entidades funcionales no reaccionan hasta que muchos monómeros hayan sido incorporados. En este caso, la podría resultar una formación de aglutinamientos (figura 13), lo cual reduce el monto de los polímeros modelados de longitud completa. El problema es, sin embargo, solo significativo para polímeros más largos; partiendo de la experiencia con la presentación biológica de los  $\alpha$ -péptidos, tal como una presentación de fagos y una presentación de polisomas, se conoce que eficiencias de presentación tan bajas como 1% es suficiente como para aislar a péptidos con una afinidad alta de enlaces para un objetivo específico.

40 **[0212]** En ciertos casos, los monómeros incorporados reaccionan justo después de su incorporación a la plantilla complementaria (momento en el cual el siguiente monómero en la plantilla complementaria todavía no ha sido incorporado). Por lo tanto, el último monómero incorporado reaccionará con el penúltimo monómero incorporado, que ya es una parte de la plantilla complementaria. Como un resultado, la formación de aglutinamientos no será un problema significativo en este caso.

45 **[0213]** X y Y podrían ser una amina y un ácido carboxílico. En la presencia de carbodiimidas, X y Y reaccionarán para formar una amida XY.

50 **[0214]** Otra versión de este tipo de polimerización involucra la polimerización y activación simultáneas del polímero (figura 14). Los monómeros no contienen una partícula enlazadora separada; en vez de eso, la reacción de polimerización conlleva a la activación (libera a la entidad funcional de la plantilla complementaria). En este esquema, cada monómero es incorporado y reacciona con el monómero incorporado previamente, conllevando a la liberación de los monómeros incorporados previamente de la plantilla complementaria, antes de que el siguiente monómero sea incorporado. La figura 14, ejemplo 1 muestra el uso de este principio para la formación de poliamidas, en este caso  $\beta$ - péptidos. El método, además, podría ser usado, obviamente, para otros péptidos, así como para cualquier tipo de poliamidas.

55 **[0215]** Debido a un diseño apropiado de los monómeros, una persona podría generar otros tipos de enlaces poliméricos por medio de reacciones de sustitución nucleofílicas, incluyendo a enlaces de amidas, ésteres, carbamatos, carbonatos, fosfonatos, fosfodiésteres, sulfonamidas, ureas, carbopéptidos, glicopéptidos, sacáridos, hidracidas, disulfuros y peptoides.

60 **[0216]** En la figura 14, ejemplo 2, el mismo principio es aplicado a un tipo diferente de reacción, una “reacción de polimerización de círculo rodante”. Un sulfonato de alquilo es utilizado aquí en un grupo eficiente que abandona, para controlar la formación de una amina secundaria. El resultado es una poliamina funcionalizada adherida a un extremo de la plantilla que dirigió su síntesis. En una forma análoga, una persona podría generar poliéster y polioéter utilizando diseños moleculares similares. Los polímeros que pueden ser generados al usar a los principios

descritos en la figura 14 y 14, ejemplo 1 y 2, incluyen a los oligodeoxinucleótidos, oligoribonucleótidos, oligonucleótidos quiméricos, análogos de oligonucleótidos (por ejemplo, PNA, LNA), peptoides, polipéptidos y  $\beta$ -péptidos.

5 Polimerización de "relleno": una molécula adicional regula los enlaces entre los grupos reactivos tipo II y los monómeros cercanos  
[0217]

10 a). La entidad funcional porta uno o 2 grupos activos X1 y X2 del mismo tipo, mientras que X1 no puede reaccionar con otro X1 o X2. Por ejemplo, X1 y X2 podrían ser una amina primaria y secundaria, respectivamente. Para polimerizar, se agrega un compuesto del tipo Y1-enlazador-Y2, donde Y1 y Y2 son del mismo tipo. Y puede reaccionar con X, pero es excluido estéricamente o químicamente de la reacción con otro Y. Como resultado, se forma un X-Y-Y-X (figura 15). En forma de ejemplo, X podría ser una amina, y Y un éster activado. En el momento de la reacción, esto formaría un enlace éster-éster (X-Y-Y-X) entre las 2 entidades funcionales.

15 Es preferido que 2X de un monómero no reaccionen en una forma significativa con la misma molécula Y-enlazador-Y. Esto puede ser prevenido, por ejemplo, al imponer limitaciones estéricas en las moléculas, por ejemplo, Ys en la molécula Y-enlazador-Y están más separadas que los Xs en el monómero.

20 La figura 15, ejemplo 2, suministra dos ejemplos de polimerización de "relleno" de poliamidas. En la figura 15, ejemplo 2, A y B, los grupos reactivos tipo 2 son amidas, y la molécula Y-enlazador-Y es un ácido dicarboxílico o un diéster. De cualquier forma, el producto resultante es un polímero de di-amida. Obviamente, el tipo de X y Y podría ser cambiado, de tal forma que en los ejemplos X fuese un ácido carboxílico y Y una amina. Otras combinaciones de X y Y, y sus enlaces resultantes, son dados en la figura 25, que resume algunos tipos de polímeros que pueden ser generados por los varios principios de polimerización descritos en esta patente.

25 Para ciertas reacciones, la molécula enlazadora sólo necesita contener un grupo reactivo X. Un ejemplo es mostrado en la figura 15, ejemplo 3 a, donde las entidades funcionales contienen 2 grupos reactivos tipo II (aminas), y la molécula agregada es un equivalente a fosgeno tal como 1,1'-carbonildiimidazol. El enlace resultante es un enlace de urea. En la figura 15, ejemplo 5, los monómeros contienen 2 grupos de hidroxilos, a los cuales se agrega un fosfodiéster activado o un derivado activado de fosfina tal como una bisaminofosfina siguiendo una activación con tetrazol y una oxidación con *tert*-butilhidroperóxido. El resultado es un enlace de fosfodiéster.

30 La entidad funcional podría, en ciertos casos, contener únicamente a un grupo reactivo tipo II. Se muestra un ejemplo en la figura 15, ejemplo 6, donde un fosfodiéster activado conforma al único grupo reactivo tipo II del monómero. En el momento de la reacción con un dihidroxi, se forma una estructura de fosfodiéster.

En forma de otro ejemplo de polimerización de relleno, la figura 15, ejemplo 7 muestra reacciones pericíclicas de dienos (entidad funcional) que reacciona con alquenos (molécula enlazadora) para formar a un compuesto policíclico.

35 Una consideración general cuando se usa el principio de polimerización de relleno, es el número de estereoisómeros modelados por la misma plantilla. Por ejemplo, en la figura 15, ejemplo 4, A, la entidad funcional contiene 2 aminas primarias. La entidad funcional es conectada a la plantilla complementaria a través de un carbono quiral. La entidad funcional podría rotar libremente alrededor del enlace que conecta su átomo quiral con la plantilla complementaria. Por lo tanto, la reacción de las aminas (X) con las moléculas de enlace (carbonilos activados, (Y)) resultará en la formación de isómeros diferentes de  $2^n$ , donde n es el número de residuos el polímero.

40 Los isómeros representan un incremento significativo de diversidad. Por ejemplo, para un polímero 10-mérico, la quiralidad representa un incremento de 1024 veces en diversidad. Esto, podría, en ciertos casos, ser una ventaja, por ejemplo, si la diversidad monomérica es baja, o si se desea hacer polímeros cortos. Sin embargo, tal "mezcla" del código genético (es decir, una plantilla codifica a diferentes estructuras poliméricas) también reduce la exigencia del proceso de selección. Por lo tanto, en ciertos casos mezclas no son deseables. Uno podría escoger conectar a las entidades funcionales a los elementos complementarios por medio de átomos que no sean quirales. En la figura 15, ejemplo 4, B, se muestra un ejemplo de un átomo que no es quiral (nitrógeno) que conecta a la entidad funcional con la plantilla complementaria. Mezclas no se podrían involucrar en casos en los cuales un elemento complementario especifica isómeros diferentes (tal como fue descrito anteriormente), y mezclas también podrían involucrar casos en los cuales un elemento complementario especifica a entidades funcionales que son ligeramente diferentes o que son completamente diferentes.

50 b). La entidad funcional porta 2 grupos reactivos diferentes de tipo II, X y S (figura 16). X no reacciona con X o S, y viceversa. Antes, durante o después de la incorporación de los monómeros, las moléculas de la forma T-enlazador-Y son agregadas. X podría reaccionar con Y, y S podría reaccionar con T conllevando a la formación de enlaces X-S-T-Y entre las entidades funcionales. Esto es importante para asegurar que X y S de una entidad funcional no puedan reaccionar con T y Y de una molécula enlazadora. Esto podría ser asegurado por un diseño apropiado de la estructura de las entidades funcionales y de la molécula enlazadora. La figura 16, ejemplo 1, suministra un ejemplo de una entidad funcional con grupos reactivos diferentes tipo II, en este caso, una azida y una hidrazida (X y S), y una molécula enlazadora con grupos reactivos diferentes, en este caso una fosfina y una cetona (T-enlazador-Y).

60 [0218] Para moléculas modeladas más largas, una rotación libre de las entidades funcionales en relación a la plantilla complementaria representa un problema potencial, si las entidades funcionales no reaccionan hasta que muchos monómeros hayan sido incorporados. En este caso, podría darse la formación de aglutinamientos (figura 13), lo cual reduce el monto de polímeros modelados de longitud completa. El problema es, sin embargo, únicamente significativo para polímeros más largos, tal como se mencionó anteriormente. Si las moléculas enlazadoras están presentes durante la incorporación de los elementos complementarios, los monómeros

65

incorporados podría reaccionar con las moléculas enlazadoras justo después de su incorporación, o en el caso de la incorporación regulada por enzimas, tan pronto como estos emerjan del lugar activo de las enzimas. La formación de aglutinamientos no sería un problema significativo en estos casos.

5 Polimerización por “compresión”: La reacción de polimerización viaja desde un extremo de la plantilla al otro.

**[0219]** En este método, la reacción de polimerización es direccional, es decir, el proceso de reacciones empieza en un extremo de la plantilla complementaria, y las reacciones migran al otro extremo de la plantilla complementaria, formando, por lo tanto, un polímero modelado.

10 a). Principio general (figura 18). Después de la incorporación de algunos o todos los bloques monoméricos de construcción, se inicia la polimerización desde un extremo de la plantilla, y viaja a lo largo de la plantilla. Por ejemplo, el iniciador podría acoplarse al primero o al último elemento complementario que va a ser incorporado, o podría acoplarse al cebador utilizado en la incorporación mediada por polimerasas de ADN de los derivados de nucleótidos. De cualquier forma, el iniciador reaccionará con el grupo reactivo tipo II del monómero cercano, el cual induce un cambio en la entidad funcional de aquel monómero, permitiendo a éste monómero reaccionar con el siguiente monómero en la cadena, y así sucesivamente. Eventualmente, todos los monómeros habrán reaccionado y un polímero ha sido formado.

15 Podría ser deseable el proteger al iniciador, manteniéndolo para que no reaccione con el monómero cercano hasta que la incorporación haya sido completada, momento en el cual el iniciador será desprotegido. Esto permite que la persona que está haciendo el experimento remueva a todos los iniciadores no incorporados y a elementos complementarios antes de activar al iniciador, lo cual elimina la reacción en la solución entre el iniciador y los elementos complementarios.

20 La desprotección del iniciador podría ser debido a un cambio en pH o en temperatura, la exposición a radiación electromagnética, o la adición de un agente (que remueve a un grupo de protección, o induce un iniciador en una posición específica, o liga o coordina al iniciador natural, para hacerlo más potente). El agente podría ser un catalizador químico o una enzima, por ejemplo, una estereasa o una peptidasa.

25 b). Compresión por medio de una polimerización radical (figura 18, ejemplo 1). El iniciador es un alquil-yoduro, y las entidades funcionales contienen un enlace doble. En el momento de la adición de un iniciador radical, por ejemplo, el amoniopersulfato, el AIBN (azobis-isobutironitrilo) u otros iniciadores de reacciones en cadena radicales, una reacción en cadena radical es iniciada, por la cual, los alquenos reaccionan para formar un alcano extendido y funcionalizado. Eventualmente, el polímero ha sido elaborado, y es activado (separado de la plantilla complementaria, excepto por un punto). El radical que queda en el extremo del polímero podría ser neutralizado por medio de una reacción de terminación radical.

30 c). Compresión por medio de polimerizaciones catiónicas (figura 18, ejemplo 2). El iniciador es un ácido de Lewis. Cuando ocurre la desprotección con un ácido o con otro reactivo de iniciación, se genera a un catión. El carbocatión ataca al doble enlace del monómero cercano, y como resultado, se genera un carbocatión en este monómero. Eventualmente, el polímero de longitud completa ha sido formado, y el polímero es activado.

35 d). Compresión por medio de polimerizaciones nucleofílicas (aniónicas) (figura 18, ejemplo 3). En este ejemplo, el iniciador es un anión de hidroxilo protegido. La entidad funcional porta un peróxido. En el momento de la desprotección del iniciador el hidroxil-anión es formado (por ejemplo, por medio de una desprotección alcalina). Bajo condiciones básicas, el iniciador ataca al epóxido cercano en el carbón menos obstaculizado del anillo. A su vez, esto genera a un hidroxil-anión, que ataca al epóxido cercano. Eventualmente, el polímero completo es formado, y el poliéter puede ser activado. En este ejemplo, todos los enlazadores que conectan al poliéter a la plantilla complementaria son separados.

40 Este tipo de polimerización también es un ejemplo de polimerización de apertura de anillos.

45 e). Polimerización de compresión por medio de apertura de anillos (figura 19). Se muestra al principio general de la polimerización de apertura anular. El iniciador ataca al grupo reactivo X del monómero cercano. X es parte de una estructura anular, y como resultado de la reacción entre el iniciador y X, el anillo se abre, causando que el otro grupo reactivo del monómero sea activado para atacar al siguiente monómero en la formación. La polimerización viaja a lo largo de la hebra, y eventualmente el polímero de longitud completa ha sido formado.

50 f). Formación de  $\beta$ -péptidos por medio de la polimerización de apertura anular de carboxianhídridos (figura 19, ejemplo uno). El iniciador desprotegido, una amina nucleofílica, ataca al carbonilo más electrofílico del N-tiocarboxianhídrido, para formar una amida. CSO es liberado, generando una amina primaria, que a su vez ataca al siguiente monómero en la formación. Eventualmente, la polimerización es completada, y el polímero puede ser activado, creando un  $\beta$ -péptido adherido a la plantilla complementaria o a la plantilla a través de su extremo terminal C. El principio puede ser utilizado para formar otros tipos de péptidos, por ejemplo,  $\alpha$ - péptidos,  $\beta$ - péptidos,  $\gamma$ -péptidos mono- disustituídos de forma D- y L-, carbopéptidos y peptoides (poliglicina N-sustituída), y otros tipos de poliamidas. Además, el principio puede ser utilizado para la generación de otros polímeros, tales como poliésteres, poliureas y policarbamatos.

55 g). Formación de  $\beta$ -péptidos por medio de la polimerización de apertura anular de unidades de tiacianona (figura 19, ejemplo 2). El iniciador desprotegido ataca al tioéster cíclico, para formar una amida. Como resultado, el anillo se descompone para liberar a una tiocetona libre. Esto genera una amina, que ahora puede atacar al tioéster del siguiente monómero en la formación. Cuando la polimerización ha viajado al otro extremo de la plantilla, se activa, generando a un  $\beta$ -péptido adherido a su plantilla por medio del extremo terminal C.

60 El principio puede ser utilizado para formar otros tipos de péptidos, por ejemplo,  $\alpha$ - péptidos,  $\beta$ - péptidos,  $\gamma$ -péptidos mono- disustituídos de forma D- y L-, carbopéptidos y peptoides (poliglicina N-sustituída), y otros tipos de

poliamidas. Además, el principio puede ser utilizado para la generación de otros polímeros, tales como poliésteres, poliureas y policarbamatos.

h) Polimerización por compresión por medio de una reorganización (figura 20). En el momento de la activación del iniciador, que en este caso podría ser un electrófilo, el grupo reactivo tipo II del monómero cercano ataca al iniciador, y como resultado, libera al iniciador del elemento complementario. En el monómero que ataca, la reacción de Y con el iniciador conlleva a la reorganización del monómero, que resulta en la activación de X, el otro grupo reactivo tipo II del monómero (por ejemplo, la reorganización crea a un nucleófilo). Entonces, el siguiente monómero en la formación ataca a este nucleófilo. Eventualmente, un polímero de longitud completa ha sido formado, adherido a un extremo de la plantilla que dirigió esta síntesis.

i). Compresión y activación en un paso (figura 21). Por medio de un diseño apropiado de las entidades funcionales utilizadas para la polimerización de apertura anular, se puede alcanzar la activación como resultado directo de la reacción de polimerización. Al simplemente girar a la entidad funcional de arriba a abajo, es decir, adherir la porción del anillo que no se incorpora al polímero final de la plantilla complementaria, le ahorra al experimentador un paso de activación (compare la figura 21 y la figura 19). Como un ejemplo específico, la adherencia de la estructura anular de 2,2-difeniltiacinona de la figura 19, ejemplo 2, a los elementos complementarios a través de uno de los grupos fenilos conllevaría a la activación como resultado de la reacción de polimerización.

### **Grupo 2: La entidad funcional no puede rotar libremente en relación al elemento complementario**

[0220] En esta sección, los grupos activos de tipo II X y Y son mantenidos en la orientación deseada en relación a la plantilla complementaria (figura 22, a). X y Y pueden, por lo tanto, reaccionar, o reaccionar con una molécula enlazadora, sin el riesgo de formaciones de aglutinamiento (compárese con la figura 13).

[0221] La entidad funcional podría ser mantenida en una orientación fija por un doble enlace, o por enlaces a átomos diferentes en el elemento complementario. La figura 22, de, suministra un ejemplo, donde la entidad funcional es acoplada covalentemente a 2 bases de un nucleótido (el elemento complementario es un dinucleótido, la entidad funcional contiene un dipéptido, y los grupos reactivos son las partículas de aminas y de ésteres, respectivamente).

[0222] Los polímeros que pueden ser elaborados por medio de este método incluyen a todos los polímeros mencionados en la polimerización sin compresiones mencionadas anteriormente, por ejemplo, los péptidos, las amidas, los ésteres, los carbamatos, las oximas, los fosfodiésteres, las aminas secundarias, los éteres, etcétera.

[0223] Las figuras 23 a la 25 relatan como puede evitarse una formación de aglutinamientos por medio de limitaciones covalentes.

[0224] Una situación especial surge al utilizar a entidades funcionales (FE - functional entities) que son bifuncionales debido a una rotación libre potencial en torno al enlace enlazador-nucleótido. Una FE bifuncional tiene 2 grupos reactivos diferentes 'X' y 'Y', por ejemplo, un nucleófilo y un electrófilo, donde 'X' en una FE tiene el propósito de reaccionar con 'Y' en la FE cercana ya sea directamente o a través de un agente reticular. Si todas las unidades enlazador-FE se orientan idénticamente en relación al nucleótido padre, la polimerización direccional ocurrirá y se formará un producto completo de unas 5 unidades ('la parte superior de la figura 13'). Sin embargo, la rotación alrededor del enlazador-enlace de algunas, pero no todas, las entidades enlazador-FE para que la orientación relativa de las 2 funcionalidades reverse el proceso hacia una situación de aglutinamientos, donde los grupos reactivos están organizados para que la reacción pueda ocurrir en 2 direcciones diferentes ('la parte inferior de la figura 13'). Esta situación no favorable puede ser evitada al usar entidades funcionales fijas, por lo tanto, previniendo la rotación en torno al enlace nucleótido-enlazador. Fijar a las FEs podría lograrse al adherir al FE por medio de 2 enlaces covalentes en vez de uno (es decir, 2 enlazadores) al nucleótido. El enlace adicional podría formarse directamente por una de las funcionalidades, o los 2 grupos reactivos podrían adherirse a 'brazos' separados en una estructura fija. En la primera situación, el enlace adicional podría ser descompuesto durante la reacción, mientras que el enlace adicional en la 2ª opción debería ser construida para que este enlace también se separe después de la reacción, para liberar al producto final.

Los puntos primarios de adherencia de las unidades enlazador-FE están comúnmente dentro de las bases de los nucleótidos, preferiblemente en la posición C5 en T/U y C o la posición C7 en deaza A y deaza G. Para construir una inhibición eficiente de la rotación enlazador-enlace, el 2º enlace deberá ser, preferiblemente, algo distante de su punto de adherencia. Es decir, la 2ª adherencia podría ser en cualquier lugar en un nucleótido cercano, preferiblemente en la base o en la parte del azúcar. Podría ser un 2º átomo en la misma base, preferiblemente en la posición C6 en T/U y C o la posición C8 o N6 en (deaza) A o (deaza) G. O podría ser un átomo de la partícula de azúcar, preferiblemente en la posición C2 o C3. Ejemplos explícitos son dados en la figura 23.

[0225] Debe tomarse en cuenta que los nucleótidos que portan algunos de estos enlazadores doblemente adheridos podrían ser necesarios para incorporarse por otros medios que usando una polimerasa. Una alternativa a la incorporación de polimerasa es el método de imidazol descrito en otras secciones de este documento.

[0226] Para mostrar el efecto de restringir covalentemente a la FE para asegurar una polimerización direccional una serie de cómputos informáticos han sido realizados en 2 ejemplos mostrados en la figura 23A y 23B. El propósito es analizar a varios modelos de ataque para cada estructura enlazador-FE, estimando la reacción más probable y, por

lo tanto, el producto más probable. Por lo tanto, se necesita estimar el espacio de conformación cubierto por la unidad enlazador-FE y las zonas ocupadas por los grupos reactivos.

[0227] El espacio de conformación de un sistema específico enlazador-FE, es decir, el rango del FE, puede estimarse al hacer una búsqueda de conformaciones. Las búsquedas de conformaciones pueden realizarse utilizando varios softwares diferentes y dentro de estos programas utilizando diferentes métodos de búsqueda los cuales son un conocimiento estándar dentro del campo. Para sistemas del tamaño mencionado en este texto no es posible realizar una búsqueda convergente de conformaciones, es decir, para asegurar que pasos suficientes han sido tomados para que toda la superficie de la energía potencial haya sido cubierta, y, por lo tanto, que la conformación de energía mínima ubicada sea realmente el mínimo global para la molécula. Sin embargo, el propósito de estos cálculos es obtener una imagen del espacio permitido que va a ser cubierto por la unidad enlazador-FE y, por lo tanto, estimar el método más factible de ataque entre 2 FEs y la posibilidad de que los grupos reactivos entren en una distancia de reacción. Los métodos eficientes de búsqueda de conformaciones utilizan un número limitado de pasos para cumplir este propósito.

[0228] El término conformaciones en este documento significa orientaciones estructurales individuales que difieren por una simple rotación en torno a enlaces individuales. Conformaciones diferentes podrían, adicionalmente, dar lugar a diferentes configuraciones generales, es decir, una organización general de 2 grupos reactivos de nucleótidos completamente modificados que dan lugar a una dirección específica en una reacción. Es decir, 4 unidades enlazador-FE con todos los 'X' en la misma dirección corresponden a una configuración específica, y 4 unidades enlazador-FE organizadas, por ejemplo, con 2 'X' apuntando en una dirección y las otras 2 en la dirección opuesta corresponde a otra configuración específica. Dentro de una configuración, muchas conformaciones diferentes son posibles, pero todas estas resultan en el mismo producto 'más probable' puesto que se preserva la orientación general (dirección) de los grupos reactivos.

[0229] Los cálculos realizados en esta investigación han sido realizados utilizando el software MacroModel7.2 de Schrödinger Inc (MMOD72). Dentro de este paquete informático una serie de diferentes protocolos de búsqueda está disponibles, incluyendo el método 'la modalidad mínima / baja múltiple mixta de Montecarlo' (MCMMLM - Mixed Monte Carlo Multiple Minimum/Low Mode), que demostró ser muy efectivo para ubicar la energía mínima para sistemas grandes y complicados.

#### Detalles computacionales

[0230] ADN de doble hebra con la secuencia base 5'-GCTTTTTTAG-3' (hebra superior) (ejemplo mostrado en la figura 24) o 5'-GCTTTTAG-3' (hebra superior) (ejemplo mostrado en la figura 25) fue construido utilizando HyperChem7 de HyperCube Inc en la conformación B más frecuente. Las unidades enlazador-FE fueron construidas utilizando a ChemDraw Ultra 6.0 y Chem3D Ultra 6.0 de ChemOffice. Las unidades enlazador-FE y el ADN fueron importados a MMOD72. Los enlazadores fueron fusionados entonces a los nucleótidos correspondientes utilizando la característica de construcción en MMOD72, fusionando al átomo carbono de metilo de los nucleótidos T con el átomo enlazador apropiado, creando, en efecto, un nucleótido U modificado. En todos los cálculos, todos los átomos de ADN fueron mantenidos congelados, es decir, no se les permitió moverse, para reducir el tamaño de los sistemas y evitar distorsiones dentro de la hebra de ADN. El sistema total fue minimizado en lo que se refiere a energía (manteniendo a los átomos de ADN congelados) utilizando el campo de fuerza OPLS\_AA suplementado en MMOD72. Fue necesario restringir el ángulo de diedro que conecta al nucleótido y al enlazador, es decir, el diedro de N1, C6, C5 y el primer átomo enlazador fue colocado a 180.0 grados y se aplicó una fuerza constante entre 100 y 1000. Sin la restricción ninguno de los campos de fuerza de MMOD72 se preservó el plano, posiblemente debido a una constante de fuerza muy débil fuera del plano para este diedro en específico.

[0231] Análisis de conformaciones fueron realizados utilizando el método MCMMLM, ejecutando 2000 pasos con un corte de energía de 50 kJ/mol, y con una distancia mínima y máxima viajada por el átomo que se movía más rápido de 3 y 8 Å, respectivamente. Dependiendo del tamaño específico del sistema, a 11-19 torsiones se les permitió variar, y finalmente cada conformador fue minimizado por 500-1000 pasos gradiente de conjugaciones PR (esto resultó en que la mayoría de conformadores fueron minimizados para que quepan dentro de un límite de convergencia de 0.05 kJ/mol). La quiralidad de los átomos quirales fue preservada durante los cálculos. Adicionalmente, para los sistemas con enlazadores restringidos covalentemente, un enlace de cierre anular (ya sea el enlace de amida o el enlace base-S formado) fue escogido dentro de cada anillo.

#### Resultados

[0232] Una forma de crear un 2º punto de adherencia es el enlazar una de las entidades funcionales por medio de un enlace que puede romperse con el nucleótido cercano. En efecto, esto significa que se utilizaron dinucleótidos en vez de mononucleótidos y además la longitud del FE fue incrementada. Utilizando este método, un grupo de puntos válidos de adherencia existe; la figura 23A es un ejemplo de adherencia a la misma posición de la base cercana. El enlazador 1A es construido de un β-dipéptido, con el extremo amino conectado a la base 5' por medio de un enlace de disulfuro que tiende a una separación reductiva y el extremo carboxi ligado directamente a la base 3'. Cuando la reacción ocurre, el grupo amino de una unidad dinucleótido-enlazador-FE romperá al enlace del éster del

dinucleótido-enlazador-FE anterior. Utilizando la misma unidad enlazador-FE sin el 2º punto de adherencia corresponde a utilizar dipéptidos en mononucleótidos espaciados de un nucleótido. Un enlazador-FE como ese porta 2 grupos reactivos en brazos separados y tiene una rotación libre en torno al enlace nucleótido-enlazador y es, por lo tanto, un ejemplo de un enlazador-FE disfuncional que porta el riesgo de la formación de ordenamientos en el caso de que no haya una polimerización direccional. Ejecutar 2000 pasos de búsqueda de conformaciones del enlazador adherido individualmente resulta en 490 conformaciones únicas (849 conformaciones después de 500 pasos de minimización, 490 después de 500 pasos adicionales) con el mínimo 'global' ubicado una vez. La conformación con más baja energía que resulta en un producto completo tiene un rango 8 y se muestra en la figura 24A y resulta ser el producto más probable (todavía adherido a la estructura de ADN) en la figura 24B. Tal como puede observarse, los grupos reactivos se organizan con todos los grupos aminos hacia arriba y todos los grupos carboxi hacia abajo, y las 2 reacciones que son requeridas para generar un producto completo son hacia adelante. El producto completo liberado se muestra en la figura 24 H. Sin embargo, de lejos, la mayoría de conformaciones, incluyendo el mínimo 'global', no tienen esta configuración general. La figura 24C muestra la conformación del 2º rango más alto y el producto más probable mostrado en la figura 24D. Tal como puede observarse, esta organización de los grupos reactivos resulta en la formación de un producto incompleto. Las 2 unidades enlazador-FE en el extremo 3' han formado un enlace de amida, pero la unidad enlazador-FE de 5' tiene la orientación opuesta general resultando en 2 grupos carboxi (uno de la unidad enlazador-FE de 5' y otro de las unidades fusionadas enlazador-FE de 3') siendo los 2 grupos reactivos cercanos y por lo tanto ninguna reacción es posible. La liberación de este producto, por lo tanto, resulta en un dímero (y un monómero); el dímero es mostrado en la figura 22. De las 364 conformaciones únicas dentro de 10 kJ/mol del mínimo ubicado, aproximadamente 330 resultan en la formación de varios productos incompletos.

**[0233]** Ejecutando 2000 pasos de búsqueda de conformaciones del enlazador doblemente adherido, resulta en 125 conformaciones únicas con el mínimo 'global' ubicado 9 veces. Esta conformación de energía mínima se muestra en la figura 24E, donde todas las FEs han sido observadas que se organizan con los grupos aminos apuntando hacia abajo y los grupos carboxi apuntando hacia arriba. Claramente, esta configuración general es la única posible para el enlazador doblemente adherido, dando lugar a solamente un producto probable mostrado en la figura 24F (todavía adherido a la estructura del ADN). La liberación de este producto genera al producto completo de 3 unidades, figura 24G.

**[0234]** Por lo tanto, este ejemplo muestra primeramente que la rotación alrededor de los enlaces nucleótido-enlazador resulta en (muchas) configuraciones que no son capaces de formar productos completos. Sin embargo, otro asunto importante es la diferencia en los productos completos formados. Las FEs utilizadas en este ejemplo son construidas de  $\beta$ -aminoácidos no sustituidos y, por lo tanto, no existe una diferencia entre los productos completos mostrados en la figura 24G y H. Sin embargo, al utilizar a las FEs adheridas individualmente la polaridad de los productos formados puede cambiar (es decir, el grupo amino libre de la FE adherida a 3' o el grupo amino libre de la FE adherida a 5') y, por lo tanto, se pueden formar productos potencialmente muy diferentes. Al utilizar a entidades funcionales fijas, únicamente una configuración general es posible y únicamente un producto con una polaridad específica puede formarse.

**[0235]** Otra posibilidad de un punto de adherencia es el azúcar del nucleótido padre, tal como se utiliza de ejemplo en la figura 23B, C y D. Esta opción permite la utilización de mononucleótidos en vez de dinucleótidos enlazados tal como se mencionó anteriormente. Ambos hidrógenos del C2 pueden ser reemplazados por átomos enlazadores, sin embargo, para estructuras anulares más cortas es preferido el uso de aquel que mira de frente al mismo plano que la base. El carbono 3 de la partícula de azúcar forma un enlace con el grupo fosfato, pero todavía queda una posibilidad de adherencia que puede ser utilizada para propósitos de fijación del enlazador. El mismo mantiene a C1, sin embargo, el espacio alrededor de esta sustitución posiblemente es limitado. Los átomos carbonos 4 y 5 de la partícula azúcar son muy distantes del punto de adherencia de la base y, por lo tanto, requieren sistemas anulares grandes para ser utilizados para este propósito.

El enlazador-FE 1 B es construido de un  $\gamma$ - aminoácido adherido por medio de un enlace de disulfuro propenso para una separación reductiva a la posición de C5 de T/U. La unidad enlazador-FE 1 B es, por lo tanto, otro ejemplo típico de un sistema enlazador-FE bifuncional capaz de rotación del enlace nucleótido-enlazador que porta el riesgo de la formación acumulaciones debido a la falta de polimerización direccional. Una fijación de esta FE se muestra en el ejemplo 1 B (a la derecha) y utiliza la posición de C2 en el mismo lado del plano que la base. La FE ahora restringe a un  $\gamma$ - aminoácido enlazado a través del grupo carboxilo al azúcar por medio de un enlace de éster hidrolizable y en el extremo amino a la posición C5 de T/U por medio de un enlace de disulfuro propenso a oxidación. La unidad 1B enlazador-FE doblemente adherida es, por lo tanto, un enlazador-FE bifuncional con un grupo reactivo libre y el otro suministrando la 2ª adherencia. Utilizando casi la misma unidad enlazador-FE pero dejando al extremo carboxilo libre al introducir un 2º grupo de ésteres en calidad de un enlazador hidrolizable tal como se muestra en el ejemplo 1C. Análisis informáticos de los enlazadores-Fes 1B y 1C resultan en condiciones similares, y los resultados a continuación se refieren al enlazador 1B.

**[0236]** Búsquedas de conformaciones de los 2 esquemas diferentes revelan claramente el efecto de prevenir la rotación del enlace vinculator por medio de una adherencia covalente adicional.

El ejecutar 2000 pasos de búsqueda de conformaciones del enlazador-FE adherido individualmente resulta en 445 conformaciones únicas con el mínimo 'global' ubicado una vez. Esta conformación se muestra en la figura 25A y el

producto resultante más probable (todavía adherido a la estructura de ADN) en la figura 25B. Tal como puede observarse, este es el producto completo, es decir, todas las 4 unidades están enlazadas entre sí por medio de enlaces de amidas. El producto completo liberado se muestra en la figura 25G. Sin embargo, muchas otras configuraciones generales son posibles para este sistema, con un ejemplo que se muestra en la figura 25C. El producto más probable que resulta de la configuración 3C se muestra en la figura 25D y, como puede observarse, esta configuración de grupos reactivos resulta en la formación de un producto incompleto, es decir, las unidades enlazador- FE son enlazadas 2 y 2 entre sí sin posibilidades de una reacción de fusión. La liberación de este producto resulta en 2 dímeros, mostrados en la figura 25 H. De las 334 formaciones únicas dentro de 10 kJ/mol del mínimo ubicado, aproximadamente 215 resultaron en la formación de varios productos incompletos.

**[0237]** Al ejecutar 2000 pasos de búsqueda de conformaciones del FE adherido doblemente resultó en 386 conformaciones únicas con el mínimo 'global' ubicado 2 veces. Esta conformación se muestra en la figura 25E y el producto resultante más probable (todavía adherido a la estructura de ADN) en la figura 25 F. Sin embargo, puesto que no hay posibilidades de un intercambio de grupos reactivos, las conformaciones se diferencian únicamente por variaciones menores en los diedros (por ejemplo, la rotación del grupo CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>). Claramente, sólo una configuración general es posible para la FE adherida doblemente, dando lugar a sólo un producto probable, el producto completo de 4 unidades (figura 25 G).

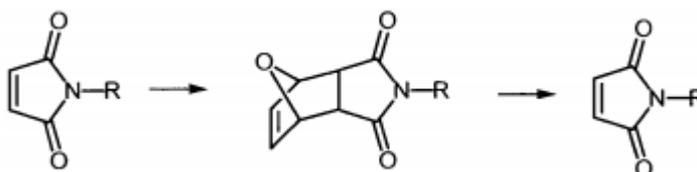
**[0238]** Por lo tanto, las investigaciones computacionales muestran claramente que existe una rotación extensiva en torno a los enlaces nucleótido-enlazador y que esta flexibilidad resultará en una proporción significativa de los productos formados que no son completos. Los cálculos también muestran que el utilizar entidades funcionales covalentemente fijas es una forma de prevenir la rotación del enlazador, y, por lo tanto, una polimerización unidireccional efectivamente segura. Adicionalmente, los productos completos resultan de utilizar FEs no restringidos de un grupo diverso, puesto que existe más de una posibilidad de configuración de los grupos reactivos en una forma que permita reacciones entre todas las unidades. Naturalmente, estas tendencias serán aún más pronunciadas utilizando más de 3 a 4 unidades enlazador-FE tal como fue aplicado en estos ejemplos.

#### Bloques de construcción capaces de transferir a entidades funcionales.

**[0239]** La siguiente sección describe la formación y el uso de bloques monoméricos de construcción capaces de transferir a una entidad funcional desde un bloque monomérico de construcción a otro bloque monomérico de construcción, es decir, 2 entidades funcionales de los bloques monoméricos de construcción reaccionan, de tal forma que una entidad funcional es separada de su bloque monomérico de construcción bajo las condiciones aplicadas.

#### Sección general

**[0240]** Protección y desprotección de derivados de maleimida:

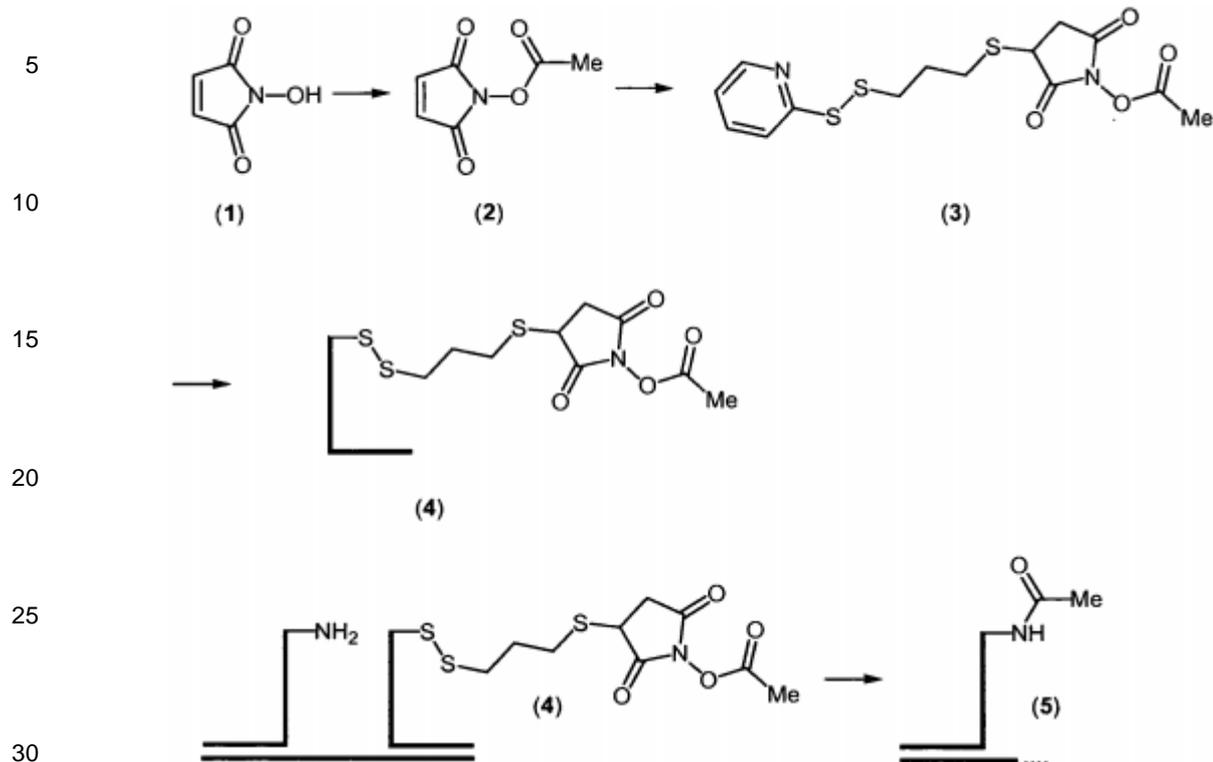


**[0241]** Los derivados de maleimidias (por ejemplo, R = H, alquilos, arilos, alcoxis, etc.) podrían, en cualquier paso que se muestra a continuación, estar presentes en una forma protegida. La protección se logra por medio de la reacción con furano. La desprotección puede lograrse por medio de termólisis, tal como fue descrito por Masayasu et al., J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 (1980) 2122.

#### A. Reacciones de acilación

*Ruta general para la formación de bloques monoméricos de construcción acilantes y sus usos:*

**[0242]**



Plantilla

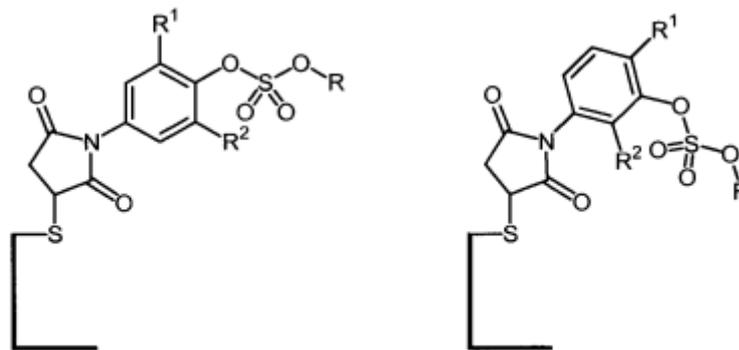
**[0243]** La *N*-hidroximaleimida **(1)** podría ser acilada mediante el uso de un acilcloruro, por ejemplo, un acetil-cloruro o alternamente acilada en, por ejemplo, THF mediante el uso de una diciclohexilcarbodiimida o una diisopropilcarbodiimida y un ácido, por ejemplo, ácido acético. El intermediador puede ser sujeto a una adición de Michael mediante el uso en exceso de 1,3-propaneditiol, seguido por una reacción con disulfuro de 4,4'-dipiridilo o disulfuro de 2,2'-dipiridilo. Este intermediador **(3)** puede ser cargado entonces a un oligonucleótido que porta un elemento tiol para generar al bloque monomérico de construcción **(4)**. La reacción de este bloque monomérico de construcción con una amina que porta a un bloque monomérico de construcción se realiza de la siguiente forma:

El oligonucleótido plantilla (1 nmol) es mezclado con un oligonucleótido tio cargado con un bloque de construcción, por ejemplo, **(4)** (1 nmol) y un amino-oligonucleótido (1 nmol) en un amortiguador hepes (20  $\mu$ l de 100 mM de hepes y 1 M de solución de NaCl, pH = 7.5) y agua (39  $\mu$ l). Los oligonucleótidos son recosidos a la plantilla al calentarse a 50 °C y enfriarse (2 °C/2<sup>o</sup>) a 30 °C. La mezcla se deja reposar o/n a una temperatura fluctuante (10 °C durante un segundo y entonces 35 °C durante un segundo), para generar al enlace de la plantilla **(5)**.

B. Reacciones de alquilación C. Reacciones vinilación

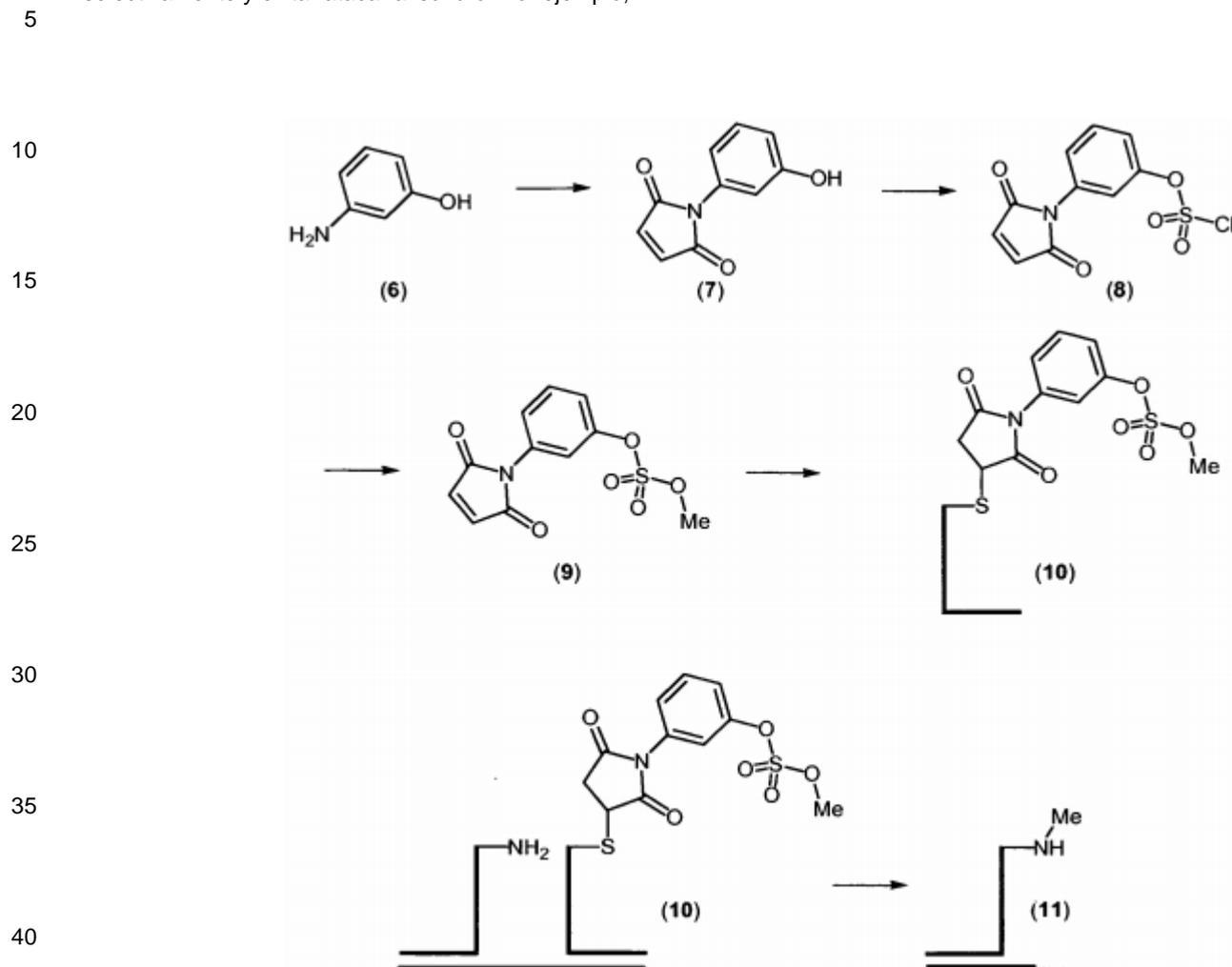
*Ruta general para la formación de bloques monoméricos de construcción alquilantes/vinilantes y sus usos:*

**[0244]** Los bloques de construcción monoméricos alquilantes podrían tener la siguiente estructura general:



R<sup>1</sup> = H, Me, Et, iPr, Cl, NO<sub>2</sub>  
 R<sup>2</sup> = H, Me, Et, iPr, Cl, NO<sub>2</sub>

[0245] R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> podrían ser utilizados para afinar la reactividad del sulfato para permitir una reactividad apropiada. Una sustitución de cloro y nitro incrementará la reactividad. Los grupos alquilo reducirán la reactividad. Los sustituyentes orto al sulfato, debido a razones estéricas, dirigirán a nucleófilos entrantes para atacar al grupo R selectivamente y evitar atacar al sulfuro. Por ejemplo,



45 [0246] El 3-Aminofenol (6) es tratado con un anhídrido maléico, seguido de un tratamiento con un ácido, por ejemplo, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y calentado para generar una maleimida (7). El cierre anular de la maleimida también podría lograrse cuando un grupo ácido estable de protección de O es utilizado por medio de un tratamiento con Ac<sub>2</sub>O con o sin un calentamiento, seguido por una desprotección de O. Alternativamente, un reflujo en Ac<sub>2</sub>O, seguido por una desacetilación de O en agua/dióxido de carbono caliente para generar a (7). Tratamientos adicionales de (7) con SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> con o sin trietilamina o carbonato de potasio en diclorometano o un solvente de ebullición más alta generará al intermedio (8), que podría ser aislado o transformado directamente a un sulfato de alquilo de arilo por medio de una neutralización con el alcohol apropiado, en este caso MeOH, donde (9) será formado. El bloque orgánico de construcción (9) podría ser conectado con un oligonucleótido de la siguiente forma.

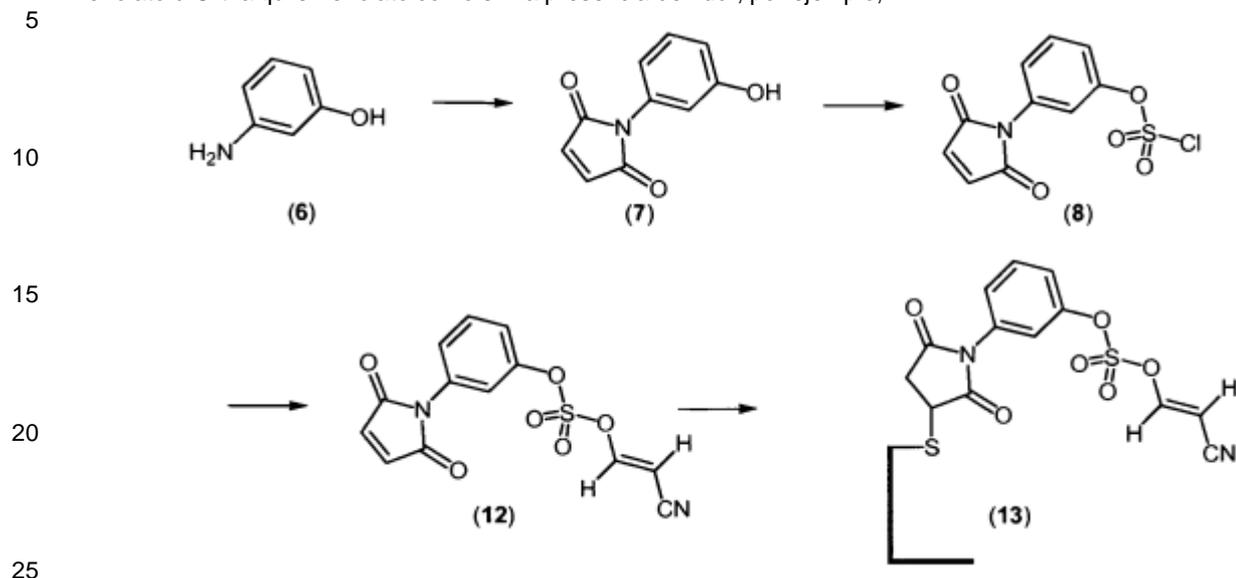
50

55 [0247] El oligonucleótido que tiene a un tiol en un amortiguador de 50 mM de MOPS o hepes o fosfato pH 7.5 es tratado con 1-100 mM de solución y preferiblemente 7.5 mM de solución del bloque orgánico de construcción (9) en DMSO o alternamente DMF, para que la concentración DMSO/DMF sea del 5-50%, y preferiblemente 10%. A la mezcla se la deja reposar durante 1-16 horas y preferiblemente 2-4 horas a 25 °C. Para generar el alquilante, en este caso el bloque monomérico de construcción metilante (10).

60 [0248] La reacción del bloque monomérico de construcción alquilante (10) con un bloque monomérico de construcción que porta una amina podría ser conducida de la siguiente forma:  
El oligonucleótido plantilla (1 nmol) es mezclado con un oligonucleótido tio cargado con un bloque de construcción (1 nmol) (10) y un amino-oligonucleótido (1 nmol) en un amortiguador hepes (20 µl de 100 mM de hepes y 1 M de solución de NaCl, pH = 7.5) y agua (39 µl). Los oligonucleótidos son recosidos a la plantilla al calentarlos a 50 °C y enfriarlos (2 °C/2<sup>o</sup>) a 30 °C. A la mezcla se le deja que repose o/n a una temperatura fluctuante (10 °C durante un segundo y entonces 35 °C durante un segundo), para generar a la metilamina enlazada a la plantilla (11).

65

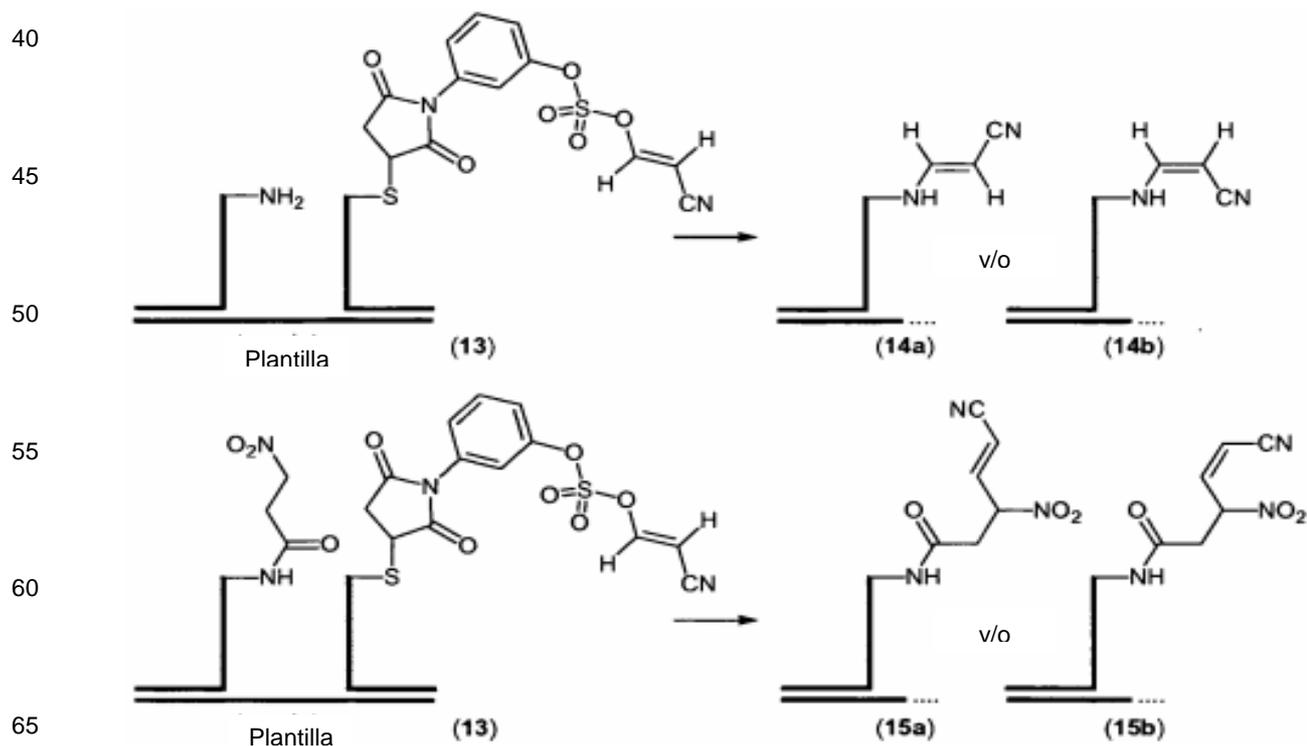
**[0249]** Un bloque monomérico de construcción vinilante puede ser preparado y utilizado en forma similar a como se describió anteriormente para un bloque monomérico de construcción alquilante. Aunque en vez de reaccionar al clorosulfonato (8 mencionado anteriormente) con un alcohol, el clorosulfato intermedio es aislado y tratado con un enolato u O-trialquilililenoato con o sin la presencia de flúor, por ejemplo,



Formación del bloque monomérico de construcción vinilante (13):

**[0250]** El oligonucleótido que porta un tiol en un amortiguador de 50 mM de MOPS o hepes o fosfato pH 7.5 es tratado con 1-100 mM de solución y preferiblemente 7.5 mM de solución del bloque orgánico de construcción (12) en DMSO o alternamente DMF, para que la concentración DMSO/DMF sea 5-50%, y preferiblemente 10%. A la mezcla se le deja que repose durante 1-16 horas y preferiblemente 2-4 horas a 25 °C para generar al bloque monomérico de construcción vinilante (13).

**[0251]** El sulfonilenoato (13) podría ser utilizado para reaccionar con un bloque monomérico de construcción que porta una amina para dar una enamina (14a y/o 14b) o, por ejemplo, reaccionar con un carbanión para generar a (15a y/o 15b). Por ejemplo,



**[0252]** La reacción del bloque monomérico de construcción vinilante (13) y un bloque monomérico de construcción que porta a una amina o nitroalquilo puede realizarse de la siguiente forma:

El oligonucleótido plantilla (1 nmol) es mezclado con un oligonucleótido tio cargado con un bloque de construcción (1 nmol) **(13)** y un amino-oligonucleótido (1 nmol) o un nitroalquil-oligonucleótido (1 nmol) en 0.1 M de TAPS, un amortiguador de fosfato o de hepes y 300 mM de solución de NaCl, pH 7.5-8.5 y preferiblemente un pH = 8.5. Los oligonucleótidos son recosidos a la plantilla al calentarse a 50 °C y enfriarse (2 °C/2°) a 30 °C. A la mezcla se le deja que repose a una temperatura fluctuante (10 °C durante un segundo y 35 °C durante un segundo), para generar el enlace de la plantilla **(14a/b o 15a/b)**. En forma alterna a los sulfatos de alquilo y de vinilo descritos anteriormente, podrían ser igualmente efectivos los sulfonatos tal como, por ejemplo, (31) (sin embargo, con R" en forma de un alquilo o un vinilo), como es descrito más adelante, ser preparado de (28, con el grupo fenilo sustituido por un grupo alquilo) y (29), y ser utilizados como agentes alquilantes o vinilates.

#### D. Reacciones de Alquenilación

15 *Ruta general para la formación de bloques monoméricos de construcción de Wittig y HWE y sus usos:*

**[0253]** Bloques de construcción comercialmente disponibles (16) pueden ser transformados a un éster de NHS (17) por medios estándar, es decir, acoplamiento de DCC o DIC.

20 **[0254]** Un oligonucleótido que porta a una amina en un amortiguador de 50 mM de MOPS o hepes o un fosfato pH 7.5 es tratado con 1-100 mM y preferiblemente una solución de 7.5 mM del bloque orgánico de construcción en DMSO o alternamente DMF, para que la concentración esté entre el 5-50%, y preferiblemente el 10%. A la mezcla se le deja reposar durante 1-16 horas y preferiblemente 2-4 horas a 25 °C. Para generar un bloque monomérico de construcción (18) enlazado a fosfina DMSO/DMF. La concentración es del 5-50%, y preferiblemente el 10%. A la mezcla se le deja que repose durante 1-6 horas y preferiblemente 2-4 horas a 25 °C. Para dar un bloque monomérico de construcción enlazado a la fosfina (18). Este bloque monomérico de construcción es transformado aún más por medio de la adición de un alquilhaluro apropiado, por ejemplo, *N,N*-dimetil-2-yodoacetamida en forma de 1-100 mM y preferiblemente 7.5 mM de una solución en DMSO o DMF tal como las concentraciones de DMSO/DMF del 5-50%, y preferiblemente el 10%. A la mezcla se le deja para que repose durante 1-16 horas y preferiblemente 2-4 horas a 25 °C para dar al bloque monomérico de construcción (19). Alternamente a esto, el bloque orgánico de construcción (17) puede ser P-alquilado con un alquilhaluro y luego ser acoplado a un oligonucleótido que porte una amina para generar a (19).

35 **[0255]** Un bloque monomérico de construcción enlazado a un aldehído (20), por ejemplo, formado por la reacción entre el éster de NHS de ácido 4-formilbenzoico y un oligonucleótido que porta una amina, utilizando condiciones similares a aquellas descritas anteriormente, reaccionará con (19) bajo condiciones ligeramente alcalinas para generar al alqueno (21).

40

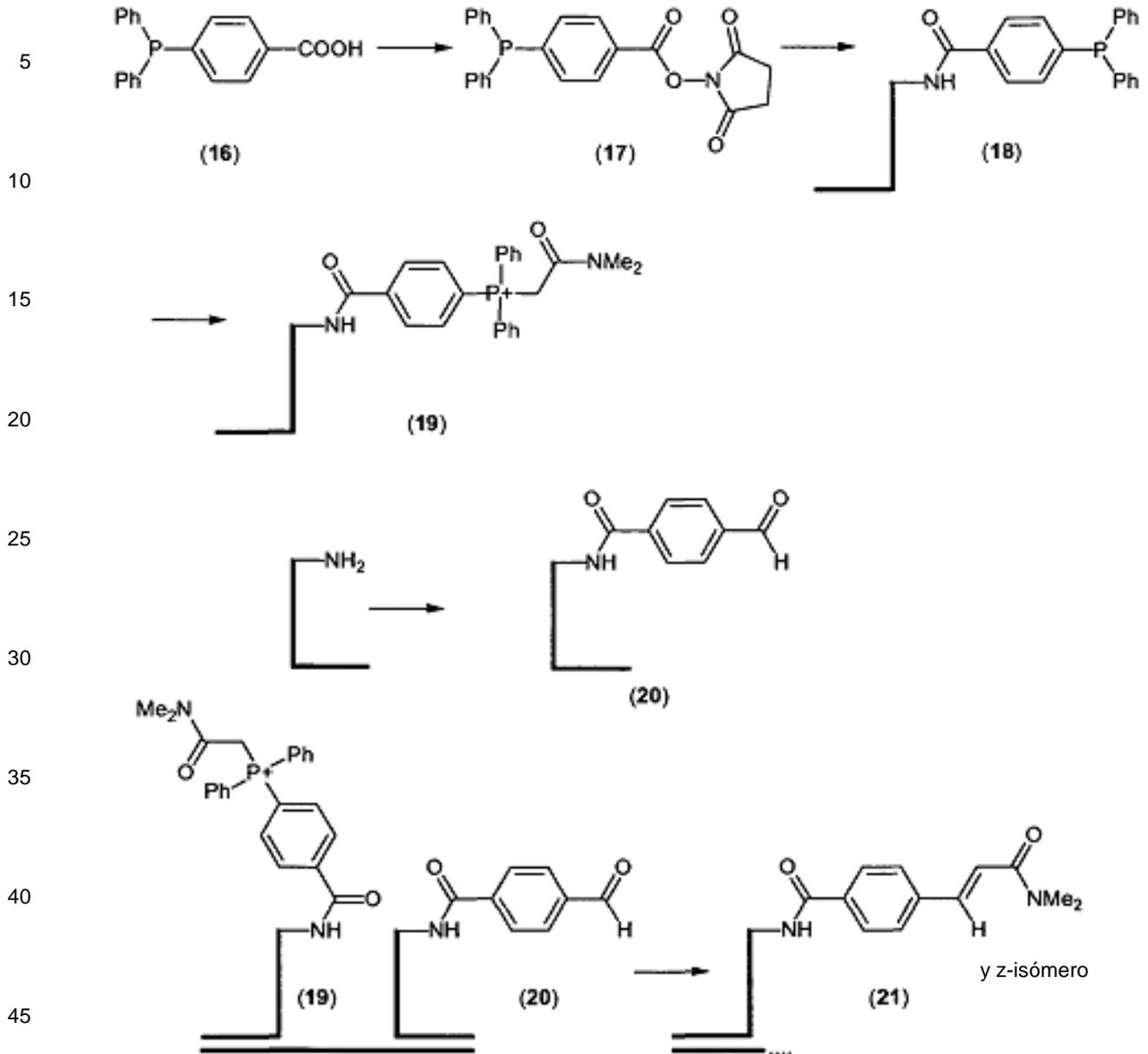
45

50

55

60

65

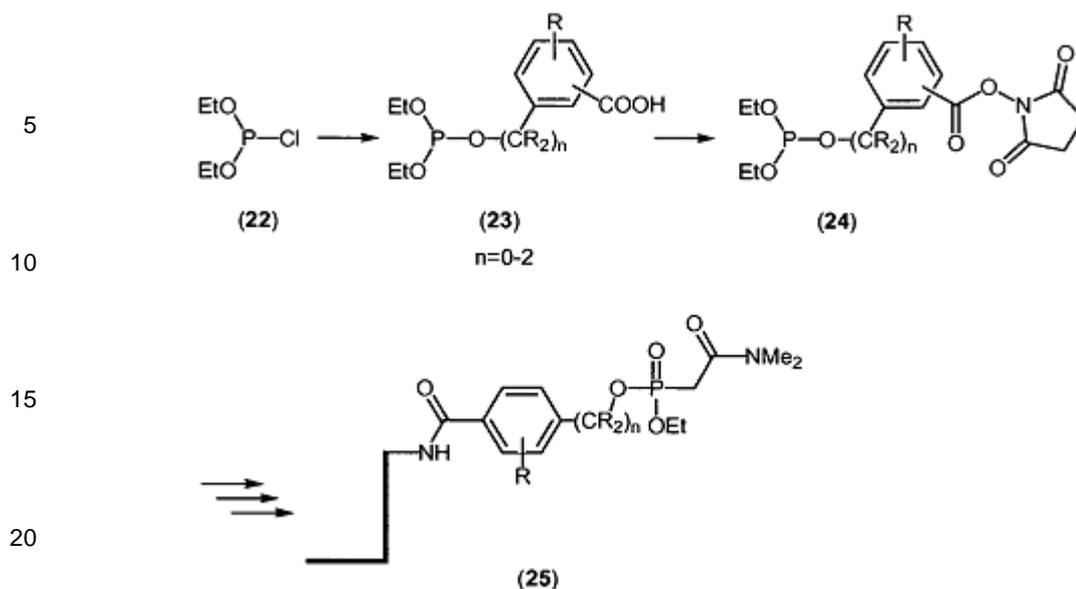


50 **[0256]** La reacción de los bloques monoméricos de construcción (19) y (20) podría ser conducida de la siguiente manera:

El oligonucleótido plantilla (1 nmol) es mezclado con el bloque monomérico de construcción (19) (1 nmol) y (20) (1 nmol) en 0.1 M de TAPS, amortiguador de fosfato o hepes y 1 M de solución de NaCl, pH = 7.5-8.5 y preferiblemente pH = 8.0. La mezcla de la reacción se deja a que repose a 35-65 °C preferiblemente a 58 °C durante la noche para generar un enlace plantilla (21).

55 Como una alternativa a (17) se pueden usar en vez de eso a fosfonatos (22). Pueden ser preparados por la reacción entre dietilclorofosfito (22) y el alcohol apropiado que porta a un carboxi. El ácido carboxílico es transformado entonces en un éster de NHS (24) y el proceso y alternativas descritas anteriormente pueden aplicarse. Aunque en vez de una P- alquilación simple, el fosfito experimentará una reacción de Arbuzov y generará al fosfonato. El bloque monomérico de construcción (25) se beneficia del hecho que es más reactivo que su contraparte de fosfonio (19).

60



#### E. Reacciones de arilación, hetarilación y vinilación catalizadas por metales de transición

25

30

[0257] Bloques monomérico de construcción electrofílicos (31) capaces de transferir una funcionalidad de arilo, de hetarilo o de vinilo podrían prepararse a partir de los bloques orgánicos de construcción (28) y (29) mediante el uso de procedimientos de acoplamiento para derivados de maleimida a oligonucleótidos que portan a SH descritos anteriormente. Alternamente a la maleimida, derivados de NHS-éster podrían prepararse de, por ejemplo, derivados del ácido carboxibencensulfónico, por medio de acoplamiento de estos a oligonucleótidos que portan aminas. El grupo R de (28) y (29) es utilizado para afinar la reactividad del sulfonato para generar la reactividad apropiada.

35

[0258] El acoplamiento reticular catalizado por metales de transición es realizado de la siguiente forma: Una pre - mezcla de 1.4 mM de  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  y 2.8 mM de  $\text{P}(\text{p-SO}_3\text{C}_6\text{H}_4)_3$  en agua que se dejó a reposar durante 15 minutos se agregó a una mezcla del oligonucleótido plantilla (1 nmol) y los bloques monoméricos de construcción (30) y (31) (ambos 1 nmol) en 0.5 M de amortiguador de NaOAc con un pH = 5 y 75 mM de NaCl (final  $[\text{Pd}] = 0.3$  mM). A la mezcla se le dejó a reposar o/n a 35-65 °C preferiblemente a 58 °C, para generar el enlace plantilla (32).

40

45

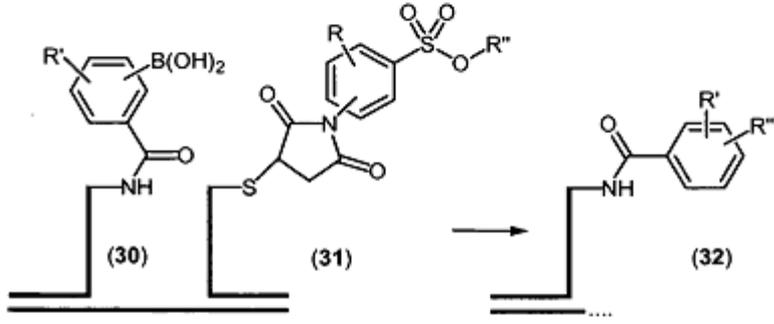
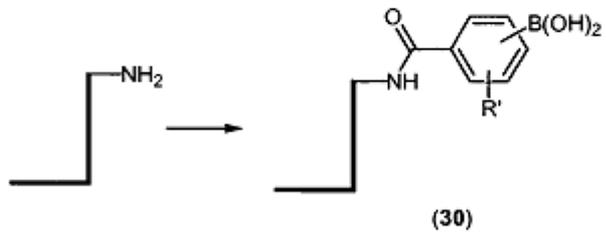
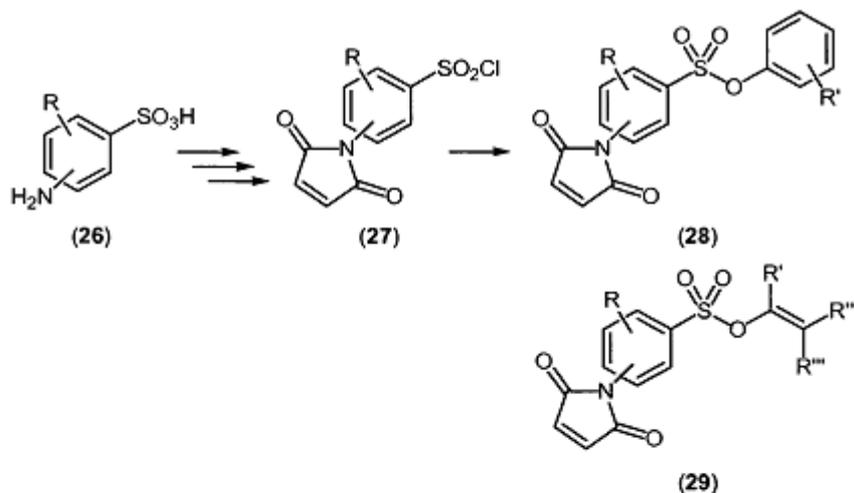
50

55

60

65

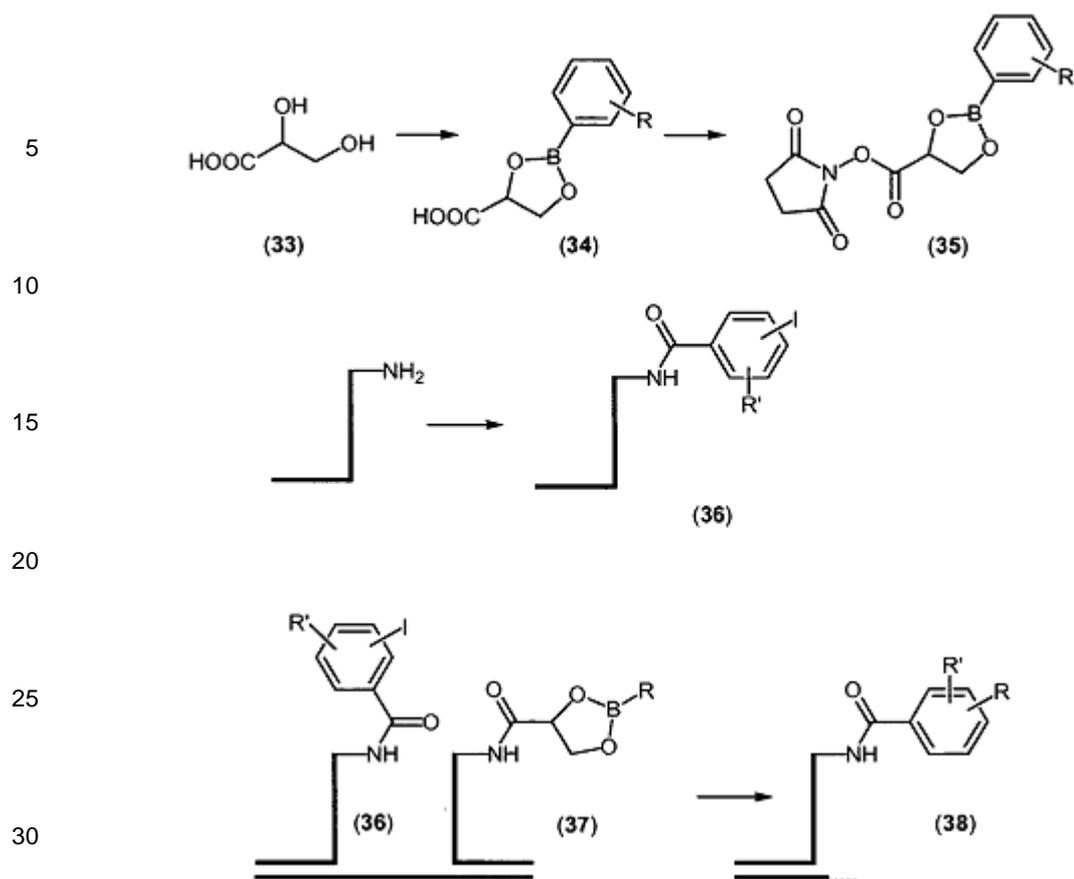
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65



Plantilla  
R'' = arilo, hetarilo o vinilo

**[0259]** Bloques monoméricos de construcción nucleofílicos correspondientes capaces de transferir una funcionalidad de arilo, hetarilo, o vinilo pueden ser preparados a partir de bloques orgánicos de construcción tipo (35). Esto es disponible por medio de una esterificación de un ácido borbónico por un diol, por ejemplo, (33), seguido de una transformación al derivado de NHS-éster. El derivado de NHS-éster podría entonces ser acoplado a un oligonucleótido, por medio de procedimientos de acoplamiento para derivados de NHS-ésteres a oligonucleótidos que portan aminas tal como fue descrito anteriormente, para generar el bloque monomérico de construcción tipo (37). Alternamente, derivados de maleimidias pueden prepararse tal como se describió anteriormente y cargarse en oligonucleótidos que portan a SH.

**[0260]** El acoplamiento transversal catalizado por metales de transición es conducido de la siguiente forma: Una pre - mezcla de 1.4 mM de Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> y 2.8 mM de P(p-SO<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)<sub>3</sub> en agua que fue dejada a reposar durante 15 minutos se agregó a una mezcla del oligonucleótido plantilla (1 nmol) y los bloques monomérico de construcción (36) y (37) (ambos 1 nmol) en 0.5 M de amortiguador de NaOAc con un pH = 5 y 75 mM de NaCl (final [Pd]=0.3 mM). A la mezcla se dejó que repose o/n a 35-65 °C, preferiblemente a 58 °C, para generar al enlace plantilla (38).



Plantilla

R = arilo, hetarilo o vinilo

F. Reacciones de bloques monoméricos de construcción de enamina y enoléter

40 **[0261]** Bloques monoméricos de construcción cargados con enaminas y enoléteres pueden ser preparados de la siguiente forma:

Para Z=NHR (R=H, alquilo, arilo, hetarilo), una 2-mercaptoetilamina podría reaccionar con un disulfuro de dipiridilo para generar al disulfuro activado (40), el cual puede ser condensado entonces a una cetona o a un aldehído bajo condiciones de deshidratación para generar a la enamina (41).

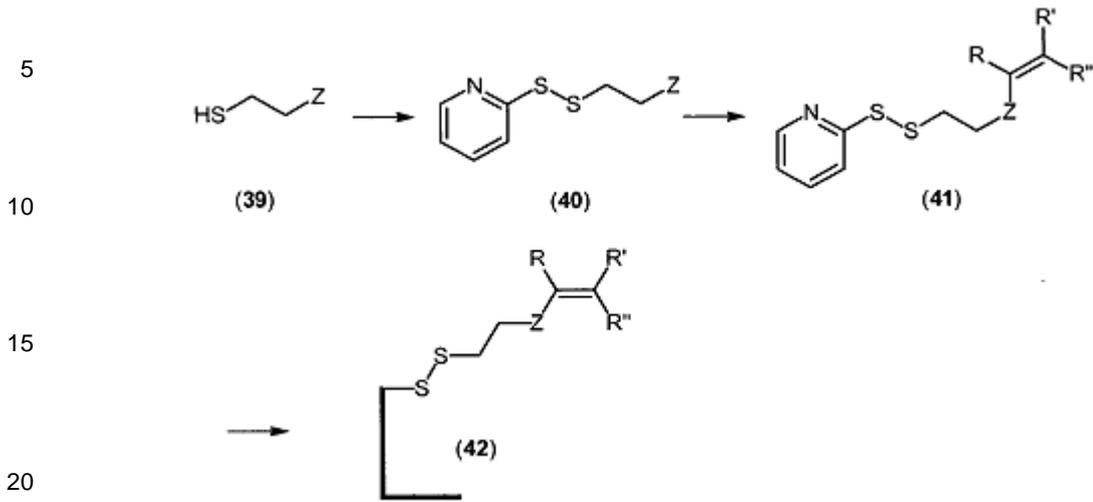
45 Para Z=OH, el 2-mercaptoetanol reacciona con un disulfuro de dipiridilo, seguido por una O-tosilación (Z=OTs). El tosilato (40) reacciona entonces directamente con un enolato o en la presencia de fluoruro con un O-trialquilsililenolato para generar al enolato (41). La enamina o el enolato (41) podría entonces acoplarse a un oligonucleótido que porte a SH tal como se describió anteriormente para generar al bloque monomérico de construcción (42).

50

55

60

65



25 **[0262]** Los bloques monoméricos de construcción (42) podrían reaccionar con un oligonucleótido que porta un carbonilo tal como (44) o alternamente un oligonucleótido que porta a un alquilhaluro tal como (43) de la siguiente forma:

30 El oligonucleótido plantilla (1 nmol) es mezclado con los bloques monoméricos de construcción (42) (1 nmol) y (43) (1 nmol) en 50 mM de MOPS, amortiguador de fosfato o de hepes y 250 mM de solución de NaCl, pH = 7.5-8.5 y preferiblemente pH = 7.5. La mezcla de la reacción se la deja a que repose a 35-65 °C, preferiblemente a 58 °C durante la noche o alternamente a una temperatura fluctuante (10 °C durante un segundo y entonces 35 °C durante un segundo) para generar al enlace plantilla (46), donde Z = O o NR. Para los compuestos en los cuales Z = NR se podrían aplicar condiciones ligeramente ácidas para generar al producto (46) con Z = O.

35 El oligonucleótido plantilla (1 nmol) es mezclado con los bloques monoméricos de construcción (42) (1 nmol) y (44) (1 nmol) en 0.1 M de TAPS, amortiguador de fosfato o de hepes y 300 mM de solución de NaCl, pH = 7.5-8.5 y preferiblemente pH = 8.0. La mezcla de la reacción se la deja a que repose a 35-65 °C preferiblemente a 58 °C durante la noche o alternamente a una temperatura fluctuante (10 °C durante un segundo y luego 35 °C durante un segundo) para generar al enlace plantilla (45), donde Z = O o NR. Para compuestos en los cuales Z = NR se pueden aplicar condiciones ligeramente ácidas para generar al producto (45) con Z = O.

40

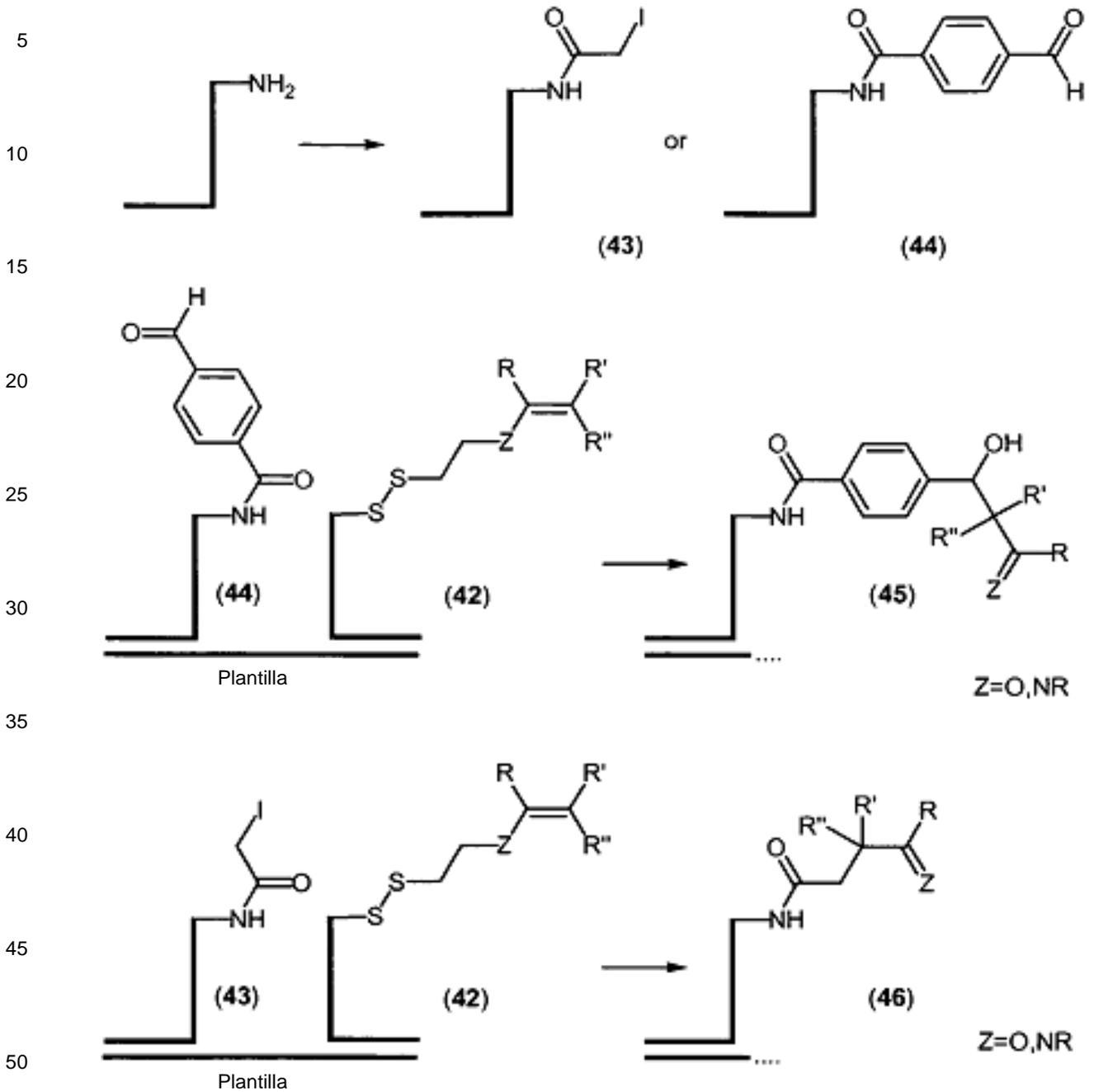
45

50

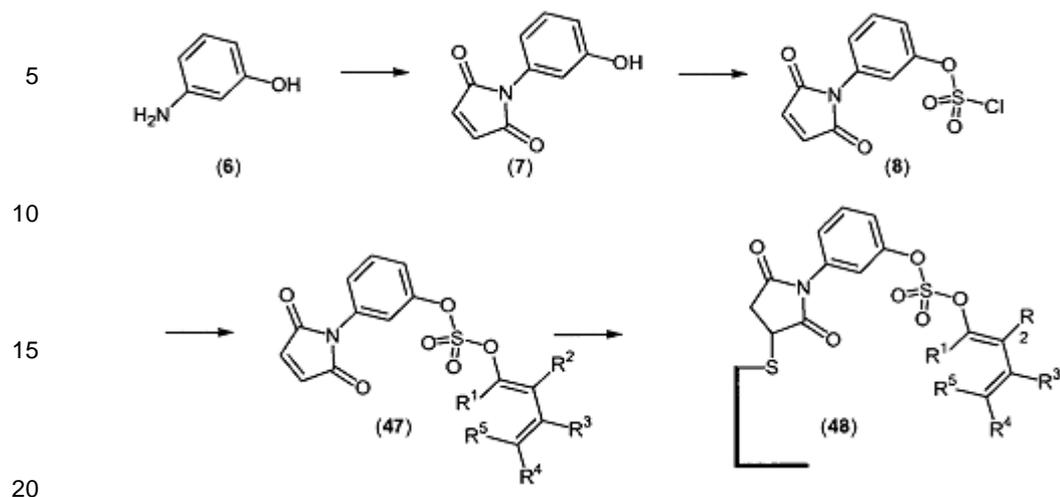
55

60

65



[0263] Enoléteres tipo (13) podrían experimentar una ciclo-adición con o sin una catálisis. Asimismo, se podrían preparar y utilizar dienoléteres, por ejemplo, por medio de una reacción de (8) con el enolato o trialquilsililenolato (en la presencia de fluoruro) de una cetona o aldehído no saturada por  $\alpha,\beta$ - para generar a (47), que podría ser cargada en un oligonucleótido que porta a SH, para generar al bloque monomérico de construcción (48).



[0264] El dieno (49), el eno (50) y el 1,3-dipolo (51) podrían formarse por medio de una reacción simple entre un oligonucleótido que porta un amino y el NHS-éster del bloque orgánico de construcción correspondiente. La reacción de (13) o alternamente (31, R" = vinilo) con dienos tales como, por ejemplo, (49) para generar a (52) o, por ejemplo, 1,3-dipolos (51) para generar a (53) y la reacción de (48) o (31, R" = dienilo) con enos, tal como, por ejemplo, (50) para generar a (54) puede realizarse de la siguiente manera:

El nucleótido plantilla (1 nmol) es mezclado con el bloque monomérico de construcción (13) o (48) (1 nmol) y (49) o (50) o (51) (1 nmol) en 50 mM de MOPS, amortiguador de fosfato o de hepes y 2.8 M de solución de NaCl, pH = 7.5-8.5 y preferiblemente pH = 7.5. La mezcla de la reacción se deja 35-65 °C, preferiblemente a 58 °C durante la noche o alternamente a una temperatura fluctuante (10 °C durante un segundo luego 35 °C durante un segundo) para generar el enlace plantilla (52), (53) o (54).

35

40

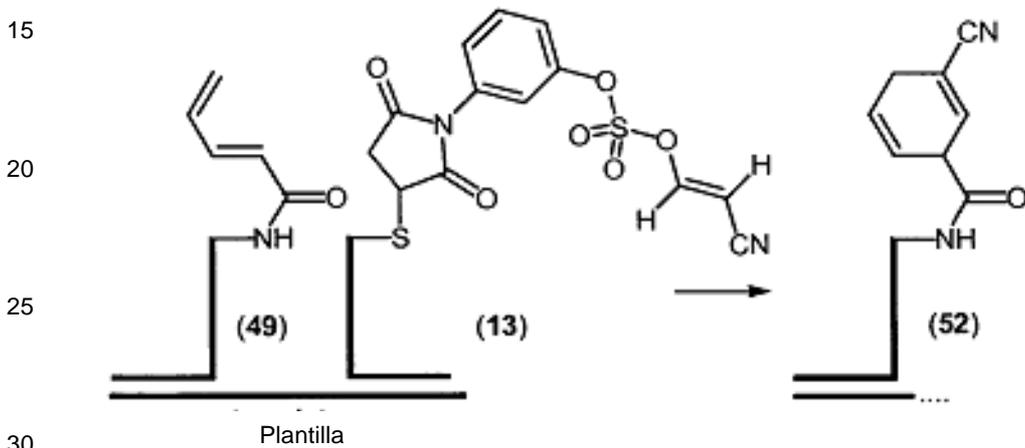
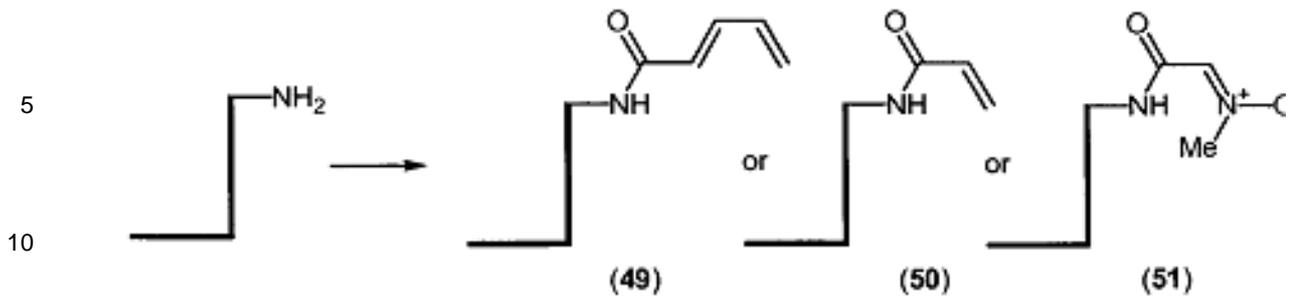
45

50

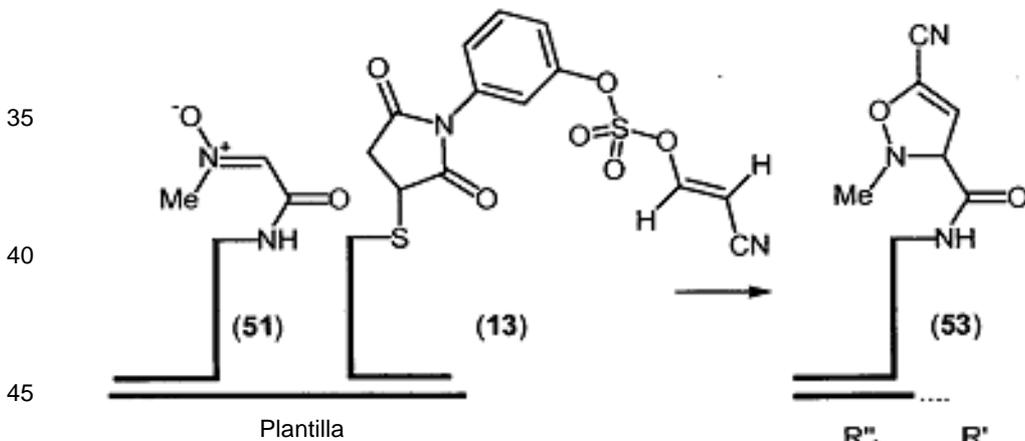
55

60

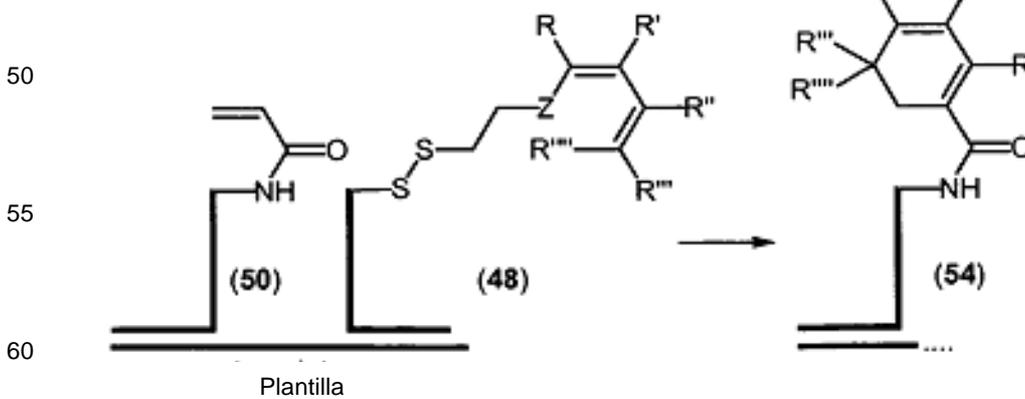
65



Plantilla



Plantilla



Plantilla

65 **Separación del enlazador**

[0265] La activación (separación de algunos o todos los enlazadores que conectan a los elementos

complementarios y a la entidad funcional) puede realizarse por medio de cambios en el pH y/o la temperatura, adición de reactivos o catalizadores, enzimas o ribozimas, o luz, ultravioleta u otra radiación electromagnética, etcétera. Particularmente, enzimas relevantes incluyen a proteasas, esterasas, y nucleasas. Una lista de enlazadores separables y las condiciones para su separación se muestra en la figura 10.

[0266] Otros enlazadores separables incluyen a la partícula del ácido fenoxiacético de 4-hidroximetilo, que es separada por ácido, la partícula del ácido 2-[(terc-butildifenilsiloxi)metil]benzoico que es separable con fluoruro, y el fosfato de una partícula de ácido benzoico de 2-hidroximetilo que suministra a un enlazador separable por medio de una combinación de un tratamiento de fosfatasa alcalina seguido por un tratamiento de una alcalina moderada.

[0267] En la mayoría de casos, es deseable tener por lo menos 2 tipos diferentes de enlazadores que conecten a elementos complementarios con las entidades funcionales. De esta forma, es posible separar selectivamente a todos excepto a uno de los enlazadores entre la plantilla complementaria y las entidades funcionales, obteniendo, por lo tanto, un polímero enlazado físicamente a través de sólo un enlazador a la plantilla que modeló su síntesis. Este enlazador intacto debería afectar las actividades del polímero adjunto lo menos posible, pero aparte de eso, la naturaleza del enlazador no es considerada como una característica esencial de este invento. El tamaño del enlazador en términos de la longitud entre la plantilla y el polímero modelado puede variar ampliamente, pero para propósitos del invento, la longitud está, preferiblemente, en el rango de la longitud de sólo un enlace, a una cadena con una longitud de alrededor de 20 átomos.

#### **Selección y examinación de moléculas modeladas**

[0268] La selección o examinación de las moléculas modeladas con las actividades deseadas (por ejemplo, enlaces a un objetivo, una actividad catalítica o un efecto particular específicos en un ensayo de actividad) podría realizarse de acuerdo a cualquiera de los protocolos estándar. Por ejemplo, selecciones de afinidad podrían realizarse de acuerdo a los principios utilizados para péptidos mostrados por la presentación de fagos, polisomas o la fusión proteínica de ARNm. La selección de la actividad catalítica podría ser realizada por selecciones de afinidad en columnas de afinidad análogas a estados de transición (Baca et al., Proc. Natl. Acad. Sci Estados Unidos de América. 1997; 94(19):10063-8), o por esquemas selectivos que se basan en las funciones (Pedersen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América. 1998, 95(18):10523-8). La examinación para detectar una característica deseada podría realizarse de acuerdo a ensayos estándar que se basan en placas de micro titulación, o por medio de ensayos de organización de FACS.

#### **Uso de bibliotecas de moléculas modeladas**

*Selección de moléculas que presentan a plantillas que se enlazarán a objetivos conocidos*

[0269] Este invento también es dirigido a métodos que permiten la selección de moléculas pequeñas capaces de enlazarse a diferentes objetivos. La tecnología molecular que presenta a plantillas contiene una función integrada para dirigir la selección y la amplificación. La capacidad de enlazarse de la molécula seleccionada debería ser selectiva en el sentido de que éstas coordinan solamente a un blanco específico y por lo tanto previenen o inducen un efecto biológico específico. Finalmente, estas moléculas enlazadoras deben poder usarse, por ejemplo, como agentes terapéuticos o como agentes de diagnóstico.

[0270] Las bibliotecas de moléculas que presentan a plantillas pueden ser combinadas fácilmente con examinaciones, selecciones o ensayos para evaluar el efecto de enlace de un ligando molecular en relación al objetivo. En una sección más específica, el método de presentación de plantillas suministra un sistema rápido de aislamiento e identificación de ligandos moleculares que enlazan a estructuras supra-moleculares, macro-supra-moleculares, macro-moleculares y moleculares-pequeñas (por ejemplo, ácidos nucleicos y proteínas, incluyendo a enzimas, receptores, anticuerpos y glicoproteínas); moléculas de señalización (por ejemplo, cAMP, trifosfato de inositol, péptidos, prostaglandinas); y superficies (por ejemplo, metales, plásticos, compuestos, videos, cerámicas, cauchos, pieles, tejidos)

[0271] Específicamente, la selección o división, en este sentido, se refiere a cualquier proceso por el cual el complejo molecular que presenta a plantillas enlazado a una molécula objetivo, la pareja del complejo objetivo, pueden ser separadas de las moléculas que presentan a la plantilla que no están enlazadas a la molécula objetivo. La selección puede lograrse por medio de varios métodos conocidos en la industria.

[0272] La estrategia de selección puede ser ejecutada para permitir una selección en contra de casi cualquier objetivo. En una forma importante, ningún paso en esta estrategia de selección necesita ninguna información estructural detallada del objetivo o de las moléculas en las bibliotecas. Todo el proceso es controlado por la afinidad de enlace involucrada en el reconocimiento/coordinación específica de las moléculas en la biblioteca en relación a un objetivo específico. Sin embargo, en algunas aplicaciones, si fuese necesario, la funcionalidad puede ser incluida en forma análoga a la selección para una actividad catalítica usando la presentación de fagos (Soumillion et al. (1994) J. Mol. Biol. 237: 415-22; Pedersen et al. (1998) PNAS 18: 10523-10528). Ejemplos de varios procedimientos de selección son descritos más adelante.

[0273] Este proceso de selección integrado de moléculas que presentan a plantillas es muy adecuado para optimizaciones, en las cuales los pasos de selección son hechos en series empezando con la selección de

moléculas enlazadoras y que finaliza con la molécula enlazadora optimizada. Los procedimientos individuales en cada caso son posibles de automatizar utilizando varios sistemas robóticos. Es debido a que existe un flujo secuencial de eventos y donde cada evento puede ser realizado por separado. En un escenario más preferible, una biblioteca adecuada de moléculas que presentan a plantillas y la molécula objetivo son suministrados a un sistema completamente automático que finalmente genera a la molécula enlazadora optimizada. Aún más preferiblemente, este proceso debería ejecutarse sin la necesidad de trabajo externo afuera de un sistema robótico durante todo el proceso.

**[0274]** Las bibliotecas de moléculas presentadas en la plantilla contendrán moléculas que podrían coordinar potencialmente a cualquier objetivo conocido o desconocido. La región de enlaces en un objetivo podría estar en un lugar catalítico de una enzima, una bolsa de enlace en un receptor (por ejemplo, GPCR), un área superficial proteínica involucrada en interacciones proteína-proteína (especialmente un punto de acceso), y un lugar específico en el ADN (por ejemplo, el surco mayor). La tecnología molecular de presentación de plantillas identificará principalmente a las moléculas de coordinan a la molécula objetivo. La función natural del objetivo podría ser estimulada (agonizada) o reducida (antagonizada) o no ser afectada por los enlaces de las moléculas que presentan a la plantilla. Esto dependerá de la modalidad precisa de enlace y el lugar particular de enlaces que las moléculas que presentan a la plantilla ocupen en el objetivo. Sin embargo, se conoce que los lugares funcionales (por ejemplo, lugares de interacción proteína-proteína o catalíticos) en diferentes proteínas son más propensos a enlazar moléculas que otras áreas superficiales más neutrales en la proteína. Adicionalmente, estos lugares funcionales normalmente contienen una región más pequeña que parece ser principalmente responsable de la energía de enlaces, las regiones denominadas puntos de acceso (Wells, et al. (1993) Recent (Reciente) Prog. Hormone (Hormona) Res. 48; 253-262). Este fenómeno incrementará la posibilidad de seleccionar directamente moléculas pequeñas que afectarán a la función biológica de ciertos objetivos.

**[0275]** La tecnología molecular que presenta a plantillas del invento, permitirá procedimientos de selección análogos a otros métodos de presentación tal como la presentación de fagos (Smith (1985) Ciencia 228: 1315-1317). La selección de la presentación de fagos ha sido utilizada exitosamente en péptidos (Wells y Lowman. (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2, 597-604) proteínas (Marks et al. (1992) J. Biol. Chem. 267: 16007-16010) y anticuerpos (Winter et al. (1994) Annu. Rev. Immunol. 12: 433-455). Procedimientos similares de selección también son aprovechados para otros tipos de sistemas de presentación tal como la presentación de ribosomas (Mattheakis et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 9022-9026) y la presentación de ARNm (Roberts, et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 12297-302). Sin embargo, este invento, la tecnología molecular de presentación de plantillas, por la primera vez permitirá la selección directa de moléculas pequeñas que no son péptidos para objetivos específicos independientemente del proceso de interpretación en el complejo de ribosomas. Los pasos necesarios incluidos en este invento son la amplificación de las plantillas y la incorporación y reacción de los bloques monoméricos de construcción. La amplificación e incorporación y la incorporación y reacción son hechos ya sea en el mismo paso o en un proceso secuencial.

**[0276]** Los enlaces entre las moléculas modeladas (la molécula presentada) y la unidad de replicación de ADN (la plantilla codificadora) permite una identificación rápida de moléculas enlazadoras utilizando varias estrategias de selección. Este invento permite una estrategia amplia para identificar a moléculas enlazadoras en contraste con cualquier objetivo conocido. Adicionalmente, esta tecnología también permitirá el descubrimiento de objetivos desconocidos nuevos al aislar a las moléculas enlazadoras en contraste con antígenos desconocidos (epitopes) y usar estas moléculas enlazadoras para identificación y validación (refiérase a la sección "identificación y validación de objetivos").

**[0277]** Tal como será comprendido, la selección de moléculas enlazadoras provenientes de las bibliotecas de moléculas presentadoras de plantillas puede realizarse en cualquier formato para identificar a moléculas enlazadoras óptimas. Un procedimiento de selección típico en contra de un objetivo purificado incluirá los siguientes pasos importantes: la generación de una biblioteca molecular presentadora de plantillas: la inmovilización de la molécula objetivo utilizando un método adecuado de inmovilización; agregar la biblioteca para permitir enlaces de las moléculas mostradas por la plantilla; remover las moléculas presentadas por la plantilla que no se enlacen; la elución de las moléculas presentadas por la plantilla enlazadas al objetivo inmovilizado; la amplificación de moléculas presentadoras de la plantilla enriquecidas para cuestiones de identificación por medio de secuenciación o para agregarlas a la siguiente ronda de selección. Los pasos generales son mostrados esquemáticamente en la figura 39.

**[0278]** En una sección importante, un protocolo de selección estándar utilizando una biblioteca de moléculas que presentan a la plantilla es el utilizar el método de bio-visualización panorámica. En esta técnica, el objetivo (por ejemplo, una proteína o un conjugado de péptidos) es inmovilizado en un soporte sólido y las moléculas presentadas por la plantilla que potencialmente coordinan para con el objetivo son las que son seleccionadas y enriquecidas. Sin embargo, el procedimiento de selección requiere que las moléculas enlazadas presentadas por la plantilla puedan ser separadas de aquellas que no están enlazadas, es decir, aquellas en la solución. Hay muchas formas para que esto pueda lograrse, tal como es conocido para una persona que tiene conocimiento en la industria.

**[0279]** El primer paso en el ciclo de enriquecimiento de afinidad (una ronda tal como se describió en la figura 1) es cuando las moléculas presentadas por la plantilla que muestran una baja afinidad para con un objetivo inmovilizado

son lavadas y separadas, dejando a las moléculas presentadas por la plantilla que se enlazan fuertemente y que están adheridas al objetivo. La población enriquecida, que permanece enlazada al objetivo después de un lavado extremo, se eluyen con, por ejemplo, ácidos, sales caotrópicas, calor, elución competitiva con el ligando conocido o liberación proteolítica de las moléculas objetivo/plantilla. Las moléculas presentadas por la plantilla que fueron eluidas son adecuadas para PCR, conllevando a muchas órdenes de amplificación, es decir, cada molécula presentada por la plantilla enriquecida en la primera ronda de selección participa en las siguientes rondas de selección con un número mayormente incrementado de copias. Comúnmente después de 3 a 10 rondas de enriquecimiento, una población de moléculas es obtenida que es mucho más enriquecida para las moléculas presentadas en la plantilla y que se enlazan mucho más fuertemente al objetivo. Esto es seguido cuantitativamente por medio de ensayos de la proporción de las moléculas que presentan a la plantilla que permanecen enlazadas al objetivo inmovilizado. Las secuencias variantes de la plantilla son entonces secuenciadas individualmente.

**[0280]** La inmovilización del objetivo (péptido, proteínas, ADN u otro antígeno) en microesferas podría ser útil cuando existe duda acerca de que el objetivo se adhiera al tubo (un ejemplo, objetivos no replegados eluidos provenientes de geles SDS-PAGE). Las microesferas derivadas pueden, entonces, ser utilizadas para seleccionar a las moléculas que presentan a la plantilla, simplemente al sedimentar a las microesferas en un centrifugador. Alternamente, las esferas pueden ser utilizadas para hacer una columna de afinidad y la suspensión de bibliotecas que presentan a la plantilla pueden ser de circuladas a través de la columna. Existen muchas matrices reactivas disponibles para inmovilizar a la molécula objetivo, incluyendo, por ejemplo, la adherencia a grupos NH<sub>2</sub> y -SH. Microesferas magnéticas son esencialmente una variación de lo que se acaba de mencionar; el objetivo es adherido a microesferas magnéticas las cuales luego son utilizadas en la selección. Las microesferas activadas están disponibles con lugares de adherencia para los grupos -NH<sub>2</sub> o -COOH (los cuales puede ser utilizados para acoplamiento). El objetivo puede también ser colocado en nitrocelulosa o PVDF. Cuando se utiliza una estrategia de manchado, es importante asegurarse que la tira de la mancha utilizada es bloqueada después de la inmovilización del objetivo (por ejemplo, con BSA o una proteína similar).

**[0281]** En otra sección importante, la selección o división también puede realizarse utilizando por ejemplo: inmunoprecipitaciones o inmunoprecipitaciones indirectas donde la molécula objetivo es capturada junto con las moléculas enlazadoras que presentan a la plantilla; cromatografía de columnas de afinidad donde el objetivo es inmovilizado en una columna y las bibliotecas que presentan a la plantilla son fluidas a través para capturar a las moléculas enlazadoras del objetivo; ensayos de cambio en la corrida electroforética (de agarosa o de poliacrilamida) donde las moléculas seleccionadas que muestran a la plantilla migran juntas con el objetivo en el gel; organización de FACS para ubicar a las células que coordinan a las moléculas que presentan a la plantilla; centrifugación de gradientes CsCl para aislar a la molécula objetivo junto con las moléculas enlazadoras que presentan a la plantilla; espectroscopía de masa para identificar a las moléculas objetivo que son marcadas con las moléculas presentadoras de la plantilla; etcétera, sin limitaciones. En general, cualquier método en el cual el complejo molécula que presenta la plantilla-objetivo pueda separarse de las moléculas que presentan a la plantilla que no estén enlazadas al objetivo es útil.

Tabla 2: ejemplos de posibles métodos de selección que pueden ser utilizados para identificar a moléculas enlazadoras utilizando la tecnología presentadora de plantillas

Tipo de Objetivo	Método de la Opción
Receptores solubles	inmovilización directa, inmunoprecipitación, columna de afinidad, organización de FACS, MS
Receptor superficial celular	selección de sustracción superficial-celular, organización de FACS, columna de afinidad
Inhibidores enzimáticos	inmovilización directa, inmunoprecipitación, columna de afinidad, organización de FACS, MS
Epítopes superficiales	selección y sustracción de células de la superficie, selección in-vivo, organización de FACS, columna de afinidad

**[0282]** La elución de moléculas presentadas por la plantilla puede realizarse de diferentes formas. Las moléculas enlazadoras pueden ser liberadas de la molécula objetivo por medio de desnaturalizaciones, ácidos o sales caotrópicas y luego transferidas a otro matraz para su amplificación. Alternamente, la elución puede ser más específica para reducir el 2º plano. La elución puede lograrse utilizando proteólisis para separar un enlazador entre el objetivo y la superficie inmovilizadora o entre la molécula presentadora y la plantilla. Además, la elución puede lograrse por medio de competición con un ligando conocido. Alternamente, la reacción PCR puede realizarse directamente en los pozos lavados al final de la reacción de selección.

**[0283]** Una característica posible del invento es el hecho que las moléculas enlazadoras no necesitan ser eluíbles del objetivo para ser seleccionables puesto que únicamente el ADN que codifica a la plantilla es necesario para más amplificaciones o clonaciones, no la molécula enlazadora en sí. Es conocido que algún procedimiento de selección puede enlazar a los ligandos más ávidos tan firmemente que es muy difícil su elución. Sin embargo, el método del invento puede utilizarse exitosamente para generar a ligandos ávidos, aún ligandos de enlaces covalentes.

**[0284]** Un protocolo alternativo de selección incluye un ligando conocido como un fragmento de cada molécula presentada en la biblioteca. Aquel ligando conocido guía a la selección al coordinar a una parte definida en la molécula objetivo y al enfocar la selección a las moléculas que se enlazan a la misma región. Esto podría ser especialmente útil para incrementar la afinidad para un ligando con una función biológica deseada, pero con una potencia demasiado baja.

**[0285]** Un aspecto adicional de este invento se refiere a métodos para incrementar la diversidad o complejidad de una sola molécula enlazadora o una mezcla de moléculas enlazadoras seleccionadas. Después de la selección inicial, las moléculas enriquecidas pueden ser alteradas para incrementar aún más la diversidad o complejidad química de las moléculas presentadas. Esto puede realizarse utilizando varios métodos conocidos en la industria. Por ejemplo, el uso de oligonucleótidos sintetizados aleatoriamente, oligonucleótidos alterados o mutagénesis aleatoria. La mezcla aleatoria puede enfocarse para permitir a codones preferibles o localizados a una porción predeterminada o su secuencia de la secuencia de nucleótidos plantilla. Otro método preferible es combinar codificaciones plantillas para las moléculas enlazadoras en una forma similar a una mezcla aleatoria de ADN que es utilizada en genes homólogos para proteínas (Stemmer (1994) Nature (Naturaleza) 370:389-91). Este método puede ser utilizado para recombinar bibliotecas iniciales o más preferiblemente de combinar plantillas codificadoras enriquecidas.

**[0286]** En otra sección del invento, cuando se enlazan moléculas con antígenos específicos que solamente pueden expresarse en una superficie celular, por ejemplo, canales iónicos o receptores transmembrana, se requiere que las partículas celulares en sí puedan ser utilizadas como el agente de selección. En este tipo de métodos, las células que no tienen al objetivo específico, deberían ser utilizadas para hacer una o más rondas de selección negativa o estar presentes en exceso en el proceso de selección. De esta forma, las moléculas irrelevantes presentadas en la plantilla son removidas. Por ejemplo, para una selección positiva de un receptor expresado en todas las células, la selección activa estaría en contra de las células no transformadas. Este método también es llamado selección por sustracción y ha sido utilizado exitosamente para presentaciones de fagos en bibliotecas de anticuerpos (Hoogenboom et al. (1998) Immunotech. 4: 1-20).

**[0287]** Un ejemplo específico de un procedimiento de selección puede involucrar la selección en receptores de células superficiales que se vuelven internalizadas en la membrana de tal forma que el receptor, junto con la molécula enlazadora seleccionada, pueden entrar al citoplasma celular o al núcleo celular. Dependiendo del índice de disociación constante para moléculas enlazadoras seleccionadas específicas, estas moléculas residen en gran parte en el citoplasma o en el núcleo después de la absorción.

**[0288]** Una persona con conocimiento en la industria reconocerá que el proceso de selección puede ser realizado en cualquier configuración donde el objetivo es utilizado como el anzuelo en el cual las moléculas que presentan a la plantilla pueden coordinarse.

**[0289]** Los métodos de selección de este invento pueden ser combinados con una selección o examinación secundaria para identificar a los ligandos moleculares capaces de modificar a la función molecular objetivo en el momento del lanzamiento. Por lo tanto, los métodos aquí descritos pueden ser utilizados para aislar o producir moléculas enlazadoras que se vinculen a y que modifiquen a la función de cualquier proteína o ácido nucleico. Está contemplado que el método de este invento puede ser utilizado para identificar, aislar o producir moléculas enlazadoras que afectarán la actividad catalítica de las enzimas objetivo, es decir, inhiben la catálisis o modifican a los enlaces de los sustratos, afectan la funcionalidad de los receptores proteínicos, es decir, inhiben el enlace a receptores o modifican la especificidad del enlace a los receptores; afectan la formación de multímeros proteínicos, es decir interrumpen la estructura cuaternaria de las subunidades proteínicas; y modifican las propiedades de transporte de las proteínas, es decir, interrumpen el transporte de moléculas pequeñas o iones por las proteínas.

**[0290]** Otro aspecto adicional de este invento se refiere a métodos que permiten la funcionalidad en el proceso de selección. Por ejemplo, cuando un enriquecimiento para cierto objetivo se ha realizado generando un número de coincidencias diferentes, estas coincidencias pueden ser probadas directamente para detectar una funcionalidad (por ejemplo, una señalización celular). Esto puede, por ejemplo, ser realizado utilizando una organización celular activada por fluorescencia (FACS - fluorescence-activated cell sorting).

**[0291]** El fenotipo alterado podría ser detectado en una variedad de formas. Generalmente, el fenotipo cambiado es detectado utilizando, por ejemplo: análisis microscópicos de morfología celular; ensayos estándar de viabilidad celular, incluyendo una muerte celular incrementada y una viabilidad celular incrementada; ensayos de marcaciones estándar tales como ensayos de indicadores fluorométricos para detectar la presencia de niveles de células o moléculas particulares, incluyendo FACS u otras técnicas de coloración celular; detección bioquímica de la expresión de los compuestos objetivos después de matar a las células; etcétera. En algunos casos, senderos específicos de señalización pueden ser probados utilizando varias estructuras genéticas reportadoras.

**[0292]** Métodos secundarios de selección que pueden ser combinados con tecnología molecular que presenta a las plantillas incluye entre otras selecciones o exámenes para inhibición enzimática, alteración o enlace de sustratos, pérdida de funcionalidad, alteración de la estructura, etcétera. Aquellas personas con un conocimiento

normal en la industria serán capaces de seleccionar entre las varias alternativas de métodos de selección o examinación que son compatibles con los métodos aquí descritos.

**[0293]** Las moléculas enlazadoras del invento pueden ser seleccionadas por otras propiedades adicionalmente a su capacidad de enlace. Por ejemplo, durante la selección, la estabilidad bajo ciertas condiciones del entorno deseado de trabajo del producto final puede ser incluidas como un criterio de selección. Si moléculas enlazadoras que son estables en la presencia de una proteasa específica, aquella proteasa puede ser parte del medio amortiguador usado durante la selección. Similarmente, la selección puede ser realizada en extractos séricos o celulares de cualquier tipo de medio. Tal como será comprendido, cuando se utilice este método de presentación de plantilla, las condiciones que alteran o degradan a la plantilla deberían ser editadas para permitir la amplificación. Otras propiedades deseadas pueden ser incorporadas, directamente a las moléculas presentadoras tal como será entendido por aquellas personas con conocimiento en la industria. Por ejemplo, la afinidad de las membranas puede ser incluida como una propiedad al utilizar bloques de construcción con una alta hidrofobicidad.

**[0294]** Las moléculas seleccionadas por la tecnología molecular de presentación de plantillas pueden ser producidas por medio de varios métodos sintéticos. La síntesis química puede lograrse puesto que la estructura de las moléculas enlazadoras seleccionadas es fácilmente obtenible de la secuencia de ácidos nucleicos de la plantilla codificadora. La síntesis química de las moléculas seleccionadas también es posible porque los bloques de construcción que conforman a las moléculas enlazadoras también son conocidos adicionalmente a las reacciones químicas que los forman.

**[0295]** En una sección importante, las moléculas enlazadoras seleccionadas son sintetizadas y probadas en varias pruebas apropiadas in vivo e in vitro para verificar a los candidatos seleccionados para detectar sus efectos y potencia biológica. Esto puede realizarse en una variedad de formas, tal como será apreciado por aquellas personas con conocimiento en la industria, y podrían depender de la composición de la molécula bioactiva.

#### Identificación y validación del objetivo

**[0296]** En otro aspecto, este invento suministra métodos para identificar o aislar objetivos que están involucrados en los procesos patológicos u otros eventos biológicos. En este aspecto, las moléculas objetivo son nuevamente preferiblemente proteínas o ácidos nucleicos, pero también pueden incluir, entre otras, a carbohidratos y varias moléculas a las cuales enlaces de ligandos moleculares específicos pueden lograrse. En principio, la tecnología molecular de presentación de plantillas podría ser utilizada para seleccionar epítopes o antígenos específicos encontrados en las células, tejidos o in vivo. Estos epítopes podrían pertenecer a un objetivo que está involucrado en eventos biológicos importantes. Adicionalmente, estos epítopes también podrían estar involucrados en la función biológica del objetivo.

**[0297]** La presentación de fagos con bibliotecas de anticuerpos y de péptidos ha sido utilizadas muchas veces exitosamente para identificar a nuevos antígenos celulares (*por ejemplo*, Pasqualini et al. (1996) Nature (Naturaleza) 380: 364-366; Pasqualini et al. (2000) Cancer (Cáncer) Res. 60: 722-727; Scheffer et al. (2002) Br J Cancer (Cáncer) 86: 954-962; Kupsch et al. (1999) Clin Cancer (Cáncer) Res. 5: 925-931; Tseng-Law et al. (1999) Exp. Hematol. 27: 936-945; Gevorkian et al. (1998) Clin. Immunol. Immunopathol. 86: 305-309). Especialmente efectivo ha sido la selección directamente en células que se sospecha expresan antígenos de células específicas. En una forma importante, cuando se selecciona para antígenos de células superficiales, la molécula plantilla puede ser mantenida fuera de la célula. Esto incrementará la probabilidad de que la molécula plantilla esté intacta después de la liberación para superficies celulares.

**[0298]** Una selección in vivo de moléculas presentadas por plantillas tiene un potencial tremendo. Al seleccionar de bibliotecas de moléculas presentadas por plantillas in vivo es posible aislar a las moléculas capaces de dirigirse específicamente a tejidos normales y otros tejidos patológicos (por ejemplo, tumores). Este principio ha sido ilustrado utilizando la presentación de fagos de bibliotecas de péptidos (Pasqualini y Ruoslathi (1996) Nature (naturaleza) 380: 364-366). Éste sistema también ha sido utilizado en humanos para identificar motivos de péptidos que están ubicados en diferentes órganos (Arap et al. (2002) Nat. Med. 2:121-127). Un procedimiento de selección similar podría ser utilizado para las bibliotecas presentadoras de plantillas. El ADN codificador en la presentación de fagos es protegido efectivamente puesto que la partícula fago permite una selección in vivo. Asimismo, la estabilidad de la plantilla in vivo será importante para la amplificación e identificación. La plantilla puede ser estabilizada utilizando varios derivados de nucleótidos en una forma similar a la que ha sido utilizada para estabilizar a aptámeros para aplicaciones in vivo (Nolte (1996) Nature (Naturaleza) Biotechnol. 14: 1116-1121; Pagnatis et al. (1997) Nature (Naturaleza) Biotechnol. 15: 68-72). Sin embargo, es razonable creer que la estructura plantilla será estabilizada en contra de degradaciones debido a las bases modificadas utilizadas para codificar a la molécula presentada. Otros tipos de protección también son posibles por los cuales la molécula plantilla es protegida de la solución utilizando varios métodos. Esto podría, por ejemplo, incluir a liposomas, pegilación, proteínas de enlace u otros tipos de protección. La molécula plantilla también podría ser integrada en otra estructura diseñada que proteja a la plantilla de manipulaciones externas. Por ejemplo, el enlazador puede ser diseñado para incorporarse en vesículas para posicionar a plantillas adentro de la vesícula y las moléculas presentadoras en el exterior. La configuración protegerá a las moléculas plantilla de manipulaciones externas y al mismo tiempo permitirá la exposición de las moléculas presentadoras para permitir la

selección.

**[0299]** La mayoría de anticuerpos tienen un área grande enlazadora cóncava que requiere hasta cierto grado a epítopes prominentes en los antígenos. Además, la molécula anticuerpo es una macromolécula grande (150 KDa) la cual reducirá estéricamente el acceso para un número de antígenos diferentes (por ejemplo, en una superficie celular). La tecnología presentadora de plantillas debería estar disponible para acceder y reconocer a epítopes inaccesibles a anticuerpos. Las moléculas enlazadoras pequeñas serán capaces de enlazarse a lugares activos, ranuras y otras áreas en un antígeno. El elemento plantilla codificador también es más pequeño que un anticuerpo lo que incrementará el acceso físico de la molécula enlazadora de la plantilla. Adicionalmente, la diversidad y la complejidad de las bibliotecas de moléculas que presentan a las plantillas serán mucho mayores en comparación a las bibliotecas de péptidos. Esto incrementará la posibilidad de encontrar moléculas que puedan coordinar a epítopes que son inaccesibles a péptidos debido a química inadecuada. En general, la tecnología de moléculas que presentan a plantillas tiene el potencial de identificar antígenos nuevos que no son posibles de identificar con anticuerpos o con péptidos. Una persona con conocimiento normal en la industria reconocerá que varios tipos de células pueden ser utilizadas en el procedimiento de selección. También quedará claro que la selección de nuevos antígenos puede realizarse utilizando métodos de sustracción tal como fue descrito anteriormente.

**[0300]** Otro aspecto de este invento narra los métodos para validar al objetivo identificado. Las moléculas enlazadoras identificadas pueden ser usadas directamente si cambian la respuesta biológica del objetivo. Esto puede ser hecho in vitro utilizando cualquier ensayo directo que se basa en células o directamente in vivo estudiando a cualquier respuesta fenotípica. La fuerza de este método es que las mismas moléculas son utilizadas para la identificación y validación de varios objetivos. Más favorablemente, las moléculas enlazadoras también podrían usarse directamente como agentes terapéuticos.

**[0301]** En otra sección importante, las moléculas que presentan a la plantilla son utilizadas para sacar a las moléculas objetivo. Esto puede, por ejemplo, lograrse por medio de una selección de una biblioteca de ADNc expresada en un bacteriófago (bibliotecas versus bibliotecas). Al mezclar a una biblioteca de moléculas que presentan a plantillas con una biblioteca de ADNc, será posible encontrar parejas que se enlacen entre las moléculas pequeñas en la biblioteca de moléculas que presentan a la plantilla y las proteínas de la biblioteca de ADNc. Una posibilidad es mezclar la biblioteca de presentación de fagos con una biblioteca de presentación de plantillas y hacer una selección para la biblioteca de fagos o de plantillas. La biblioteca seleccionada es expuesta en placas para localizar clones de fagos y la codificación de ADN para las moléculas de fagos y de plantillas presentadas pueden ser identificadas entonces utilizando PCR. Otros tipos de bibliotecas aparte de la de ADNc podrían ser utilizados tales como bibliotecas de ácidos nucleicos, carbohidratos, y polímeros sintéticos.

**[0302]** En otra sección del invento, la tecnología de moléculas presentadoras de plantillas puede ser utilizada para medir el metabolismo de medicamentos in vivo e in vitro. Esto podría incluir las reacciones de la fase 1 (activación) y la fase 2 (desintoxicación). Las clases importantes de reacciones son la oxidación, la reducción, y la hidrólisis. Otras enzimas catalizan a conjugaciones. Estas enzimas podrían ser utilizadas como objetivos en un proceso de selección para eliminar a moléculas presentadas que son propensas a coordinar a estas enzimas. Las plantillas correspondientes a estas moléculas presentadas podrían ser usada subsiguientemente para completar o eliminar a estas moléculas cuando se elaboran las bibliotecas de moléculas que presentan a plantillas.

**[0303]** Estas bibliotecas obtenidas estarán entonces libres de moléculas que tengan una tendencia para enlazar a las enzimas involucradas en la fase I-II y posiblemente serán eliminadas más rápido. Por ejemplo, una selección de cada enzima separada o cualquier combinación de enzimas citocromos P450, monooxigenasas flavinas, oxidasas de monoaminas, estereasas, amidasas, hidrolasas, reductasas, deshidrogenasas, UDP-glucuronosiltransferasas de oxidasas, S- transferasas de glutatión, así como otras enzimas relevantes podrían ser ejecutadas para identificar a estas moléculas enlazadoras que son propensas para coordinar a estas enzimas metabólicas. Inhibidores son fácilmente seleccionados debido a su afinidad enlazadora, pero los sustratos necesitan por lo menos que la afinidad micromolar sea identificada.

**[0304]** Otra sección interesante de este invento es la posibilidad de seleccionar directamente a moléculas que se transportan activamente o pasivamente a través de la membrana de plasma epitelial, u otras membranas. Un ensayo posible de selección es el utilizar células de CaCO-2, una línea celular epitelial del Colón humano, que es, en general, aceptada como un buen modelo de la barrera epitelial en los intestinos gastrointestinales. El ensayo de CaCO-2 involucra cultivar una línea celular epitelial de Colón humano en inserciones de pozos de cultivos celulares, para que la monocapa resultante forme una barrera biológica entre compartimientos apicales y basolaterales. Las bibliotecas de moléculas que presentan a plantillas son colocadas en cualquier lado de la monocapa celular y las moléculas que pueden impregnarse a la monocapa celular son recolectadas y amplificadas. Este proceso puede ser repetido hasta que moléculas activas hayan sido identificadas. Otra línea celular o configuración de este ensayo es posible y es obvio para personas con conocimiento en la industria.

**[0305]** Otro aspecto adicional de este invento describe métodos de selección para la estabilidad de moléculas seleccionadas. Esto podría realizarse al exponer a una agrupación enriquecida de moléculas enlazadoras a un entorno en el que es posible degradar a o cambiar a la estructura de las moléculas enlazadoras. Varias condiciones

podrían ser ciertas proteasas o una mezcla de proteasas, extractos celulares y varios fluidos de, por ejemplo, los intestinos. Otras condiciones podrían ser medios salinos o ácidos o temperaturas elevadas. Otra posibilidad es generar una biblioteca de ligandos conocidos y exponer a la biblioteca a pruebas de estabilidad y de selección para identificar moléculas estables bajo ciertas condiciones tal como se describió anteriormente.

5

#### Aplicaciones terapéuticas

**[0306]** Las aplicaciones terapéuticas potenciales del invento son grandiosas. Por ejemplo, la tecnología de moléculas que presenta a plantillas del invento podría ser utilizada para bloquear o estimular a varios objetivos. Un objetivo terapéuticamente relevante es un sustrato que es conocido o que se sospecha que está involucrado en un proceso regulatorio que está funcionando erróneamente y, por lo tanto, conlleva a un estado de enfermedad. Ejemplos de aquellos procesos son la interacción de receptores-ligandos, la interacción de transcripción-ADN, y la interacción célula-célula que involucra a moléculas de adhesión, la interacción co-factor-enzima, y la interacción proteína-proteína en señalización intracelular. La molécula objetivo significa cualquier compuesto de interés para el cual un ligando de molécula es deseado. Por lo tanto, el objetivo puede, por ejemplo, incluir a un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una formación de compuestos que se encuentran separados, una macromolécula biológica, tal como ADN o ARNm, una biblioteca de presentación de péptidos bacteriófagos, una biblioteca de presentación de péptidos de ribosomas, un extracto hecho de materiales biológicos tales como células de bacterias, plantas, hongos o animales (por ejemplo, mamíferos) o tejidos, proteínas, proteínas de fusión, péptidos, enzimas, receptores, ligandos receptores, hormonas, antígenos, anticuerpos, medicamentos, colorantes, factores de crecimiento, lípidos, sustratos, toxinas, virus o similares, etcétera, sin limitaciones. Otros ejemplos de objetivos incluyen, por ejemplo, una célula completa, un tejido completo, una mezcla de proteínas relacionadas o no relacionadas, una mezcla de virus o hebras de bacterias o similares, etcétera, sin limitaciones.

**[0307]** Objetivos de medicamentos terapéuticos pueden ser divididos en diferentes clases de acuerdo a la función; receptores, enzimas, hormonas, factores de transcripción, canales iónicos, receptores nucleares, ADN, (Drews, J. (2000) Science (Ciencia) 287:1960-1964). Entre aquellos, receptores, receptores nucleares, y enzimas metabólicas constituyen la mayoría de objetivos conocidos para los medicamentos existentes. Especialmente, los Receptores Acoplados a la Proteína G (GPCR - G Protein-Coupled Receptors) constituye una de las clases más importantes de objetivos de medicamentos junto con las proteasas para intervenciones farmacológicas. Aunque los ejemplos que se acaban de mencionar están enfocados en la mayoría de objetivos relevantes, es evidente para una persona con conocimiento en la industria que cualquiera de los objetivos terapéuticos puede ser de interés.

**[0308]** Este invento que utiliza a la tecnología de moléculas que presentan a plantillas puede ser utilizado para identificar agonistas o antagonistas para todas estas clases de objetivos de medicamentos, dependiendo de las propiedades específicas que cada objetivo mantiene. La mayoría de los objetivos pueden obtenerse en una forma purificada para procedimientos directos de selección. Otros objetivos han sido utilizados cuando ellos están en sus entornos naturales tales como receptores superficiales de células impregnadas. En aquellas situaciones puede realizarse la selección utilizando a bibliotecas de moléculas que presentan a plantillas utilizando la selección-sustracción descrita anteriormente.

**[0309]** Una aplicación específica de la tecnología de moléculas que presentan a plantillas del invento es el generar moléculas que pueden funcionar como antagonistas, donde las moléculas bloquean la interacción entre un receptor y uno o más ligandos. Otra aplicación incluye la dirección a células. Por ejemplo, las moléculas generadas reconocen a proteínas o a receptores superficiales específicos y se enlazarán con ciertos tipos de células. Aquellas moléculas pueden, adicionalmente, portar otro agente terapéutico para incrementar la potencia y reducir los efectos colaterales (por ejemplo, tratamiento del cáncer). Aplicaciones que involucran a agentes antivirales también son incluidas. Por ejemplo, una molécula generada que, que se enlaza firmemente a epítopes en la partícula virus, podría ser útil como un agente antiviral. Otra aplicación específica de la tecnología de moléculas que presentan a plantillas del invento es generar moléculas que pueden funcionar como agonistas, donde las moléculas simulan o activan a un receptor para iniciar un sendero de señalización celular.

#### Formaciones de moléculas que presentan a plantillas

**[0310]** Otro aspecto adicional de este invento se refiere a métodos para detectar la presencia o ausencia de, y/o medir el monto de moléculas objetivos en una muestra, que utiliza a un ligando molecular que puede ser aislado por medio de los métodos aquí descritos. Estos ligandos moleculares pueden ser utilizados por separado o en un sistema de formaciones para determinaciones múltiples.

**[0311]** Una comprensión de las estructuras proteínicas, de las interacciones proteína - proteína, de los senderos y como las proteínas influyen los orígenes de enfermedades es de vital importancia. Microformaciones de ácidos nucleicos han permitido a investigadores estudiar a nuevos biomarcadores a través de genotipados. Sin embargo, un obstáculo importante es la falta de correlación entre la expresión genética a nivel de ARNm y el monto de proteínas correspondientes expresadas dentro de la célula (Andersson et al. (1997) Electrophoresis (Electroforesis) 18: 533-537). En contraste con los análisis de ADN y de ARN, el uso de chips biológicos para estudios de la función proteínica en paralelo ha sido mucho más difícil. A diferencia de las reacciones de hibridación, que se basan en acoplamiento o interacciones de secuencias lineares, las interacciones proteínicas involucran a superficies de

65

polipéptidos que surgen de secuencias de aminoácidos dobladas de 3D. El requerimiento para la preparación de proteínas dobladas de 3D complica sustancialmente la fabricación de microformaciones proteínicas. Las microformaciones proteínicas serían muy sensibles y, pueden ser degradadas fácilmente por medio del uso de tratamientos térmicos y químicos fuertes. Además, las interacciones de proteínas plegadas tienen una dependencia mucho más fuerte en secuencias en comparación con las reacciones de hibridación utilizadas en los chips biológicos de ADN/ ARN. La dependencia secuencial de las interacciones proteínicas complicará aún más a la cinética de la reacción.

**[0312]** El invento aquí descrito suministra una posible solución para elaborar formaciones que pueden medir montos diferentes a nivel proteínico sin el uso de proteínas o péptidos como moléculas de detección. La tecnología de moléculas que presentan a plantillas podría ser utilizada para identificar a moléculas pequeñas enlazadoras de numerosos objetivos. Estas moléculas enlazadoras podrían, entonces, formarse en posiciones específicas y trabajar como moléculas de detección para medir el monto de varios marcadores biológicos. Por ejemplo, la molécula enlazadora de citoquinas o enzimas conocida por estar involucrada en un sendero específico podría ser generada con la tecnología descrita. Estas moléculas enlazadoras podrían ser ubicadas en un formato de formación para ser utilizadas para medir el monto absoluto o relativo de cada citoquinas o enzima.

**[0313]** Una ventaja importante de este sistema es que la tecnología de localización utilizada para formaciones de ADN podría ser aplicada idénticamente para este sistema. Las moléculas presentadas por plantillas pudrían ser aplicadas directamente a ADN localizado. Otra posibilidad es que la síntesis podría ser realizada directamente en la plantilla pre-cubierta utilizando una polimerasa y análogos de nucleótidos. La fabricación de microformaciones localizables con esta tecnología conllevará a una deposición de alto caudal de miles de moléculas funcionales diferentes en sus ubicaciones diferentes en un chip. El principio general es mostrado en la figura 40.

**[0314]** La tecnología de moléculas que presentan a plantillas no es limitada químicamente a los 20 aminoácidos que ocurren naturalmente. Esto permitirá la síntesis de la plantilla de moléculas más robustas y más estables que se enlazarán a varios objetivos. Estas moléculas más estables serán más adecuadas para inmovilizarse en una superficie y exponerse a cualquier condición dura tal como el calor, el pH bajo o alto de varios detergentes, etcétera. Adicionalmente, la vida útil de las formaciones será mucho más larga que las de las formaciones hechas de proteínas.

#### Herramientas biológicas moleculares

**[0315]** La reacción en cadena de polimerasas (PCR - Polymerase chain reaction) es un método de ejemplo para amplificar a los ácidos nucleicos. Descripciones de métodos PCR pueden ser encontrados en Saiki et al. (1985) Science (Ciencia) 230: 1350-1354; Scharf et al. (1986) Science (Ciencia) 233: 1076-1078; patente de Estados Unidos 4,683,202 (Mullis et al.). Métodos alternos de amplificación incluyen, entre otros, a clonaciones de ADNs seleccionando a vectores apropiados y la introducción de aquellos vectores en organismos anfitriones donde los vectores y los ADNs clonados son replicados y por lo tanto amplificados (Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 1874-1878). En general, cualquier sistema que permita una amplificación fidedigna y eficiente de secuencias seleccionadas de ácidos nucleicos puede ser utilizada en el método de este invento. Sólo es necesario que las representaciones proporcionales de las secuencias después de la amplificación reflejen las proporciones relativas de las secuencias en la mezcla antes de su amplificación.

**[0316]** Las variaciones de plantillas de este invento pueden ser producidas por cualquier método adecuado conocido en la industria. Aquellos métodos incluían construir una secuencia de nucleótidos por medio de síntesis química o una combinación de síntesis química y tecnología de recombinación de ADN.

**[0317]** Una secuencia de nucleótidos que codifica a una variación de una plantilla del invento podría construirse al aislar o sintetizar a una secuencia de nucleótidos que codifica a las moléculas apropiadas de presentación y entonces cambiar la secuencia de nucleótidos para efectuar la introducción (es decir, la inserción o sustitución) o remoción (es decir, la eliminación o sustitución) de las entidades funcionales relevantes de las moléculas presentadas.

**[0318]** La secuencia de nucleótidos que corresponde a las moléculas de la plantilla es modificada convenientemente por medio de mutagénesis dirigida a sitios de acuerdo con los métodos convencionales. Alternamente, la secuencia de nucleótidos es preparada por medio de síntesis química, por ejemplo, al utilizar un sintetizador de oligonucleótidos, donde los oligonucleótidos son diseñados basándose en la secuencia de las plantillas deseadas. Por ejemplo, codificaciones de oligonucleótidos pequeños para porciones de la plantilla deseada podrían ser sintetizados y ensamblados por medio de PCR, ligación o una reacción de ligación en cadena (LCR - ligation chain reaction) (Barany, PNAS 88:189-193, 1991). Los oligonucleótidos individuales comúnmente contienen proyecciones de 5' o 3' para un ensamblaje complementario.

**[0319]** Métodos alternos de modificación secuencial de nucleótidos están disponibles para producir variaciones de plantillas para exámenes o selecciones de alto caudal. Por ejemplo, métodos que involucran a cruces homólogos tales como aquellos descritos en US 5,093,257, y métodos que involucran a la mezcla aleatoria genética, es decir, recombinación entre 2 o más secuencias homólogas de nucleótidos que resultan en secuencias de

oligonucleótidos nuevos que tienen varias alteraciones de nucleótidos en comparación con las secuencias iniciales de nucleótidos. La mezcla aleatoria genética (también conocido como mezcla aleatoria de ADN) involucra uno o más ciclos de fragmentación y re-ensamblaje aleatorio de las secuencias de nucleótidos, seguidos por la selección de moléculas que presentan variaciones de codificaciones secuenciales de plantillas de nucleótidos con las propiedades deseadas.

**[0320]** Ejemplos de métodos adecuados de mezcla aleatoria genética in vivo son presentados por Stemmer et al. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América; vol. 91, pp. 10747-10751; Stemmer (1994), Nature (Naturaleza), vol. 370, pp. 389-391; Smith (1994), Nature (Naturaleza) vol. 370, pp. 324-325; Zhao et al., Nat. Biotechnol. 1998, Mar; 16(3): 258-61; Zhao H. y Arnold, FB, Nucleic Acids Research (Investigación de Ácidos Nucleicos), 1997, Vol. 25. No. 6 pp. 1307-1308; Shao et al., Nucleic Acids Research (Investigación de Ácidos Nucleicos) 1998, Enero 15; 26(2): pp. 681-83; y WO 95/17413.

**[0321]** La mezcla aleatoria sintética involucra suministrar bibliotecas de oligonucleótidos sintéticos superpuestos que se basa en, por ejemplo, una secuencia que flanquea. Los oligonucleótidos generados sintéticamente son recombinados, y las secuencias de ácidos nucleicos recombinantes resultantes son examinadas y si se deseease utilizadas para más ciclos de mezclas aleatorias.

**[0322]** La recombinación puede ser calculada teóricamente, lo cual es realizado o modelado utilizando un sistema informático, evitando, por lo tanto, parcialmente o completamente la necesidad de manipular físicamente a los ácidos nucleicos.

**[0323]** Una vez ensamblada (por medio de síntesis, mutagénesis dirigida a sitios, mezcla aleatoria de ADN u otro método), la secuencia de nucleótidos que codifica a las plantillas es utilizada para generar las bibliotecas que muestran a la plantilla.

**[0324]** Otros aspectos adicionales de este invento describen una composición farmacéutica que comprende la conjugación de la variación del invento, así como métodos para producir y utilizar las conjugaciones y variantes del invento.

**[0325]** El término "afinidad" es utilizado en este documento como un término cualitativo para describir la interacción de la molécula objetivo. Una medida cuantitativa para la afinidad es expresada a través de la constante de asociación ( $K_A$ ). La constante de asociación y la constante de disociación están relacionadas entre sí por medio de la ecuación  $KD = 1/K_A$ . Evidentemente, una alta afinidad corresponde a una constante de disociación más baja. El término "enlazarse a un objetivo específico" se refiere a que las moléculas enlazadoras obtenidas con la tecnología de moléculas que presentan a plantillas se enlazan a un objetivo escogido para que una respuesta medible sea obtenida cuando se pruebe en un ensayo de enlaces o de funciones adecuado. En este contexto, el término "agente terapéutico" tiene la intención de referirse a cualquier material que comprende a una sustancia o antígeno biológicamente o farmacéuticamente activo; el término incluye a sustancias que tienen utilidad para el tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos que afectan a animales y humanos, o en la regulación de cualquier condición fisiológica animal o humana y también incluye cualquier compuesto o composición biológicamente activa que, cuando se administra en un monto efectivo, tiene un efecto en las células u organismos vivos.

**[0326]** Después de la construcción de bibliotecas presentadas por plantillas, las moléculas que presentan a plantillas que tienen a los ligandos deseados pueden ser capturadas utilizando el protocolo que se muestra más adelante. Pozos de 2 coberturas de 2 placas de microtitulación de fondo plano con alrededor de 1  $\mu$ g de estreptavidina en un amortiguador TBS. Se incuban durante la noche a 4 °C. Se remueve la solución de estreptavidina y se lavan los pozos por lo menos 6 veces con TBS. Inmediatamente se agrega un 2% de BSA para bloquear los pozos e incubarse por alrededor de 30 minutos a 37 °C. Se lava la placa con el amortiguador de TBS por lo menos 3 veces. Se agrega alrededor 0.1 microgramos de la molécula objetivo biotinada (la biotinación puede realizarse tal como se describió en la literatura) a uno de los pozos (se utiliza el otro como un control de 2º plano) y se incuba durante alrededor de 30 minutos a 20 °C y luego se remueve el exceso al lavarse con un amortiguador de TBS por lo menos 6 veces. Se bloquea a las moléculas libres de estreptavidina con 1 mM de biotina durante 5 minutos y se lava el exceso y se lo separa con un amortiguador de TBS por lo menos 6 veces. Se agrega entonces la biblioteca de moléculas que presentan a la plantilla a ambos pozos y se permite que se enlacen al incubarse a 20 °C durante alrededor de una hora. Se lavan los pozos con amortiguador de TBS por lo menos 6 veces para remover a las moléculas que presentan a las plantillas que no coordinan hacia la molécula objetivo inmovilizada. Se eluye a las moléculas que presentan a plantillas coordinadas utilizando una condición que remueve a las moléculas enlazadoras. En ciclos posteriores de selección, se compara el número de moléculas eluidas entre los pozos con y sin la molécula objetivo para asegurarse que existen más moléculas que presentan a plantillas eluidas en el pozo con el objetivo. Eso asegurará que haya un enriquecimiento específico en el proceso de selección. Otros tipos y numerosas variaciones de procedimientos de selección pueden encontrarse en la literatura (por ejemplo, "Phage display: A laboratory manual" ("Presentación de Fagos: Un Manual de Laboratorio") (2001) Barbas et al., Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York),

**[0327]** Una alternativa a la captura anterior es, después de la construcción de las bibliotecas presentadas por la

plantilla, el capturar a las moléculas que presentan a la plantilla que tienen los ligandos deseados que usan el protocolo que se describe más adelante. La selección de las moléculas que presentan a la plantilla puede realizarse utilizando una organización celular activada magnéticamente (Siegel et al. (1997) J. Immunol. Methods (Métodos) 206: 73-85). Las células positivas (células con el antígeno de interés) son biotinadas utilizando sulfo-NHS-LC-biotina (Pierce). Se agrega aproximadamente  $10^6$  células biotinadas a  $10 \mu\text{l}$  de estreptavidina – micro esferas paramagnéticas cubiertas por estreptavidina (Dyna) y permitiendo a los enlaces. Se agrega aproximadamente  $10^8$  células negativas (células sin el antígeno de interés). Estas células negativas actúan como un pozo para moléculas no específicas que presentan a plantillas, y las células objetivo capturan a las moléculas que presentan a plantillas específicas. Se pone en peletes a la mezcla celular, se desecha el sobrenadante y se coloca en la suspensión de la biblioteca que presenta a la plantilla. Se incuba durante alrededor de 2 horas a  $37^\circ\text{C}$  en un centrifugador para mantener a las células en la suspensión. Se carga a la solución de la biblioteca que presenta a las células/plantilla en una columna magnética para recuperar a las células positivas al lavar y separar a todas las células negativas. Finalmente, se eluye a las células positivas al remover el campo magnético y amplificar a las plantillas eluidas utilizando PCR. Este protocolo de selección puede ser repetido varias veces si fuese necesario.

### **Amplificación de plantillas capaces de modelar la síntesis de moléculas modeladas**

**[0328]** En un aspecto, este invento se refiere a métodos para amplificar a moléculas modeladas que podrían o no podrían estar enlazadas a un objetivo. La opción del método de amplificación depende de la opción de codificación o de elementos complementarios. Los oligonucleótidos naturales pueden ser amplificados por medio de cualquier método de última tecnología. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a la reacción en cadena de polimerasas (PCR- polymerase chain reaction); así como, por ejemplo, amplificaciones que se basan en secuencias de ácidos nucleicos (por ejemplo, Compton, Nature (Naturaleza) 350, 91-92 (1991)), ARN antisentido amplificado (por ejemplo, van Gelder et al., PNAS 85: 77652-77656 (1988)); sistemas de replicación secuenciales auto - sostenidos (por ejemplo, Gnatelli et al., PNAS 87: 1874-1878 (1990)); amplificaciones independientes de polimerasas tal como se describió en, por ejemplo, Schmidt et al., NAR 25: 4797-4802 (1997), así como amplificaciones in vivo de plásmidos que portan a fragmentos de ADN clonados. Los métodos de amplificación mediados por ligasas también puede ser utilizados, por ejemplo, LCR (Reacción en Cadena de Ligasas - Ligase Chain Reaction).

**[0329]** Para nucleótidos no naturales las opciones de procedimientos de amplificación eficientes son más pocas. Puesto que los nucleótidos no naturales por definición pueden ser incorporados por ciertas enzimas incluyendo las polimerasas, será posible realizar reacciones en cadena de polimerasas en una forma manual al agregar la polimerasa durante cada ciclo de extensión.

**[0330]** Para los oligonucleótidos que contienen a análogos de nucleótidos, existen más pocos métodos de amplificación. Una persona podría utilizar esquemas de amplificación mediados por enzimas (Schmidt et al., NAR 25: 4797-4802 (1997)). Para análogos de nucleótidos modificados estructuralmente tales como PNA y LNA, este método de aplicación podría ser utilizado. Antes o durante la amplificación, o plantillas complementarias podrían ser mutadas o recombinadas para crear una diversidad más grande para la siguiente ronda de selección o de examinación.

### **Caracterización de polímeros aislados por las elecciones o por los ensayos de examinación**

**[0331]** Después de la ronda final de selección, a menudo es deseable secuenciar las plantillas individuales, para determinar la secuencia de los polímeros modelados individuales. Si la plantilla contiene nucleótidos naturales, es una rutina normal el amplificar opcionalmente por medio de PCR a las plantillas aisladas (si la plantilla es una molécula de ARN, es necesario utilizar transcriptasas reversas para producir a la ADNc antes de la aplicación por medio de PCR), y luego clonar a los fragmentos de ADN, por ejemplo, los plásmidos, transformar estos y luego secuenciar los clones individuales de plásmidos que contengan una o varias secuencias de ADN conjuntamente. En este caso, es práctico diseñar un lugar de restricción en las secuencias que flanquean a la secuencia aleatoria o parcialmente aleatoria central de la plantilla (es decir, en los lugares enlazadores de los cebos). Esto permite a una clonación fácil de los nucleótidos aislados. Se puede realizar una secuenciación por medio del método de terminación estándar en cadena de dideoxis, o por medios más clásicos tales como la secuenciación de MaxamGilbert.

**[0332]** Si la plantilla contiene nucleótidos no naturales, no es factible clonar a secuencias individuales por medio de transferencias a través de un anfitrión microbiano. Sin embargo, la utilización de poblaciones de microesferas en las cuales cada microesfera porta una secuencia de oligonucleótidos, hace posible que se pueda hacer donaciones in vitro, donde todos los nucleótidos adheridos a una microesfera específica podrían ser amplificados opcionalmente y entonces secuenciados (Brenner et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América 97, 1665-1670). Alternamente, una persona podría diluir la población de aislamientos adecuadamente, y luego dividirlos en placas de microtitulación para que los pozos, en promedio, contengan, por ejemplo, 0.1 plantillas. Al amplificar las plantillas individuales por medio de, por ejemplo, PCR, ahora será posible secuenciar utilizando métodos estándar. Desde luego, esto requiere que nucleótidos que no son naturales sean sustratos para las polimerasas termoestables utilizadas en el PCR.

5 **[0333]** Sí métodos alternativos son utilizados que requieren a oligonucleótidos más cortos, podría ser deseable diseñar a la plantilla inicial para que contenga lugares de restricción en cada lado de la región codificadora/moderadora de la plantilla. Por lo tanto, después de una ronda final de selección, las plantillas pueden ser restringidas, para obtener un oligonucleótido más corto que codifique al polímero modelado, y entonces estos oligos cortos pueden ser aplicados a varios procedimientos analíticos.

**[0334]** También es posible secuenciar a los aislamientos mediante el uso de una formación de ADN de óligos con secuencias aleatorias pero predeterminadas.

10 **[0335]** También podría ser deseable secuenciar a la población de aislamientos en forma de una agrupación, por ejemplo, si se espera que las secuencias estén en un registro, por ejemplo, puesto que la biblioteca inicial consistió de una secuencia degenerada que se basa en una secuencia de polímeros con una actividad deseada conocida (relativamente alta). Por lo tanto, se espera entonces que todos los aislamientos tengan secuencias similares a la secuencia inicial de las plantillas antes de la selección. Por lo tanto, la población de aislamientos puede ser  
15 secuenciada como una sola unidad, para obtener una secuencia de consenso para la población como un todo.

### Moléculas modeladas

20 **[0336]** Una lista no exhaustiva y no limitante de oligómeros que podrían ser modelados por los varios principios descritos en este invento se listan a continuación:

- alfa-beta-gama- y omega-péptidos
- péptidos mono-, di- y tr- sustituidos
- péptidos de forma L- y D-
- 25 beta-péptidos modificados de estructura ciclohexano- y ciclopentano-
- polipéptidos vinílogos
- glicopolipéptidos
- poliamidas
- péptidos vinílogos de sulfonamidas
- 30 Polisulfonamidas
- péptidos conjugados (es decir, que tienen grupos prostéticos)
- poliésteres
- polisacáridos
- Policarbamatos
- 35 policarbonatos
- Poliureas
- poli-peptidilfosfonatos
- Azatidas
- peptoides (glicinas oligo N-sustituidas)
- 40 Poliéteres
- oligómeros etoxiformacetales
- poli-tioéteres
- polietilenglicoles (PEG)
- polietilenos
- 45 Polidisulfuros
- sulfuros de poliarileno
- polinucleótidos
- PNAs
- LNAs
- 50 Morfolinos
- Oligo-pirrolinonas
- polioximas
- Poliiminas
- Polietileneiminas
- 55 poliacetatos
- polietirenos
- poliacetilenos
- polivinilos
- lípidos
- 60 fosfolípidos
- glicolípidos
- policiclos (alifáticos)
- policiclos (aromáticos)
- poliheterociclos
- 65 Proteoglicanos
- Polisiloxanos

Poliisocianidas  
 Poliisocianatos  
 Polimetacrilatos

- 5 hidrocarburos de cadenas abiertas monofuncionales, difuncionales, trifuncionales y oligofuncionales  
 carbociclos no aromáticos monofuncionales, difuncionales, trifuncionales y oligofuncionales  
 hidocarbonos monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos y policíclicos  
 hidocarbonos policíclicos conectados  
 heterociclos no aromáticos monofuncionales, difuncionales, trifuncionales y oligofuncionales  
 10 heterociclos monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos y policíclicos  
 heterociclos policíclicos conectados  
 carbociclos aromáticos monofuncionales, difuncionales, trifuncionales y oligofuncionales  
 Carbociclos aromáticos monocíclicos, bicíclicos, Tricíclicos y Policíclicos  
 heterociclos aromáticos monofuncionales, difuncionales, trifuncionales y oligofuncionales  
 15 heterociclos monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos y policíclicos  
 quelatos  
 Fullerenos.  
 Cualquier combinación de lo antes mencionado.

20 **[0337]** La lista se refiere a cualquier estructura linear, ramificada o cíclica que contiene uno o más de las estructuras esenciales listadas, y/o contiene algunos enlaces del mismo tipo (por ejemplo, enlaces de amidas). También se pueden modelar heteropolímeros (híbridos de diferentes tipos de polímeros) por este invento.

25 **[0338]** A continuación se presenta una tabla que declara los polímeros producibles de acuerdo a este invento, así como las entidades funcionales/grupos reactivos requeridos para elaborarlos. CAC una referencia a la figura relevante:

Polímero	Entidad funcional (grupos reactivos)	Molécula enlazadora	Catalizador/reactivo	Figura general	Figura específica
Compuesto policíclico	di- cumarina		Luz	Figura 11	Figura 11, ejemplo 1
Poliéster	Alcohol, ácido carboxílico		carbodiimida	Figura 12, figura 21	
Poliéster	Hidroxilo, tioéster			Figura 14	
Poliurea	Di-amina	carbonildiimidazol		Figura 15	Figura 15, ejemplo 3
Poliacetato	halógeno, ácido carboxílico		Base	figura 12, figura 22	
Poliacetato	Alcohol, ácido carboxílico		EDC u otra carbodiimida	Figura 12, figura 22	
Policarbamato	Alcohol, isocianato			Figura 12, figura 22	
Policarbonato	diol	carbonildiimidazol		Figura 15	
Peptide	Amina secundaria, $\alpha$ -haloacetilo			Figura 12, figura 22	
	Amina primaria, $\alpha$ -haloacetilo		Agente alquilante	Figura 12, figura 22	
Glicógeno	UDP-glucosa		Sintetasa de glicógeno	Figura 12, figura 22	
Polisacárido	Sacáridos activados por UDP		Sintetasas de polisacáridos	Figura 12, figura 22	
Polisacárido	sistema de activación de sulfuro/sulfóxido de glucósilo		Condiciones de Kahne	Figura 12, figura 22	

Poliamida	amina, éster de N-hidroxisuccimida		Carbodiimida	Figura 12, figura 22	Figura 15, ejemplo 2
Poliamida	amina, ácido carboxílico		Carbodiimida	Figura 12, figura 22	
Poliamida	di-amina	ácido di-carboxílico	Carbodiimida	Figura 15	
Poliamida	ácido di-carboxílico	di-amina	Carbodiimida	Figura 15	
Poliamida	amina, ácido carboxílico	amina, ácido carboxílico	Carbodiimida	Figura 17	
$\alpha$ -Polipéptido	Carboxianhídrido (anillo de 5 miembros)			Figura 19	
$\beta$ -polipéptido	Carboxianhídrido (anillo de 6 miembros)			Figura 19	Figura 19, ejemplo 1
$\gamma$ -polipéptido	Carboxianhídrido (anillo de 7 miembros)			Figura 19	
$\alpha$ -polipéptido	2,2-difeniltiacinanona (anillo de 5 miembros)			Figura 19	
$\beta$ -polipéptido	2,2-difeniltiacinanona (anillo de 6 miembros)			Figura 19	Figura 19, ejemplo 2
$\gamma$ -polipéptido	2,2-difeniltiacinanona (anillo de 7 miembros)			Figura 19	
$\alpha$ -Polipéptido	Amina, tioéster			Figura 14	
$\beta$ -polipéptido	Amina, tioéster			Figura 14	Figura 14, ejemplo 1
$\gamma$ -polipéptido	Amina, tioéster			Figura 14	
$\omega$ -polipéptido	Amina, tioéster			Figura 14	
polisulfonamida	Amina, ácido sulfónico		Carbodiimida	Figura 12, figura 22	
polifosfonato	Di-alcohol	Fosfonato activado		Figura 15	
polifosfonato	Di-alcohol	alquilfosfina activada	Reactivo oxidante, por ejemplo, terc-butilhidroperóxido	Figura 15	
Poli fosfato	Di-alcohol	Diaminoalcoxi-fosfina	Reactivo oxidante, por ejemplo, terc-butilhidroperóxido	Figura 15	
polifosfodiéster	diol	Diaminofosfina	Oxidante (ButOOH)	Figura 15	Figura 15, ejemplo 5
polifosfodiéster	diaminofosfina	diol	Oxidante (ButOOH)	Figura 15	Figura 15, ejemplo 6
poliuretano	diamina	diisocianato		Figura 15	
Poliéter	Epóxido			Figura 19	Figura 18, ejemplo 3

Polioéter	tioepóxido			Figura 19	
Polidisulfuro	Tiol, tiol		Oxidante	Figura 11	
Polioxima	Aldehído, hidroxilamina			Figura 12, figura 22	
Poliimina	Aldehído, amina			Figura 12, figura 22	
Poliimina	Aldehído, amina			Figura 15	Figura 15, ejemplo 1
Polinucleótidos	Nucleósido-5'-fosforo-2-metilimidazolidos			Figura 12, figura 22	
Poliaminas	Amina, sulfonato de alquilo			Figura 14	Figura 14, ejemplo 2
Alcano	Alqueno			Figura 18	Figura 18, ejemplo 1
Alcano	alqueno			Figura 18	Figura 18, ejemplo 2
Policicloalcano	di-dieno	Di-alqueno (benzoquinona)		Figura 15	Figura 15, ejemplo 7
Polivinilo	unidad de vinilcloruro			Figura 18	
Poliestireno	unidad de estireno		Iniciador radical, AIBN	Figura 18	
Polietileno	unidad de etileno			Figura 18	figura 18, ejemplo 1

### Plantillas

- 5 **[0339]** En una sección, la molécula modelada es enlazada por medio de un solo enlazador a la plantilla complementaria o a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada. En otra sección, el método para modular a una molécula modelada comprende el paso adicional de liberar a la plantilla o plantilla complementaria que modelo a la molécula modelada, y obtener una molécula modelada que no está enlazada a la plantilla complementaria o a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada.
- 10 **[0340]** La plantilla comprende preferiblemente n elementos codificadores en una secuencia lineal. La plantilla que comprende a n elementos codificadores también puede ser ramificada. N tiene preferiblemente un valor de desde 2 a 200, por ejemplo desde 2 a 100, así como desde 2 a 80, por ejemplo desde 2 a 60, tal como desde 2 a 40, por ejemplo desde 2 a 30, tal como desde 2 a 20, por ejemplo desde 2 a 15, tal como desde 2 a 10, tal como desde 2 a 8, por ejemplo desde 2 a 6, tal como desde 2 a 4, por ejemplo 2, tal como desde 3 a 100, por ejemplo desde 3 a 80, tal como desde 3 a 60, tal como desde 3 a 40, por ejemplo desde 3 a 30, tal como desde 3 a 20, tal como desde 3 a 15, por ejemplo desde 3 a 15, tal como desde 3 a 10, tal como desde 3 a 8, por ejemplo desde 3 a 6, tal como desde 3 a 4, por ejemplo 3, tal como desde 4 a 100, por ejemplo desde 4 a 80, tal como desde 4 a 60, tal como desde 4 a 40, por ejemplo desde 4 a 30, tal como desde 4 a 20, tal como desde 4 a 15, por ejemplo desde 4 a 10, tal como desde 4 a 8, tal como desde 4 a 6, por ejemplo 4, por ejemplo desde 5 a 100, tal como desde 5 a 80, por ejemplo desde 5 a 60, tal como desde 5 a 40, por ejemplo desde 5 a 30, tal como desde 5 a 20, por ejemplo, desde 5 a 15, tal como desde 5 a 10, tal como desde 5 a 8, por ejemplo desde 5 a 6, por ejemplo 5, tal como desde 6 a 100, por ejemplo desde 6 a 80, tal como desde 6 a 60, tal como desde 6 a 40, por ejemplo desde 6 a 30, tal como desde 6 a 20, tal como desde 6 a 15, por ejemplo desde 6 a 10, tal como desde 6 a 8, tal como 6, por ejemplo desde 7 a 100, tal como desde 7 a 80, por ejemplo desde 7 a 60, tal como desde 7 a 40, por ejemplo desde 7 a 30, tal como desde 7 a 20, por ejemplo desde 7 a 15, tal como desde 7 a 10, tal como desde 7 a 8, por ejemplo 7, por ejemplo desde 8 a 100, tal como desde 8 a 80, por ejemplo desde 8 a 60, tal como desde 8 a 40, por ejemplo desde 8 a 30, tal como desde 8 a 20, por ejemplo desde 8 a 15, tal como desde 8 a 10, tal como 8, por ejemplo 9, por ejemplo desde 10 a 100, tal como desde 10 a 80, por ejemplo desde 10 a 60, tal como desde 10 a 40, por ejemplo desde 10 a 30, tal

como desde 10 a 20, por ejemplo desde 10 a 15, tal como desde 10 a 12, tal como 10, por ejemplo desde 12 a 100, tal como desde 12 a 80, por ejemplo desde 12 a 60, tal como desde 12 a 40, por ejemplo desde 12 a 30, tal como desde 12 a 20, por ejemplo desde 12 a 15, tal como desde 14 a 100, tal como desde 14 a 80, por ejemplo desde 14 a 60, tal como desde 14 a 40, por ejemplo desde 14 a 30, tal como desde 14 a 20, por ejemplo desde 14 a 16, tal como desde 16 a 100, tal como desde 16 a 80, por ejemplo desde 16 a 60, tal como desde 16 a 40, por ejemplo desde 16 a 30, tal como desde 16 a 20, tal como desde 18 a 100, tal como desde 18 a 80, por ejemplo desde 18 a 60, tal como desde 18 a 40, por ejemplo desde 18 a 30, tal como desde 18 a 20, por ejemplo desde 20 a 100, tal como desde 20 a 80, por ejemplo desde 20 a 60, tal como desde 20 a 40, por ejemplo desde 20 a 30, tal como desde 20 a 25, por ejemplo desde 22 a 100, tal como desde 22 a 80, por ejemplo desde 22 a 60, tal como desde 22 a 40, por ejemplo desde 22 a 30, tal como desde 22 a 25, por ejemplo desde 25 a 100, tal como desde 25 a 80, por ejemplo desde 25 a 60, tal como desde 25 a 40, por ejemplo desde 25 a 30, tal como desde 30 a 100, por ejemplo desde 30 a 80, tal como desde 30 a 60, por ejemplo desde 30 a 40, tal como desde 30 a 35, por ejemplo desde 35 a 100, tal como desde 35 a 80, por ejemplo desde 35 a 60, tal como desde 35 a 40, por ejemplo, desde 40 a 100, tal como desde 40 a 80, por ejemplo desde 40 a 60, tal como desde 40 a 50, por ejemplo desde 40 a 45, tal como desde 45 a 100, por ejemplo desde 45 a 80, tal como desde 45 a 60, por ejemplo desde 45 a 50, tal como desde 50 a 100, por ejemplo desde 50 a 80, tal como desde 50 a 60, por ejemplo desde 50 a 55, tal como desde 60 a 100, por ejemplo desde 60 a 80, tal como desde 60 a 70, por ejemplo desde 70 a 100, tal como desde 70 a 90, por ejemplo desde 70 a 80, tal como desde 80 a 100, por ejemplo desde 80 a 90, tal como desde 90 a 100.

20 **[0341]** En algunas secciones del invento es preferido que la plantilla esté adherida a un soporte sólido o semisólido.

25 **[0342]** La plantilla en una sección preferiblemente comprende o consiste esencialmente de nucleótidos seleccionados de un grupo que consiste de secuencias de ácidos deoxirribonucleicos (ADN), ácidos ribonucleicos (ARN), ácidos nucleicos de péptidos (PNA - peptide nucleic acids), ácidos nucleicos bloqueados (LNA - locked nucleic acids), y morfolinos, incluyendo cualquiera de sus análogos o derivados.

30 **[0343]** En otra sección, la plantilla de elementos codificadores comprende o consiste esencialmente de nucleótidos seleccionados de un grupo que consiste de secuencias de ADN, ARN, PNA, LNA y de morfolinos, incluyendo cualquiera de sus análogos o derivados, y el elemento complementario preferiblemente comprende o consiste esencialmente de nucleótidos seleccionados de un grupo que consiste de secuencias de ADN, ARN, PNA, LNA y de morfolinos, incluyendo a sus análogos o derivados.

35 **[0344]** Es preferido en varias secciones del invento que la plantilla pueda ser caracterizada por una o más de las siguientes características: i) que la plantilla sea amplificarle, ii) que la plantilla comprenda una sola hebra de elementos codificadores, preferiblemente una sola hebra de elementos codificadores capaces de formar una doble hélice por medio de hibridación a una plantilla complementaria que comprende a una sola hebra de elementos complementarios, y ii) que la plantilla comprenda un lugar cebado.

#### 40 **Elementos codificadores**

45 **[0345]** Cada elemento codificador es enlazado preferiblemente a un elemento codificador cercano por medio de un enlace químico covalente. Cada elemento codificador también puede estar enlazado a cada elemento codificador cercano por medio de un enlace químico covalente. El enlace químico covalente es preferiblemente seleccionado de un grupo de enlaces covalentes que consisten de enlaces de fosfodiésteres, enlaces de fosfotioatos, y enlaces de péptidos. Más preferiblemente, el enlace químico covalente es seleccionado de un grupo de enlaces covalentes que consisten de enlaces de fosfodiésteres y enlaces de fosfotioatos.

50 **[0346]** En secciones importantes, por lo menos un elemento codificador está adherido a un soporte sólido o semisólido.

55 **[0347]** Los elementos codificadores son seleccionados en una sección del invento de un grupo que consiste de nucleótidos, incluyendo sus análogos o derivados, aminoácidos, anticuerpos y antígenos, y preferiblemente de un grupo que consiste de nucleótidos, derivados de nucleótidos, análogos de nucleótidos, incluyendo cualquiera de sus combinaciones. En otra sección, los elementos codificadores son seleccionados de grupo que consiste de nucleótidos, incluyendo nucleótidos tales como ácidos deoxirribonucleicos que comprenden una base seleccionada de adenina (A), timina (T), guanina (G), y citosina (C), y ácidos ribonucleicos que comprenden a una base seleccionada de adenina (A), uracilo (U), guanina (G) y citosina (C). Además, en este caso, cada una puede ser un nucleótido enlazado a un nucleótido cercano por medio de un enlace covalente, o enlazado a cada nucleótido cercano por medio de un enlace covalente. El enlace covalente es preferiblemente un enlace de fosfodiéster o un enlace de fosfotioato.

60 **[0348]** En otras secciones, los elementos codificadores son nucleótidos naturales y no naturales seleccionados de un grupo que consiste de ácidos deoxirribonucleicos y ácidos ribonucleicos.

65 **Elementos codificadores y los elementos complementarios correspondientes**

5 [0349] Cuando los elementos codificadores son seleccionados preferiblemente de un grupo que consiste de nucleótidos, derivados de nucleótidos y análogos de nucleótidos en los cuales una o más de las partículas bases y/o de las partículas de fosfatos y/o de las partículas de ribosas o de las partículas de deoxirribosas han sido sustituidas por una entidad molecular alterna, los elementos complementarios correspondientes son capaces de interactuar con dichos elementos codificadores y preferiblemente comprenden o consisten esencialmente de nucleótidos seleccionados de un grupo que consiste de secuencias de ADN, ARN, PNA, LNA y morfolinos, incluyendo a cualquiera de sus análogos o derivados. Cada nucleótido está enlazado a nucleótidos cercanos por medio de un enlace único covalente, o enlazados a cada nucleótido cercano por medio de un enlace químico covalente. El enlace químico covalente es seleccionado preferiblemente de un grupo de enlaces covalentes que consiste de enlaces de fosfodiésteres y enlaces de péptidos.

#### Subunidades de los elementos codificadores

15 [0350] Los elementos codificadores en una sección comprenden o consisten esencialmente de desde 1 a 100 subunidades, tal como desde 1 a 80 subunidades, por ejemplo desde 1 a 60 subunidades, tal como desde 1 a 40 subunidades, por ejemplo desde 1 a 20 subunidades, tal como desde 1 a 18 subunidades, por ejemplo desde 1 a 16 subunidades, tal como desde 1 a 14 subunidades, por ejemplo desde 1 a 12 subunidades, tal como desde 1 a 10 subunidades, por ejemplo desde 1 a 9 subunidades, tal como desde 1 a 8 subunidades, por ejemplo desde 1 a 7 subunidades, tal como desde 1 a 6 subunidades, por ejemplo desde 1 a 5 subunidades, tal como desde 1 a 4 subunidades, por ejemplo desde 1 a 3 subunidades, tal como desde 1 a 2 subunidades, por ejemplo 1 subunidad, tal como desde 2 a 100 subunidades, tal como desde 2 a 80 subunidades, por ejemplo desde 2 a 60 subunidades, tal como desde 2 a 40 subunidades, por ejemplo desde 2 a 20 subunidades, tal como desde 2 a 18 subunidades, por ejemplo desde 2 a 16 subunidades, tal como desde 2 a 14 subunidades, por ejemplo desde 2 a 12 subunidades, tal como desde 2 a 10 subunidades, por ejemplo desde 2 a 9 subunidades, tal como desde 2 a 8 subunidades, por ejemplo desde 2 a 7 subunidades, tal como desde 2 a 6 subunidades, por ejemplo desde 2 a 5 subunidades, tal como desde 2 a 4 subunidades, por ejemplo desde 2 a 3 subunidades, tal como 2 subunidades, tal como desde 3 a 100 subunidades, tal como desde 3 a 80 subunidades, por ejemplo desde 3 a 60 subunidades, tal como desde 3 a 40 subunidades, por ejemplo desde 3 a 20 subunidades, tal como desde 3 a 18 subunidades, por ejemplo desde 3 a 16 subunidades, tal como desde 3 a 14 subunidades, por ejemplo desde 3 a 12 subunidades, tal como desde 3 a 10 subunidades, por ejemplo desde 3 a 9 subunidades, tal como desde 3 a 8 subunidades, por ejemplo desde 3 a 7 subunidades, tal como desde 3 a 6 subunidades, por ejemplo desde 3 a 5 subunidades, tal como desde 3 a 4 subunidades, por ejemplo 3 subunidades, por ejemplo desde 4 a 100 subunidades, tal como desde 4 a 80 subunidades, por ejemplo desde 4 a 60 subunidades, tal como desde 4 a 40 subunidades, por ejemplo desde 4 a 20 subunidades, tal como desde 4 a 18 subunidades, por ejemplo desde 4 a 16 subunidades, tal como desde 4 a 14 subunidades, por ejemplo desde 4 a 12 subunidades, tal como desde 4 a 10 subunidades, por ejemplo desde 4 a 9 subunidades, tal como desde 4 a 8 subunidades, por ejemplo desde 4 a 7 subunidades, tal como desde 4 a 6 subunidades, por ejemplo desde 4 a 5 subunidades, por ejemplo 4 subunidades, tal como desde 5 a 100 subunidades, tal como desde 5 a 80 subunidades, por ejemplo desde 5 a 60 subunidades, tal como desde 5 a 40 subunidades, por ejemplo desde 5 a 20 subunidades, tal como desde 5 a 18 subunidades, por ejemplo desde 5 a 16 subunidades, tal como desde 5 a 14 subunidades, por ejemplo desde 5 a 12 subunidades, tal como desde 5 a 10 subunidades, por ejemplo desde 5 a 9 subunidades, tal como desde 5 a 8 subunidades, por ejemplo desde 5 a 7 subunidades, tal como desde 5 a 6 subunidades, tal como 5 subunidades, por ejemplo desde 6 a 100 subunidades, tal como desde 6 a 80 subunidades, por ejemplo desde 6 a 60 subunidades, tal como desde 6 a 40 subunidades, por ejemplo desde 6 a 20 subunidades, tal como desde 6 a 18 subunidades, por ejemplo desde 6 a 16 subunidades, tal como desde 6 a 14 subunidades, por ejemplo desde 6 a 12 subunidades, tal como desde 6 a 10 subunidades, por ejemplo desde 6 a 9 subunidades, tal como desde 6 a 8 subunidades, por ejemplo desde 6 a 7 subunidades, tal como 6 subunidades, tal como desde 7 a 100 subunidades, tal como desde 7 a 80 subunidades, por ejemplo desde 7 a 60 subunidades, tal como desde 7 a 40 subunidades, por ejemplo desde 7 a 20 subunidades, tal como desde 7 a 18 subunidades, por ejemplo desde 7 a 16 subunidades, tal como desde 7 a 14 subunidades, por ejemplo desde 7 a 12 subunidades, tal como desde 7 a 10 subunidades, por ejemplo desde 7 a 9 subunidades, tal como desde 7 a 8 subunidades, tal como desde 7 subunidades, por ejemplo desde 8 a 100 subunidades, tal como desde 8 a 80 subunidades, por ejemplo desde 8 a 60 subunidades, tal como desde 8 a 40 subunidades, por ejemplo desde 8 a 20 subunidades, tal como desde 8 a 18 subunidades, por ejemplo desde 8 a 16 subunidades, tal como desde 8 a 14 subunidades, por ejemplo desde 8 a 12 subunidades, tal como desde 8 a 10 subunidades, por ejemplo desde 8 a 9 subunidades, por ejemplo 8 subunidades, tal como desde 9 a 100 subunidades, tal como desde 9 a 80 subunidades, por ejemplo desde 9 a 60 subunidades, tal como desde 9 a 40 subunidades, por ejemplo desde 9 a 20 subunidades, tal como desde 9 a 18 subunidades, por ejemplo desde 9 a 16 subunidades, tal como desde 9 a 14 subunidades, por ejemplo desde 9 a 12 subunidades, tal como desde 9 a 10 subunidades, tal como 9 subunidades, por ejemplo desde 10 a 100 subunidades, tal como desde 10 a 80 subunidades, por ejemplo desde 10 a 60 subunidades, tal como desde 10 a 40 subunidades, por ejemplo desde 10 a 20 subunidades, tal como desde 10 a 18 subunidades, por ejemplo desde 10 a 16 subunidades, tal como desde 10 a 14 subunidades, por ejemplo desde 10 a 12 subunidades, tal como 10 subunidades, tal como desde 11 a 100 subunidades, tal como desde 11 a 80 subunidades, por ejemplo desde 11 a 60 subunidades, tal como desde 11 a 40 subunidades, por ejemplo desde 11 a 20 subunidades, tal como desde 11 a 18 subunidades, por ejemplo desde 11 a 16 subunidades, tal como desde 11 a 14 subunidades, por ejemplo desde 11 a 12 subunidades, tal como desde 12 a 100 subunidades, tal como desde 12 a 80 subunidades, por ejemplo desde 12 a 60 subunidades, tal como desde 12 a 40 subunidades, por ejemplo desde 12 a 20 subunidades, tal como desde 12 a 18 subunidades, por ejemplo desde 12 a 16 subunidades, tal como desde 12 a 14 subunidades, por

ejemplo desde 13 a 100 subunidades, tal como desde 13 a 80 subunidades, por ejemplo desde 13 a 60 subunidades, tal como desde 13 a 40 subunidades, por ejemplo desde 13 a 20 subunidades, tal como desde 13 a 18 subunidades, por ejemplo desde 13 a 16 subunidades, tal como desde 13 a 14 subunidades, por ejemplo desde 14 a 100 subunidades, tal como desde 14 a 80 subunidades, por ejemplo desde 14 a 60 subunidades, tal como desde 14 a 40 subunidades, por ejemplo desde 14 a 20 subunidades, tal como desde 14 a 18 subunidades, por ejemplo desde 14 a 16 subunidades, tal como desde 15 a 100 subunidades, tal como desde 15 a 80 subunidades, por ejemplo desde 15 a 60 subunidades, tal como desde 15 a 40 subunidades, por ejemplo desde 15 a 20 subunidades, tal como desde 15 a 18 subunidades, por ejemplo desde 15 a 16 subunidades, tal como desde 16 a 100 subunidades, tal como desde 16 a 80 subunidades, por ejemplo desde 16 a 60 subunidades, tal como desde 16 a 40 subunidades, por ejemplo desde 16 a 20 subunidades, tal como desde 16 a 18 subunidades, por ejemplo desde 17 a 100 subunidades, tal como desde 17 a 80 subunidades, por ejemplo desde 17 a 60 subunidades, tal como desde 17 a 40 subunidades, por ejemplo desde 17 a 20 subunidades, tal como desde 17 a 18 subunidades, por ejemplo desde 18 a 100 subunidades, tal como desde 18 a 80 subunidades, por ejemplo desde 18 a 60 subunidades, tal como desde 18 a 40 subunidades, por ejemplo desde 18 a 20 subunidades, tal como desde 19 a 100 subunidades, tal como desde 19 a 80 subunidades, por ejemplo desde 19 a 60 subunidades, tal como desde 19 a 40 subunidades, por ejemplo desde 19 a 30 subunidades, tal como desde 19 a 25 subunidades, por ejemplo desde 20 a 100 subunidades, tal como desde 20 a 80 subunidades, por ejemplo desde 20 a 60 subunidades, tal como desde 20 a 40 subunidades, por ejemplo desde 20 a 30 subunidades, tal como desde 20 a 25 subunidades.

**[0351]** En secciones preferidas, cada subunidad de los elementos codificadores comprende o consiste esencialmente de un nucleótido, o un análogo de nucleótido. El nucleótido puede ser un ácido deoxirribonucleico que comprende a una base seleccionada de adenina (A), timina (T), guanina (G), y citosina (C), o puede ser un ácido ribonucleico que comprende a una base seleccionada de adenina (A), uracilo (U), guanina (G), y citosina (C). Cada nucleótido está enlazado a un nucleótido, o análogo de nucleótido cercano por medio de un enlace covalente, o enlazado a cada nucleótido o análogo de nucleótido cercano por medio de un enlace covalente incluyendo enlaces covalentes seleccionados de un grupo que consiste de enlaces de fosfodiésteres, enlaces de fosforotioatos, y enlaces de péptidos.

**[0352]** En una sección, es preferido que por lo menos algunos de los nucleótidos mencionados sean seleccionados de un grupo que consiste de derivados de nucleótidos, incluyendo derivados de ácidos deoxirribonucleicos y derivados de ácidos ribonucleicos.

#### **Subunidades de los elementos codificadores y las subunidades de elementos complementarios correspondientes**

**[0353]** Las unidades de elementos codificadores son seleccionadas preferiblemente de un grupo que consiste de nucleótidos, derivados de nucleótidos y análogos de nucleótidos en donde una o más de una partícula base y/o una partícula de fosfato y/o una partícula de ribosa y/o una partícula de deoxirribosa ha sido sustituida por una entidad molecular alternativa y las subunidades de los elementos complementarios correspondientes son capaces de interactuar con dichas subunidades de los elementos codificadores que comprenden o consisten esencialmente de nucleótidos seleccionados de un grupo que consiste de secuencias de ADN, ARN, PNA, LNA y morfollinos, incluyendo cualquiera de sus análogos o derivados.

**[0354]** Cada derivado de nucleótidos puede ser enlazado a un nucleótido o análogo de nucleótido cercano por medio de un enlace químico covalente, o cada derivado de nucleótido puede ser enlazado a cada nucleótido o análogo de nucleótido cercano por medio de un enlace químico covalente. El enlace químico covalente es preferiblemente seleccionado grupo de enlaces covalentes que consiste de enlaces de fosfodiésteres, enlaces de fosforotioatos, y enlaces de péptidos.

#### **Elementos complementarios**

**[0355]** La plantilla complementaria en una sección comprende preferiblemente n elementos complementarios en una secuencia lineal o en una secuencia ramificada. n preferiblemente tiene un valor de desde 2 a 200, por ejemplo desde 2 a 100, tal como desde 2 a 80, por ejemplo desde 2 a 60, tal como desde 2 a 40, por ejemplo desde 2 a 30, tal como desde 2 a 20, por ejemplo desde 2 a 15, tal como desde 2 a 10, tal como desde 2 a 8, por ejemplo desde 2 a 6, tal como desde 2 a 4, tal como 2, tal como desde 3 a 100, por ejemplo desde 3 a 80, tal como desde 3 a 60, tal como desde 3 a 40, por ejemplo desde 3 a 30, tal como desde 3 a 20, tal como desde 3 a 15, por ejemplo desde 3 a 10, tal como desde 3 a 8, por ejemplo desde 3 a 6, tal como desde 3 a 4, por ejemplo 3, tal como desde 4 a 100, por ejemplo desde 4 a 80, tal como desde 4 a 60, tal como desde 4 a 40, por ejemplo desde 4 a 30, tal como desde 4 a 20, tal como desde 4 a 15, por ejemplo desde 4 a 10, tal como desde 4 a 8, tal como desde 4 a 6, tal como 4, por ejemplo desde 5 a 100, por ejemplo desde 5 a 80, por ejemplo desde 5 a 60, tal como desde 5 a 40, por ejemplo desde 5 a 30, tal como desde 5 a 20, por ejemplo desde 5 a 15, tal como desde 5 a 10, tal como desde 5 a 8, por ejemplo desde 5 a 6, por ejemplo 5, tal como desde 6 a 100, por ejemplo desde 6 a 80, tal como desde 6 a 60, tal como desde 6 a 40, por ejemplo desde 6 a 30, tal como desde 6 a 20, tal como desde 6 a 15, por ejemplo desde 6 a 10, tal como desde 6 a 8, tal como 6, por ejemplo desde 7 a 100, tal como desde 7 a 80, por ejemplo desde 7 a 60, tal como desde 7 a 40, por ejemplo desde 7 a 30, tal como desde 7 a 20, por ejemplo desde 7

a 15, tal como desde 7 a 10, tal como desde 7 a 8, tal como 7, por ejemplo desde 8 a 100, tal como desde 8 a 80, por ejemplo desde 8 a 60, tal como desde 8 a 40, por ejemplo desde 8 a 30, tal como desde 8 a 20, por ejemplo desde 8 a 15, tal como desde 8 a 10, por ejemplo 8, tal como 9, por ejemplo desde 10 a 100, tal como desde 10 a 80, por ejemplo desde 10 a 60, tal como desde 10 a 40, por ejemplo desde 10 a 30, tal como desde 10 a 20, por ejemplo desde 10 a 15, tal como desde 10 a 12, tal como 10, por ejemplo desde 12 a 100, tal como desde 12 a 80, por ejemplo desde 12 a 60, tal como desde 12 a 40, por ejemplo desde 12 a 30, tal como desde 12 a 20, por ejemplo desde 12 a 15, tal como desde 14 a 100, tal como desde 14 a 80, por ejemplo desde 14 a 60, tal como desde 14 a 40, por ejemplo desde 14 a 30, tal como desde 14 a 20, por ejemplo desde 14 a 16, tal como de 16 a 100, tal como desde 16 a 80, por ejemplo desde 16 a 60, tal como desde 16 a 40, por ejemplo desde 16 a 30, tal como desde 16 a 20, tal como desde 18 a 100, tal como desde 18 a 80, por ejemplo desde 18 a 60, tal como desde 18 a 40, por ejemplo desde 18 a 30, tal como desde 18 a 20, por ejemplo desde 20 a 100, tal como desde 20 a 80, por ejemplo desde 20 a 60, tal como desde 20 a 40, por ejemplo desde 20 a 30, tal como desde 20 a 25, por ejemplo desde 22 a 100, tal como desde 22 a 80, por ejemplo desde 22 a 60, tal como desde 22 a 40, por ejemplo desde 22 a 30, tal como desde 22 a 25, por ejemplo desde 25 a 100, tal como desde 25 a 80, por ejemplo desde 25 a 60, tal como desde 25 a 40, por ejemplo desde 25 a 30, tal como desde 30 a 100, por ejemplo desde 30 a 80, tal como desde 30 a 60, por ejemplo desde 30 a 40, tal como desde 30 a 35, por ejemplo desde 35 a 100, por ejemplo desde 35 a 80, por ejemplo desde 35 a 60, tal como desde 35 a 40, por ejemplo desde 40 a 100, tal como desde 40 a 80, por ejemplo desde 40 a 60, tal como desde 40 a 50, por ejemplo desde 40 a 35, tal como desde 45 a 100, por ejemplo desde 45 a 80, tal como desde 45 a 60, por ejemplo desde 45 a 50, tal como desde 50 a 100, por ejemplo desde 50 a 80, tal como desde 50 a 60, por ejemplo desde 50 a 55, tal como desde 60 a 100, por ejemplo desde 60 a 80, tal como desde 60 a 70, por ejemplo desde 70 a 100, tal como desde 70 a 90, por ejemplo desde 70 a 80, tal como desde 80 a 100, por ejemplo desde 80 a 90, tal como desde 90 a 100.

**[0356]** Cada nucleótido puede ser enlazado a un nucleótido o un análogo de nucleótido cercano, por medio de un enlace covalente, o enlazado a cada nucleótido o análogo de nucleótido cercano, por medio de un enlace químico covalente. El enlace químico covalente es seleccionado preferiblemente de un grupo de enlaces covalentes que consisten de enlaces de fosfodiésteres, enlaces de fosforotioatos, y enlaces de péptidos.

**[0357]** Los elementos complementarios son, en una sección, seleccionados de nucleótidos, y los elementos complementarios pueden estar, en una sección importante, enlazados en forma enzimática por medio de una enzima seleccionada de un grupo que consiste de polimerasas de ADN y de ARN que dependen de la plantilla, incluyendo a transcriptasas reversas, ligasas de ADN y ligasas de ARN, ribozimas y deoxirribozimas, incluyendo a la transcriptasa reversa de VIH-1, la transcriptasa reversa de AMV, la polimerasa de ARN de T7, la polimerasa mutante Y639F de ARN de t7, la Secuenasa, la polimerasa de ADN de Taq, el fragmento de Klenow (un fragmento grande de la polimerasa I de ADN), la ligasa de ADN, la polimerasa de ADN de T7, la polimerasa de ADN de T4, la ligasa de ADN de T4, la polimerasa de ARN de E. Coli, la polimerasa de ADN de rTh, la polimerasa de ADN de Vent, la polimerasa de ADN de Pfu, la polimerasa de ADN de Tte, y ribozimas con ligasas o actividades de replicasas.

**[0358]** Más preferiblemente, la enzima es seleccionada de un grupo que consiste de una transcriptasa reversa de VIH-1, una transcriptasa reversa de AMV, una polimerasa de ARN de T7, una polimerasa mutante Y639F de ARN de T7, una Secuenasa, una polimerasa de ADN de Taq, un fragmento de Klenow (un fragmento grande de la polimerasa I de ADN), una ligasa de ADN, una polimerasa de ADN de T7, una polimerasa de ADN de T4, y una Ligasa de ADN de T4. Los nucleótidos son preferiblemente de una plantilla o plantilla complementaria en el momento de su incorporación.

**[0359]** En otra sección, los elementos complementarios pueden ser seleccionados de nucleótidos, y enlazados utilizando un agente químico, un cambio de pH, luz, un catalizador, radiación, tal como radiación electromagnética, o por medio de un acoplamiento espontáneo cuando se juntan en contacto reactivo entre sí.

**[0360]** Cada elemento complementario es enlazado preferiblemente a un elemento complementario cercano por medio de un enlace químico covalente, o enlazado a cada elemento complementario por medio de un enlace químico covalente. El enlace químico covalente es, en una sección, seleccionado de un grupo de enlaces covalentes que consiste de enlaces de fosfodiésteres, enlaces de fosforotioatos, y enlaces de péptidos. En otras secciones, el grupo de enlaces covalentes consiste de enlaces de fosfodiésteres y enlaces de fosforotioatos.

**[0361]** En secciones preferidas, cada subunidad comprende o consiste esencialmente de un nucleótido, o un análogo de nucleótido. El nucleótido puede ser un ácido deoxirribonucleico conformado una base seleccionada de adenina (A), timina (T), guanina (G), y citosina (C), o un ácido ribonucleico que comprende a una base seleccionada de adenina (A), uracilo (U), guanina (G) y citosina (C).

**[0362]** Cada uno de los nucleótidos mencionados pueden enlazarse a un nucleótido, o análogo de nucleótido cercano, por medio de un enlace covalente, o vinculado a cada nucleótido o análogo de nucleótido cercano, por medio de un enlace covalente. El enlace covalente es seleccionado preferiblemente de un grupo que consiste de enlaces de fosfodiésteres, enlaces de fosforotioatos y enlaces de péptidos.

**[0363]** Es preferido en una sección que por lo menos algunos de los nucleótidos mencionados sean seleccionados de un grupo que consiste de derivados de nucleótidos, incluyendo derivados de nucleótidos seleccionados de un

grupo que consiste de derivados de ácidos deoxirribonucleicos y derivados de ácidos ribonucleicos.

[0364] En otra sección, los elementos complementarios son nucleótidos naturales o no naturales seleccionados de un grupo que consiste de ácidos deoxirribonucleicos y ácidos ribonucleicos.

5

#### Elementos complementarios y sus elementos codificadores correspondientes

[0365] Cuando los elementos complementarios seleccionados de un grupo que consiste de nucleótidos, derivados de nucleótidos y análogos de nucleótidos en los cuales una o más de una partícula base y/o una partícula de fosfato y/o una ribosa y/o una partícula de deoxirribosa ha sido sustituida por una entidad molecular alterna, los elementos codificadores capaces de interactuar con dicho elemento complementario comprenden o consisten esencialmente de nucleótidos seleccionados de un grupo que consiste de secuencias de ADN, ARN, PNA,, LNA y morfolinos, incluyendo cualquiera de sus análogos o derivados.

10

[0366] Cada nucleótido puede ser enlazado a un nucleótido o análogo de nucleótido cercano por medio de un enlace único covalente o enlazado a cada nucleótido o análogo de nucleótido cercano por medio de un enlace químico covalente. El enlace químico covalente es seleccionado preferiblemente de un grupo de enlaces covalentes que consiste de enlaces de fosfodiéster, enlaces de fosforotioatos y enlaces de péptidos.

15

[0367] Los elementos complementarios son seleccionados, en una sección, de nucleótidos y los elementos complementarios pueden, en una sección importante, ser enlazados enzimáticamente al usar a una enzima seleccionada de un grupo que consiste de polimerasas de ADN y de ARN que dependen de plantillas, incluyendo a transcriptasas reversas, ligasas de ADN y ligasas de ARN, ribozimas y deoxirribozimas, incluyendo la transcriptasa reversa del VIH-1, la transcriptasa reversa de AMV, la polimerasa de ARN de T7, la polimerasa mutante Y639F de ARN de T7, la Secuenasa, la polimerasa de ADN de Taq, el fragmento de Klenow (un fragmento grande de la polimerasa I de ADN), la ligasa de ADN, la polimerasa de ADN de T7, la polimerasa de ADN de T4, la ligasa de ADN de T4, la polimerasa de ARN de E coli, la polimerasa de ADN de rTh, la polimerasa de ADN de Wnet, la polimerasa de ADN de Pfu, la polimerasa de ADN de Tte, y ribozimas con actividades de ribasas y replicasas.

20

25

[0368] La enzima seleccionada de un grupo que consiste más preferiblemente de la enzima es seleccionada de un grupo que consiste de transcriptasa reversa de VIH-1, transcriptasa reversa de AMV, polimerasa de ARN de T7, polimerasa mutante Y639F de ARN de T7, Secuenasa, polimerasa de ADN de Taq, fragmento de Klenow (un fragmento grande de la polimerasa I de ADN), ligasa de ADN, polimerasa de ADN de T7, polimerasa de ADN de T4, y ligasa de ADN de T4. Los nucleótidos forman, preferiblemente, una plantilla o plantilla complementaria en el momento de la incorporación.

30

35

[0369] En otra sección, los elementos complementarios pueden ser seleccionados de nucleótidos, y pueden ser enlazados al utilizar un agente químico, un cambio de pH, luz, un catalizador, radiación, tal como radiación electromagnética, o por medio de acoplamientos espontáneos cuando se los pone en contacto reactivo entre sí.

40

#### Subunidades de elementos complementarios

[0370] El elemento complementario es conformado o consiste esencialmente, preferiblemente, de desde 1 a 100 subunidades, tal como desde 1 a 80 subunidades, por ejemplo desde 1 a 60 subunidades, tal como desde 1 a 40 subunidades, por ejemplo desde 1 a 20 subunidades, tal como desde 1 a 18 subunidades, por ejemplo desde 1 a 16 subunidades, tal como desde 1 a 14 subunidades, por ejemplo desde 1 a 12 subunidades, tal como desde 1 a 10 subunidades, por ejemplo desde 1 a 9 subunidades, tal como desde 1 a 8 subunidades, por ejemplo desde 1 a 7 subunidades, tal como desde 1 a 6 subunidades, por ejemplo desde 1 a 5 subunidades, tal como desde 1 a 4 subunidades, por ejemplo desde 1 a 3 subunidades, tal como desde 1 a 2 subunidades, por ejemplo 1 subunidad, tal como desde 2 a 100 subunidades, tal como desde 2 a 80 subunidades, por ejemplo desde 2 a 60 subunidades, tal como desde 2 a 40 subunidades, por ejemplo desde 2 a 20 subunidades, tal como desde 2 a 18 subunidades, por ejemplo desde 2 a 16 subunidades, tal como desde 2 a 14 subunidades, por ejemplo desde 2 a 12 subunidades, tal como desde 2 a 10 subunidades, por ejemplo desde 2 a 9 subunidades, tal como desde 2 a 8 subunidades, por ejemplo desde 2 a 7 subunidades, tal como desde 2 a 6 subunidades, por ejemplo desde 2 a 5 subunidades, tal como desde 2 a 4 subunidades, por ejemplo desde 2 a 3 subunidades, tal como desde 2 a 3 subunidades, tal como desde 3 a 100 subunidades, tal como desde 3 a 80 subunidades, por ejemplo desde 3 a 60 subunidades, tal como desde 3 a 40 subunidades, por ejemplo desde 3 a 20 subunidades, tal como desde 3 a 18 subunidades, por ejemplo desde 3 a 16 subunidades, tal como desde 3 a 14 subunidades, por ejemplo desde 3 a 12 subunidades, tal como desde 3 a 10 subunidades, por ejemplo desde 3 a 9 subunidades, tal como desde 3 a 8 subunidades, por ejemplo desde 3 a 7 subunidades, tal como desde 3 a 6 subunidades, por ejemplo desde 3 a 5 subunidades, tal como desde 3 a 4 subunidades, por ejemplo 3 subunidades, por ejemplo desde 4 a 100 subunidades, tal como desde 4 a 80 subunidades, por ejemplo desde 4 a 60 subunidades, tal como desde 4 a 40 subunidades, por ejemplo desde 4 a 20 subunidades, tal como desde 4 a 18 subunidades, por ejemplo desde 4 a 16 subunidades, tal como desde 4 a 14 subunidades, por ejemplo desde 4 a 12 subunidades, tal como desde 4 a 10 subunidades, por ejemplo desde 4 a 9 subunidades, tal como desde 4 a 8 subunidades, por ejemplo desde 4 a 7 subunidades, tal como desde 4 a 6

45

50

55

60

65

subunidades, por ejemplo desde 4 a 5 subunidades, por ejemplo 4 subunidades, tal como desde 5 a 100 subunidades, tal como desde 5 a 80 subunidades, por ejemplo desde 5 a 60 subunidades, tal como desde 5 a 40 subunidades, por ejemplo desde 5 a 20 subunidades, tal como desde 5 a 18 subunidades, por ejemplo desde 5 a 16 subunidades, tal como desde 5 a 14 subunidades, por ejemplo desde 5 a 12 subunidades, tal como desde 5 a 10 subunidades, por ejemplo desde 5 a 9 subunidades, tal como desde 5 a 8 subunidades, por ejemplo desde 5 a 7 subunidades, tal como desde 5 a 6 subunidades, tal como 5 subunidades, por ejemplo desde 6 a 100 subunidades, tal como desde 6 a 80 subunidades, por ejemplo desde 6 a 60 subunidades, tal como desde 6 a 40 subunidades, por ejemplo desde 6 a 20 subunidades, tal como desde 6 a 18 subunidades, por ejemplo desde 6 a 16 subunidades, tal como desde 6 a 14 subunidades, por ejemplo desde 6 a 12 subunidades, tal como desde 6 a 10 subunidades, por ejemplo desde 6 a 9 subunidades, tal como desde 6 a 8 subunidades, por ejemplo desde 6 a 7 subunidades, tal como 6 subunidades, tal como desde 7 a 100 subunidades, tal como desde 7 a 80 subunidades, por ejemplo desde 7 a 60 subunidades, tal como desde 7 a 40 subunidades, por ejemplo desde 7 a 20 subunidades, tal como desde 7 a 18 subunidades, por ejemplo desde 7 a 16 subunidades, tal como desde 7 a 14 subunidades, por ejemplo desde 7 a 12 subunidades, tal como desde 7 a 10 subunidades, por ejemplo desde 7 a 9 subunidades, tal como desde 7 a 8 subunidades, tal como 7 subunidades, por ejemplo desde 8 a 100 subunidades, tal como desde 8 a 80 subunidades, por ejemplo desde 8 a 60 subunidades, tal como desde 8 a 40 subunidades, por ejemplo desde 8 a 20 subunidades, tal como desde 8 a 18 subunidades, por ejemplo desde 8 a 16 subunidades, tal como desde 8 a 14 subunidades, por ejemplo desde 8 a 12 subunidades, tal como desde 8 a 10 subunidades, por ejemplo desde 8 a 9 subunidades, por ejemplo 8 subunidades, tal como desde 9 a 100 subunidades, tal como desde 9 a 80 subunidades, por ejemplo desde 9 a 60 subunidades, tal como desde 9 a 40 subunidades, por ejemplo desde 9 a 20 subunidades, tal como desde 9 a 18 subunidades, por ejemplo desde 9 a 16 subunidades, tal como desde 9 a 14 subunidades, por ejemplo desde 9 a 12 subunidades, tal como desde 9 a 10 subunidades, tal como 9 subunidades, por ejemplo desde 10 a 100 subunidades, tal como desde 10 a 80 subunidades, por ejemplo desde 10 a 60 subunidades, tal como desde 10 a 40 subunidades, por ejemplo desde 10 a 20 subunidades, tal como desde 10 a 18 subunidades, por ejemplo desde 10 a 16 subunidades, tal como desde 10 a 14 subunidades, por ejemplo desde 10 a 12 subunidades, tal como 10 subunidades, tal como desde 11 a 100 subunidades, tal como desde 11 a 80 subunidades, por ejemplo desde 11 a 60 subunidades, tal como desde 11 a 40 subunidades, por ejemplo desde 11 a 20 subunidades, tal como desde 11 a 18 subunidades, por ejemplo desde 11 a 16 subunidades, tal como desde 11 a 14 subunidades, por ejemplo desde 11 a 12 subunidades, tal como desde 12 a 100 subunidades, tal como desde 12 a 80 subunidades, por ejemplo desde 12 a 60 subunidades, tal como desde 12 a 40 subunidades, por ejemplo desde 12 a 20 subunidades, tal como desde 12 a 18 subunidades, por ejemplo desde 12 a 16 subunidades, tal como desde 12 a 14 subunidades, por ejemplo desde 13 a 100 subunidades, tal como desde 13 a 80 subunidades, por ejemplo desde 13 a 60 subunidades, tal como desde 13 a 40 subunidades, por ejemplo desde 13 a 20 subunidades, tal como desde 13 a 18 subunidades, por ejemplo desde 13 a 16 subunidades, tal como desde 13 a 14 subunidades, por ejemplo desde 14 a 100 subunidades, tal como desde 14 a 80 subunidades, por ejemplo desde 14 a 60 subunidades, tal como desde 14 a 40 subunidades, por ejemplo desde 14 a 20 subunidades, tal como desde 14 a 18 subunidades, por ejemplo desde 14 a 16 subunidades, tal como desde 15 a 100 subunidades, tal como desde 15 a 80 subunidades, por ejemplo desde 15 a 60 subunidades, tal como desde 15 a 40 subunidades, por ejemplo desde 15 a 20 subunidades, tal como desde 15 a 18 subunidades, por ejemplo desde 15 a 16 subunidades, tal como desde 16 a 100 subunidades, tal como desde 16 a 80 subunidades, por ejemplo desde 16 a 60 subunidades, tal como desde 16 a 40 subunidades, por ejemplo desde 16 a 20 subunidades, tal como desde 16 a 18 subunidades, por ejemplo desde 17 a 100 subunidades, tal como desde 17 a 80 subunidades, por ejemplo desde 17 a 60 subunidades, tal como desde 17 a 40 subunidades, por ejemplo desde 17 a 20 subunidades, tal como desde 17 a 18 subunidades, por ejemplo desde 18 a 100 subunidades, tal como desde 18 a 80 subunidades, por ejemplo desde 18 a 60 subunidades, tal como desde 18 a 40 subunidades, por ejemplo desde 18 a 20 subunidades, tal como desde 19 a 100 subunidades, tal como desde 19 a 80 subunidades, por ejemplo desde 19 a 60 subunidades, tal como desde 19 a 40 subunidades, por ejemplo desde 19 a 30 subunidades, tal como desde 19 a 25 subunidades, por ejemplo desde 20 a 100 subunidades, tal como desde 20 a 80 subunidades, por ejemplo desde 20 a 60 subunidades, tal como desde 20 a 40 subunidades, por ejemplo desde 20 a 30 subunidades, tal como desde 20 a 25 subunidades.

**[0371]** En secciones importantes, cada subunidad comprende o consiste esencialmente de un nucleótido o un análogo de nucleótido. El nucleótido puede ser un ácido deoxirribonucleico que comprende a una base seleccionada de adenina (A), timina (T), guanina (G), y citosina (C), o un ácido ribonucleico que comprende una base seleccionada de adenina (A), uracilo (U), guanina (G), y citosina (C)

**[0372]** Cada uno de los nucleótidos mencionados puede ser enlazado a un nucleótido o análogo de nucleótido cercano, por medio de un enlace covalente, o enlazado a cada nucleótido o análogo de nucleótido cercano, por medio de un enlace covalente. El enlace covalente es preferiblemente seleccionado de un grupo que consiste de enlaces de fosfodiésteres, enlaces de fosforotioatos, y enlaces de péptidos.

**[0373]** Es preferido en una sección que por lo menos algunos de dichos nucleótidos sean seleccionados de un grupo que consiste de derivados de nucleótidos, incluyendo derivados de nucleótidos seleccionados de un grupo que consiste de derivados de ácidos deoxirribonucleicos y derivados de ácidos ribonucleicos.

**Subunidades de los elementos complementarios y las subunidades de los elementos codificadores correspondientes**

**[0374]** Cuando las subunidades de elementos complementarios son seleccionadas de un grupo que consiste de nucleótidos, derivados de nucleótidos y análogos de nucleótidos en las cuales una o más partículas base y/o partículas de fosfatos y/o partículas de ribosas y/o partículas de deoxirribosas han sido sustituidas por una entidad molecular alterna, las subunidades de los elementos codificadores que son capaces de interactuar con dichas subunidades de elementos complementarios comprenden o consisten esencialmente, preferiblemente, de nucleótidos seleccionados de un grupo que consiste de secuencias de ADN, ARN, PNA, LNA y de morfolinós, incluyendo a cualquiera de sus análogos o derivados.

**[0375]** Es preferido que cada derivado de nucleótido esté vinculado a un nucleótido o análogo de nucleótido cercano, por medio de un enlace químico covalente, o vinculado a cada nucleótido o análogo de nucleótido cercano, por medio de un enlace químico covalente. El enlace químico covalente puede ser seleccionado de un grupo de enlaces covalentes que consiste de enlaces de fosfodiésteres, enlaces de fosforotioatos y enlaces de péptidos.

### **Bloques de construcción, enlazadores separables y enlazadores selectivamente separables**

**[0376]** En un aspecto se suministra un bloque de construcción comprendido de

i) un elemento complementario capaz de reconocer específicamente a un elemento codificador que tiene un grupo de reconocimiento, donde dicho elemento complementario es seleccionado de nucleótidos, aminoácidos, anticuerpos, antígenos, proteínas, péptidos y moléculas con una capacidad de reconocimiento de nucleótidos.

ii) por lo menos una entidad funcional seleccionada de un precursor de  $\alpha$ -péptidos,  $\beta$ -péptidos,  $\gamma$ -péptidos,  $\omega$ -péptidos;  $\alpha$ -péptidos,  $\beta$ -péptidos,  $\gamma$ -péptidos,  $\omega$ -péptidos mono-, di- y tri- sustituidos, donde los residuos de aminoácidos están en la forma L- o en la forma D-, polipéptidos vinílogos, glicopoli-péptidos, poliamidas, péptidos de sulfonamidas vinílogas, polisulfonamidas, péptidos conjugados que comprenden a, por ejemplo, grupos prostéticos, poliésteres, polisacáridos, policarbamatos, policarbonatos, poliureas, polipeptidilfosfonatos, poliuretanos, azatidas, glicinas óligo N-sustituidas, poliéteres, oligómeros de etoxiformacetal, poli-tioéteres, polietilenglicoles (PEG), polietilenos, polidisulfuros, sulfuros de poliarileno, polinucleótidos, PNAs, LNAs, morfolinós, oligo pirrolidinonas, polioximas, poliiminas, polietileneiminas, poliimididas, poliacetales, poliacetatos, poliestirenos, polivinilos, lípidos, fosfolípidos, glicolípidos, compuestos policíclicos que comprenden a, por ejemplo, ciclos alifáticos o aromáticos, proteoglicanos y polisiloxanos, y

iii) un enlazador o un enlazador selectivamente separable que divide a la entidad funcional del elemento complementario.

**[0377]** El elemento complementario del bloque de construcción es seleccionado preferiblemente de una secuencia de nucleótidos, tal como una secuencia de desde 1 a 8 nucleótidos, tal como desde 1 a 6 nucleótidos, por ejemplo, desde 1 a 4 nucleótidos, tal como desde 1 a 3 nucleótidos, tal como 2 nucleótidos o por ejemplo 3 nucleótidos.

**[0378]** La entidad funcional puede ser seleccionada de un precursor de un aminoácido seleccionado de aminoácidos alfa, aminoácidos beta, aminoácidos gamma, aminoácidos di-sustituidos, aminoácidos poli-sustituidos, aminoácidos vinílogos, derivados de glicina N-sustituidos y otros aminoácidos modificados.

**[0379]** También se suministra una composición de bloques de construcción tal como se define en este documento, donde por lo menos 2 bloques de construcción de la composición son diferentes.

**[0380]** Por lo menos un subconjunto de la pluralidad de bloques de construcción comprende, preferiblemente, un elemento complementario y una entidad funcional y un enlazador.

**[0381]** En una sección, cada bloque de construcción comprende por lo menos un grupo reactivos tipo I y/o por lo menos un grupo reactivo tipo II, incluyendo un grupo reactivo tipo I, 2 grupos reactivos tipo II, un grupo reactivo tipo II, y 2 grupos reactivos tipo II.

**[0382]** Por lo menos uno de dichos grupos reactivos tipo II de la entidad funcional es seleccionada preferiblemente del grupo que consiste de N-carboxianhídrido (NCA), N-tiocarboxianhídrido (NTA), aminas, ácidos carboxílicos, cetonas, aldehídos, hidroxilos, tioles, ésteres, tioésteres, cualquier sistema conjugado de enlaces dobles, hidracinas, ésteres de N-hidroxisuccinimididas y epóxidos.

**[0383]** En algunas secciones, el grupo reactivo tipo II es un electrófilo, un nucleófilo, o un radical.

**[0384]** Por lo menos un subconjunto de dicha pluralidad de bloques de construcción comprende a un separador selectivamente separable que divide a la entidad funcional del elemento complementario, donde dicho enlazador selectivamente separable no es dividido bajo condiciones que resultan en la separación de enlazadores separables que dividen a la entidad funcional del elemento complementario de los bloques de construcción que no pertenecen al subconjunto de bloques de construcción que comprenden a un enlazador selectivamente separable. Los enlazadores separables de los bloques de construcción son separados sin dividir el por lo menos un enlazador selectivamente separable que vincula a la molécula modelada con la plantilla complementaria, o con un elemento complementario, o vinculando a dicha molécula modelada con un elemento modelador, o con la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada.

**[0385]** Los enlazadores y enlazadores selectivamente separables pueden ser divididos con, por ejemplo, ácidos, bases, un agente químico, luz, radiación electromagnética, una enzima, o un catalizador, siempre y cuando la división del enlazador separable resulte en la división del enlazador selectivamente separable a menos que eso se desee.

**[0386]** En una sección, la longitud del enlazador o enlazador selectivamente separable está en el rango de alrededor de 0.8 Å a alrededor de 70 Å, tal como en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 60 Å, por ejemplo en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 50 Å, tal como en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 40 Å, por ejemplo en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 30 Å, tal como en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 25 Å, por ejemplo en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 20 Å, tal como en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 18 Å, por ejemplo en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 16 Å, tal como en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 14 Å, por ejemplo en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 12 Å, tal como en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 10 Å, por ejemplo en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 8 Å, tal como en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 7 Å, por ejemplo en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 6 Å, tal como en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 5 Å, por ejemplo en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 4 Å, tal como en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 3.5 Å, por ejemplo en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 3.0 Å, tal como en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 2.5 Å, por ejemplo en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 2.0 Å, tal como en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 1.5 Å, por ejemplo en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 1.0 Å.

**[0387]** En otra sección, la longitud del enlazador o enlazador selectivamente separable está en el rango de desde alrededor de 1 Å a alrededor de 60 Å, tal como en el rango de desde 1 Å a alrededor de 40 Å, por ejemplo en el rango de desde 1 Å a alrededor de 30 Å, tal como en el rango de desde uno Å a alrededor de 25 Å, por ejemplo en el rango de desde 1 Å a alrededor de 20 Å, tal como en el rango de desde 1 Å a alrededor de 18 Å, por ejemplo en el rango de desde 1 Å a alrededor de 16 Å, tal como en el rango de desde 1 Å a alrededor de 14 Å, por ejemplo en el rango de desde 1 Å a alrededor de 12 Å, tal como en el rango de desde 1 Å a alrededor de 10 Å, por ejemplo en el rango de desde 1 Å a alrededor de 8 Å, tal como en el rango de desde 1 Å a alrededor de 7 Å, por ejemplo en el rango de desde 1 Å a alrededor de 6 Å, tal como en el rango de desde 1 Å a alrededor de 5 Å, tal como en el rango de desde 1 Å a alrededor de 4 Å, tal como en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 3.5 Å, por ejemplo en el rango de desde 1.0 a alrededor de 3.0 Å, tal como en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 2.5 Å, por ejemplo en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 2.0 Å, tal como en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 1.5 Å, por ejemplo en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 1.2 Å.

**[0388]** En otra sección, la longitud del enlazador o del enlazador selectivamente separable está en el rango de desde alrededor de 2 Å a alrededor de 40 Å, tal como en el rango de desde 2 Å a alrededor de 30 Å, tal como en el rango de desde 2 Å a alrededor de 25 Å, por ejemplo en el rango de desde 2 Å a alrededor de 20 Å, tal como en el rango de desde 2 Å a alrededor de 18 Å, por ejemplo en el rango de desde 2 Å a alrededor de 16 Å, tal como en el rango de desde 2 Å a alrededor de 14 Å, por ejemplo en el rango de desde 2 Å a alrededor de 12 Å, tal como en el rango de desde 2 Å a alrededor de 10 Å, por ejemplo en el rango de desde 2 Å a alrededor de 8 Å, al como en el rango de desde 2 Å a alrededor de 7 Å, por ejemplo en el rango de desde 2 Å a alrededor de 6 Å, tal como en el rango de desde 2 Å a alrededor de 5 Å, por ejemplo en el rango de desde 2 Å a alrededor de 4 Å, tal como en el rango de desde 2.0 Å a alrededor de 3.5 Å, por ejemplo en el rango de desde 2.0 Å a alrededor de 3.0 Å, tal como en el rango de desde 2.0 Å a alrededor de 2.5 Å, por ejemplo en el rango de desde 2.0 Å a alrededor de 2.2 Å.

**[0389]** En una sección adicional, el largo del enlazador o del enlazador selectivamente separable está en el rango de desde alrededor de 4 Å a alrededor de 40 Å, tal como en el rango de desde 4 Å a alrededor de 30 Å, tal como en el rango de desde 4 Å a alrededor de 25 Å, por ejemplo en el rango de desde 4 Å a alrededor de 20 Å, tal como en el rango de desde 4 Å a alrededor de 18 Å, por ejemplo en el rango de desde 4 Å a alrededor de 16 Å, tal como en el rango de desde 4 Å a alrededor de 14 Å, por ejemplo en el rango de desde 4 Å a alrededor de 12 Å, tal como en el rango de desde 4 Å a alrededor de 10 Å, por ejemplo en el rango de desde 4 Å a alrededor de 8 Å, tal como en el rango de desde 4 Å a alrededor de 7 Å, por ejemplo en el rango de desde 4 Å a alrededor de 6 Å, tal como en el rango de desde 4 Å a alrededor de 5 Å.

**[0390]** En otra sección adicional, el largo del enlazador o del enlazador selectivamente separable está en el rango de desde alrededor de 6 Å a alrededor de 40 Å, tal como en el rango de desde 6 Å a alrededor de 30 Å, tal como en el rango de desde 6 Å a alrededor de 25 Å, por ejemplo en el rango de desde 6 Å a alrededor de 20 Å, tal como en el rango de desde 6 Å a alrededor de 18 Å, por ejemplo en el rango de desde 6 Å a alrededor de 16 Å, tal como en el rango de desde 6 Å a alrededor de 14 Å, por ejemplo en el rango de desde 6 Å a alrededor de 12 Å, tal como en el rango de desde 6 Å a alrededor de 10 Å, por ejemplo en el rango de desde 6 Å a alrededor de 8 Å, tal como en el rango de desde 6 Å a alrededor de 7 Å.

**[0391]** En otra sección, en largo del enlazador o del enlazador selectivamente separable está en el rango de desde alrededor de 8 Å a alrededor de 40 Å, tal como en el rango de desde 8 Å a alrededor de 30 Å, tal como en el rango de desde 8 Å a alrededor de 25 Å, por ejemplo en el rango de desde 8 Å a alrededor de 20 Å, tal como en el rango de desde 8 Å a alrededor de 18 Å, por ejemplo en el rango de desde 8 Å a alrededor de 16 Å, tal como en el rango de desde 8 Å a alrededor de 14 Å, por ejemplo en el rango de desde 8 Å a alrededor de 12 Å, tal como en el rango

de desde 8 Å a alrededor de 10 Å.

### Moléculas modeladas

- 5 **[0392]** Las moléculas modeladas pueden ser enlazadas- o no enlazadas-a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada.
- 10 **[0393]** En una sección, este invento se refiere a moléculas modeladas que comprenden o que consisten esencialmente de aminoácidos seleccionados de un grupo que consiste de  $\alpha$ -aminoácidos,  $\beta$ - aminoácidos,  $\gamma$ - aminoácidos,  $\omega$ - aminoácidos.
- 15 **[0394]** En varias secciones preferidas, la molécula modelada comprende, o consiste esencialmente, de uno o más residuos de aminoácidos, de  $\alpha$ - aminoácidos, de  $\alpha$ - aminoácidos monosustituídos,  $\alpha$ - aminoácidos di-sustituídos,  $\beta$ - aminoácidos monosustituídos,  $\beta$ - aminoácidos di-sustituídos,  $\beta$ - aminoácidos tri-sustituídos,  $\beta$ - aminoácidos tetra-sustituídos,  $\gamma$ - aminoácidos,  $\omega$ - aminoácidos, aminoácidos vinílogos, y glicinas N-sustituídas.
- 20 **[0395]** Las moléculas modeladas ya mencionadas conformadas de  $\beta$ - aminoácidos preferiblemente tienen una estructura esencial conformada o que consiste esencialmente de una estructura de ciclohexano y/o una estructura de ciclo pentano.
- 25 **[0396]** En otras secciones, la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de moléculas o entidades moleculares seleccionadas de un grupo de  $\alpha$ -péptidos,  $\beta$ -péptidos,  $\gamma$ -péptidos,  $\omega$ -péptidos;  $\alpha$ -péptidos  $\beta$ -péptidos,  $\gamma$ - peptides,  $\omega$ -peptides mono-di- y tri-sustituídos, péptidos donde los residuos de aminoácidos están en la forma L- o en la forma D-, polipéptidos vinílogos, glicopolipéptidos, poliamidas, péptidos vinílogos de sulfonamidas, polisulfonamidas, péptidos conjugados que comprenden a, por ejemplo, grupos prostéticos, poliésteres, polisacáridos, policarbamatos, policarbonatos, poliureas, polipeptidilfosfonatos, poliuretanos, azatidas, glicinas oligo N-sustituídas, poliéteres, oligómeros de etoxiformacetal, poli-tioéteres, polietilenglicoles (PEG), polietilenos, polidisulfuros, sulfuros de poliarileno, polinucleótidos, PNAs, LNAs, morfolinós, oligo pirrolinonas, polioximas, poliiiminas, polietileneiminas, poliimidás, poliacetales, poliacetatos, poliestireno, polivinilos, lípidos, fosfolípidos, glicolípidos, compuestos policíclicos que comprenden a, por ejemplo, ciclos alifáticos o aromáticos, incluyendo a compuestos poliheterocíclicos, proteoglicanos, y polisiloxanos incluyendo cualquiera de sus combinaciones.
- 30 **[0397]** Residuos cercanos de moléculas modeladas de acuerdo al invento pueden enlazarse por medio de un enlace químico seleccionado de un grupo de enlaces químicos que consisten de enlaces de péptidos, enlaces de sulfonamidas, enlaces de ésteres, enlaces de sacáridos, enlaces de carbamatos, enlaces de carbonatos, enlaces de ureas, enlaces de fosfonatos, enlaces de uretanos, enlaces de azatidas, enlaces de peptoides, enlaces de ésteres, enlaces de etoxis, enlaces de tioéteres, enlaces individuales de carbono, enlaces dobles de carbono, enlaces triples de carbono, enlaces de di sulfuros, enlaces de sulfuros, enlaces de fosfodiésteres, enlaces de oximas, enlaces de iminas, enlaces de imidas, incluyendo cualquiera de sus combinaciones.
- 35 **[0398]** Además, las estructuras esencial de las moléculas modeladas de acuerdo al invento puede, en un aspecto, comprender o consistir esencialmente de un grupo molecular seleccionado de -NHN(R)CO-; -NHB(R)CO-; -NHC(RR')CO-; -NHC(=CHR)CO-; -NHC6H4CO-; - NHCH2CHRCO-; -NHCHRCH2CO-; -COCH2-; -COS-; -CONR-; -COO-; -CSNH- ; - CH2 NH-; -CH2CH2-; -CH2 S-; -CH2 SO- ; -CH2SO2-; -CH(CH3)S- ; -CH=CH-; - NHCO-; -NHCONH-; -CONHO-; -C(=CH2)CH2- ; -PO2-NH-; -PO2-CH2-; -PO2-CH2N+-; -SO2NH--; y lactámicos, incluyendo a cualquiera de sus combinaciones.
- 40 **[0399]** En otras secciones del invento, las moléculas modeladas no son de naturaleza polimérica.
- 45 **[0400]** El precursor es, en una sección, seleccionado preferiblemente de un grupo de precursores que consiste de precursores de  $\alpha$ - aminoácidos, precursores de  $\beta$ - aminoácidos, precursores de  $\gamma$ - aminoácidos y precursores de  $\omega$ - aminoácidos.
- 50 **[0401]** En alguna sección, la molécula modelada es un oligómero o un polímero que comprende por lo menos una secuencia repetitiva de grupos funcionales, tal como por lo menos 3 grupos funcionales repetidos por lo menos 2 veces en la molécula modelada. Las moléculas modeladas también incluyen a moléculas donde, cualquier secuencia de por lo menos 3 grupos funcionales ocurren solamente una vez.
- 55 **[0402]** Algunas moléculas modeladas preferidas consisten, preferiblemente, o consisten esencialmente de por lo menos 2 grupos funcionales diferentes, tal como por lo menos 3 grupos funcionales diferentes, por ejemplo por lo menos 4 grupos funcionales diferentes, tal como por lo menos 5 diferentes grupos funcionales, por ejemplo por lo menos 6 grupos funcionales diferentes, tal como por lo menos 7 grupos funcionales diferentes, por ejemplo por lo menos 8 grupos funcionales diferentes, tal como por lo menos 9 grupos funcionales diferentes, por ejemplo por lo menos 10 grupos funcionales diferentes, tal como más de 10 grupos funcionales diferentes. Los grupos funcionales también puede ser idénticos.
- 60
- 65

**[0403]** En un aspecto preferido del invento se suministra una molécula modelada que comprende a un polímero conformado de una pluralidad de grupos funcionales enlazados covalentemente donde cada uno tiene por lo menos un residuo, donde la pluralidad de residuos es preferiblemente desde 2 a 200, por ejemplo desde 2 a 100, tal como desde 2 a 80, por ejemplo desde 2 a 60, tal como desde 2 a 40, por ejemplo desde 2 a 30, tal como desde 2 a 20, por ejemplo desde 2 a 15, tal como desde 2 a 10, tal como desde 2 a 8, por ejemplo desde 2 a 6, tal como desde 2 a 4, por ejemplo 2, tal como desde 3 a 100, por ejemplo desde 3 a 80, tal como desde 3 a 60, tal como desde 3 a 40, por ejemplo desde 3 a 30, tal como desde 3 a 20, tal como desde 3 a 15, por ejemplo desde 3 a 15, tal como desde 3 a 10, tal como desde 3 a 8, por ejemplo desde 3 a 6, tal como desde 3 a 4, por ejemplo 3, tal como desde 4 a 100, por ejemplo desde 4 a 80, tal como desde 4 a 60, tal como desde 4 a 40, por ejemplo desde 4 a 30, tal como desde 4 a 20, tal como desde 4 a 15, por ejemplo desde 4 a 10, tal como desde 4 a 8, tal como desde 4 a 6, por ejemplo 4, por ejemplo desde 5 a 100, tal como desde 5 a 80, por ejemplo desde 5 a 60, tal como desde 5 a 40, por ejemplo desde 5 a 30, tal como desde 5 a 20, por ejemplo desde 5 a 15, tal como desde 5 a 10, tal como desde 5 a 8, por ejemplo desde 5 a 6, por ejemplo 5, tal como desde 6 a 100, por ejemplo desde 6 a 80, tal como desde 6 a 60, tal como desde 6 a 40, por ejemplo desde 6 a 30, tal como desde 6 a 20, tal como desde 6 a 15, por ejemplo desde 6 a 10, tal como desde 6 a 8, por ejemplo 6, por ejemplo desde 7 a 100, tal como desde 7 a 80, por ejemplo desde 7 a 60, tal como desde 7 a 40, por ejemplo desde 7 a 30, tal como desde 7 a 20, por ejemplo desde 7 a 15, tal como desde 7 a 10, tal como desde 7 a 8, por ejemplo 7, por ejemplo desde 8 a 100, tal como desde 8 a 80, por ejemplo desde 8 a 60, tal como desde 8 a 40, por ejemplo desde 8 a 30, tal como desde 8 a 20, por ejemplo desde 8 a 15, tal como desde 8 a 10, tal como desde 8, por ejemplo 9, por ejemplo desde 10 a 100, tal como desde 10 a 80, por ejemplo desde 10 a 60, tal como desde 10 a 40, por ejemplo desde 10 a 30, tal como desde 10 a 20, por ejemplo desde 10 a 15, tal como desde 10 a 12, tal como 10, por ejemplo desde 12 a 100, tal como desde 12 a 80, por ejemplo desde 12 a 60, tal como desde 12 a 40, por ejemplo desde 12 a 30, tal como desde 12 a 20, por ejemplo desde 12 a 15, tal como desde 14 a 100, tal como desde 14 a 80, por ejemplo desde 14 a 60, tal como desde 14 a 40, por ejemplo desde 14 a 30, tal como desde 14 a 20, por ejemplo desde 14 a 16, tal como desde 16 a 100, tal como desde 16 a 80, por ejemplo desde 16 a 60, tal como desde 16 a 40, por ejemplo desde 16 a 30, tal como desde 16 a 20, tal como desde 18 a 100, tal como desde 18 a 80, por ejemplo desde 18 a 60, tal como desde 18 a 40, por ejemplo desde 18 a 30, tal como desde 18 a 20, por ejemplo desde 20 a 100, tal como desde 20 a 80, por ejemplo desde 20 a 60, tal como desde 20 a 40, por ejemplo desde 20 a 30, tal como desde 20 a 25, por ejemplo desde 22 a 100, tal como desde 22 a 80, por ejemplo desde 22 a 60, tal como desde 22 a 40, por ejemplo desde 22 a 30, tal como desde 22 a 25, por ejemplo desde 25 a 100, tal como desde 25 a 80, por ejemplo desde 25 a 60, tal como desde 25 a 40, por ejemplo desde 25 a 30, tal como desde 30 a 100, por ejemplo desde 30 a 80, tal como desde 30 a 60, por ejemplo desde 30 a 40, tal como desde 30 a 35, por ejemplo desde 35 a 100, tal como desde 35 a 80, por ejemplo desde 35 a 60, tal como desde 35 a 40, por ejemplo desde 40 a 100, tal como desde 40 a 80, por ejemplo desde 40 a 60, tal como desde 40 a 50, por ejemplo desde 40 a 45, tal como desde 45 a 100, por ejemplo desde 45 a 80, tal como desde 45 a 60, por ejemplo desde 45 a 50, tal como desde 50 a 100, por ejemplo desde 50 a 80, tal como desde 50 a 60, por ejemplo desde 50 a 55, tal como desde 60 a 100, por ejemplo desde 60 a 80, tal como desde 60 a 70, por ejemplo desde 70 a 100, tal como desde 70 a 90, por ejemplo desde 70 a 80, tal como desde 80 a 100, por ejemplo desde 80 a 90, tal como desde 90 a 100.

**[0404]** En otro aspecto preferido del invento se suministra una molécula modelada que comprende a un polímero conformado de una pluralidad de grupos funcionales enlazados covalentemente donde cada uno contiene un residuo, donde los residuos enlazados covalentemente son capaces de generar un polímero conformado, exclusivamente o en combinación con porciones adicionales, de por lo menos una porción seleccionada de un grupo de porciones de polímeros que consiste de  $\alpha$ -péptidos,  $\beta$ -péptidos,  $\gamma$ -péptidos,  $\omega$ -péptidos;  $\alpha$ -péptidos,  $\beta$ -péptidos,  $\gamma$ -péptidos,  $\omega$ -péptidos mono-, di- y tri-sustituídos, péptidos donde los residuos aminoácidos están en la forma L- o en la forma D-, polipéptidos vinílogos, glicopolipéptidos, poliamidas, péptidos vinílogos de sulfonamidas, polisulfonamidas, péptidos conjugados que comprenden a, por ejemplo, grupos prostéticos, poliésteres, polisacáridos, policarbamatos, policarbonatos, poliureas, polipeptidilfosfonatos, poliuretanos, azatidas, glicocinas oligo N-sustituídas, poliéteres, oligómeros de etoxiformacetales, poli-tioéteres, polietilenglicoles (PEG), polietilenos, polidisulfuros, sulfuros de poliarileno, polinucleótidos, PNA's, LNA's, morfolinol oligo pirrolinonas, polioximas, poliiminas, polietileniminas, poliimididas, poliactetales, poliacetatos, poliestirenos, polivinilos, lípidos, fosfolípidos, glicolípidos, compuestos policíclicos que comprenden a, por ejemplo, ciclos alifáticos o aromáticos, incluyendo compuestos policíclicos, proteoglicanos, y polisiloxanos, y donde la pluralidad de residuos es preferiblemente desde 2 a 200, por ejemplo desde 2 a 100, tal como desde 2 a 80, por ejemplo desde 2 a 60, tal como desde 2 a 40, por ejemplo desde 2 a 30, tal como desde 2 a 20, por ejemplo desde 2 a 15, tal como desde 2 a 10, tal como desde 2 a 8, por ejemplo desde 2 a 6, tal como desde 2 a 4, por ejemplo 2, tal como desde 3 a 100, por ejemplo desde 3 a 80, tal como desde 3 a 60, tal como desde 3 a 40, por ejemplo desde 3 a 30, tal como desde 3 a 15, por ejemplo desde 3 a 15, tal como desde 3 a 10, tal como desde 3 a 8, por ejemplo desde 3 a 6, tal como desde 3 a 4, por ejemplo 3, tal como desde 4 a 100, por ejemplo desde 4 a 80, tal como desde 4 a 60, tal como desde 4 a 40, por ejemplo desde 4 a 30, tal como desde 4 a 20, tal como desde 4 a 15, por ejemplo desde 4 a 10, tal como desde 4 a 8, tal como desde 4 a 6, por ejemplo 4, por ejemplo desde 5 a 100, tal como desde 5 a 80, por ejemplo desde 5 a 60, tal como desde 5 a 40, por ejemplo desde 5 a 30, tal como desde 5 a 20, por ejemplo desde 5 a 15, tal como desde 5 a 10, tal como desde 5 a 8, por ejemplo desde 5 a 6, por ejemplo 5, tal como desde 6 a 100, por ejemplo desde 6 a 80, tal como desde 6 a 60, tal como desde 6 a 40, por ejemplo desde 6 a 30, tal como desde 6 a 20, tal como desde 6 a 15, por ejemplo desde 6 a 10, tal como desde 6 a 8, tal como 6, por ejemplo desde 7 a 100, tal como desde 7 a 80, por ejemplo desde 7 a 60, tal como desde 7 a 40, por ejemplo desde 7 a 30, tal como desde

7 a 20, por ejemplo desde 7 a 15, tal como desde 7 a 10, tal como desde 7 a 8, por ejemplo 7, por ejemplo desde 8 a 100, tal como desde 8 a 80, por ejemplo desde 8 a 60, tal como desde 8 a 40, por ejemplo desde 8 a 30, tal como desde 8 a 20, por ejemplo desde 8 a 15, tal como desde 8 a 10, tal como 8, por ejemplo 9, por ejemplo desde 10 a 100, tal como desde 10 a 80, por ejemplo desde 10 a 60, tal como desde 10 a 40, por ejemplo desde 10 a 30, tal como desde 10 a 20, por ejemplo desde 10 a 15, tal como desde 10 a 12, tal como 10, por ejemplo desde 12 a 100, tal como desde 12 a 80, por ejemplo desde 12 a 60, tal como desde 12 a 40, por ejemplo desde 12 a 30, tal como desde 12 a 20, por ejemplo desde 12 a 15, tal como desde 14 a 100, tal como desde 14 a 80, por ejemplo desde 14 a 60, tal como desde 14 a 40, por ejemplo desde 14 a 30, tal como desde 14 a 20, por ejemplo desde 14 a 16, tal como desde 16 a 100, tal como desde 16 a 80, por ejemplo desde 16 a 60, tal como desde 16 a 40, por ejemplo desde 16 a 30, tal como desde 16 a 20, tal como desde 18 a 100, tal como desde 18 a 80, por ejemplo desde 18 a 60, tal como desde 18 a 40, por ejemplo desde 18 a 30, tal como desde 18 a 20, por ejemplo desde 20 a 100, tal como desde 20 a 80, por ejemplo desde 20 a 60, tal como desde 20 a 40, por ejemplo desde 20 a 30, tal como desde 20 a 25, por ejemplo desde 22 a 100, tal como desde 22 a 80, por ejemplo desde 22 a 60, tal como desde 22 a 40, por ejemplo desde 22 a 30, tal como desde 22 a 25, por ejemplo desde 25 a 100, tal como desde 25 a 80, por ejemplo desde 25 a 60, tal como desde 25 a 40, por ejemplo desde 25 a 30, tal como desde 30 a 100, por ejemplo desde 30 a 80, tal como desde 30 a 60, por ejemplo desde 30 a 40, tal como desde 30 a 35, por ejemplo desde 35 a 100, tal como desde 35 a 80, por ejemplo desde 35 a 60, tal como desde 35 a 40, por ejemplo desde 40 a 100, tal como desde 40 a 80, por ejemplo desde 40 a 60, tal como desde 40 a 50, por ejemplo desde 40 a 45, tal como desde 45 a 100, por ejemplo desde 45 a 80, tal como desde 45 a 60, por ejemplo desde 45 a 50, tal como desde 50 a 100, por ejemplo desde 50 a 80, tal como desde 50 a 60, por ejemplo desde 50 a 55, tal como desde 60 a 100, por ejemplo desde 60 a 80, tal como desde 60 a 70, por ejemplo desde 70 a 100, tal como desde 70 a 90, por ejemplo desde 70 a 80, tal como desde 80 a 100, por ejemplo desde 80 a 90, tal como desde 90 a 100.

**[0405]** La molécula modelada en una sección es preferiblemente una, donde los residuos enlazados covalentemente son capaces de generar un polímero comprendido de, exclusivamente o en combinación con porciones adicionales del grupo, por lo menos una porción seleccionada de un grupo de porciones poliméricas que consisten de  $\alpha$ -péptidos,  $\beta$ -péptidos,  $\gamma$ -péptidos,  $\omega$ -péptidos;  $\alpha$ -péptidos,  $\beta$ -péptidos,  $\gamma$ -péptidos,  $\omega$ -péptidos mono-, di- y trisustituídos donde los residuos aminoácidos están en la forma de L- o en la forma de D-, y polipéptidos vinilo.

**[0406]** En una sección específica, la molécula modelada es una donde los residuos enlazados covalentemente son capaces de generar un polisacárido.

**[0407]** En otro aspecto se suministra una molécula modelada conformada de una secuencia de grupos funcionales, donde los grupos funcionales cercanos están enlazados por una partícula molecular que no es asociada por naturaleza con dichos grupos funcionales.

**[0408]** Un aspecto adicional de este invento se refiere a i) una molécula modelada que comprende a una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada no comprende o consiste de un  $\alpha$ -péptido o un nucleótido, ii) una molécula modelada que comprende a una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada no comprende o consiste de un  $\alpha$ -péptido o nucleótido monosustituído, y iii) una molécula modelada que comprende a una secuencia de grupos funcionales enlazadas covalentemente, donde la molécula modelada no comprende o es conformada de un péptido o un nucleótido.

#### Composiciones de moléculas modeladas

**[0409]** Las moléculas modeladas de acuerdo al invento, incluyendo a aquellas mencionadas en este documento, pueden estar presentes en una composición de moléculas modeladas, donde dicha composición comprende una pluralidad de más de o alrededor de  $10^3$  moléculas modeladas diferentes, tales como más de o alrededor de  $10^4$  moléculas modeladas diferentes, por ejemplo, más de o alrededor de  $10^5$  moléculas modeladas diferentes, tal como más de o alrededor de  $10^6$  moléculas modeladas diferentes, por ejemplo más de o alrededor de  $10^7$  moléculas modeladas diferentes, tal como más de o alrededor de  $10^8$  moléculas modeladas diferentes, por ejemplo más de o alrededor de  $10^9$  moléculas modeladas diferentes, tal como más de o alrededor de  $10^{10}$  moléculas modeladas diferentes, por ejemplo más de o alrededor de  $10^{11}$  moléculas modeladas diferentes, tal como más de o alrededor de  $10^{12}$  moléculas modeladas diferentes, por ejemplo más de o alrededor de  $10^{13}$  moléculas modeladas diferentes, tal como más de o alrededor de  $10^{14}$  moléculas modeladas diferentes, por ejemplo más de o alrededor de  $10^{15}$  moléculas modeladas diferentes, tal como más de o alrededor de  $10^{16}$  moléculas modeladas diferentes, por ejemplo más de o alrededor de  $10^{17}$  moléculas modeladas diferentes, tal como más de o alrededor de  $10^{18}$  moléculas modeladas diferentes.

**[0410]** La composición en algunas secciones comprende preferiblemente además a una plantilla capaz de modelar cada molécula modelada, o uno de sus subconjuntos. Asimismo, en un aspecto preferido de este invento, se suministra i) una composición que comprende a una molécula modelada y la plantilla capaz de modelar a la molécula modelada, o ii) una composición que comprende a una molécula modelada y a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada.

**[0411]** Varias características preferidas de las moléculas modeladas ya sean i) enlazadas a la plantilla capaz de modelar la síntesis de la molécula modelada, o ii) están presentes en una composición que comprende además a la

plantilla capaz de modelar la síntesis de la molécula modelada que se lista a continuación.

[0412] Cuando están presentes en aquellas composiciones, se prefiere que i) la plantilla no consiste exclusivamente de nucleótidos naturales, cuando la molécula modelada es un péptido que comprende exclusivamente a  $\alpha$ -aminoácidos monosustituídos, ii) la plantilla no es un nucleótido natural, cuando la molécula modelada es un  $\alpha$ -péptido natural, iii) la plantilla no es un nucleótido, cuando la molécula modelada es un  $\alpha$ -péptido natural, iv) la plantilla no es un nucleótido, cuando la molécula modelada es un  $\alpha$ -péptido monosustituído, v) la plantilla no es un nucleótido, cuando la molécula modelada es un  $\alpha$ -péptido, vi) la plantilla no es un nucleótido natural, cuando la molécula modelada es un péptido, y vii) la plantilla no es un nucleótido, cuando la molécula modelada es un péptido.

#### Moléculas modeladas enlazadas a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada

[0413] En un aspecto preferido de este invento se suministra una molécula modelada que comprende a una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada es enlazada por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada, donde la molécula modelada no comprende o consiste de un  $\alpha$ -péptido.

[0414] En otro aspecto preferido de este invento se suministra una molécula modelada que comprende a una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada es enlazada por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada, en cuyo caso la molécula modelada no comprende un  $\alpha$ -péptido monosustituído.

[0415] En otro aspecto preferido del invento se suministra una molécula modelada que comprende a una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada es enlazada por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada, donde la molécula modelada no comprende o consiste de un  $\alpha$ -péptido o un nucleótido.

[0416] En un aspecto adicional de este invento se suministra una molécula modelada que comprende a una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada es enlazada por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada, donde la plantilla no es un nucleótido natural, cuando la molécula modelada es un  $\alpha$ -péptido.

[0417] En un aspecto adicional de este invento se suministra una molécula modelada comprendida de una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada es enlazada por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada, donde la plantilla no consiste exclusivamente de nucleótidos naturales, cuando la molécula modelada es un péptido que comprende exclusivamente a  $\alpha$ -aminoácidos monosustituídos.

[0418] En un aspecto adicional de este invento se suministra una molécula modelada que comprende a una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada está enlazada por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada, donde la plantilla no es un nucleótido natural, cuando la molécula modelada es un  $\alpha$ -péptido natural.

[0419] En un aspecto aún más preferido de este invento se suministra una molécula modelada que comprende a una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada es enlazada por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada, donde la plantilla no es un nucleótido, cuando la molécula modelada es un  $\alpha$ -péptido natural.

[0420] En un aspecto adicional de este invento se suministra a una molécula modelada comprendida de una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada es enlazada por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada, donde la plantilla no es un nucleótido, cuando la molécula modelada es un  $\alpha$ -péptido monosustituído.

[0421] En un aspecto adicional de este invento se suministra a una molécula modelada comprendida de una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada es enlazada por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada, donde la plantilla no es un nucleótido, cuando la molécula modelada es un  $\alpha$ -péptido.

[0422] En un aspecto adicional de este invento se suministra una molécula modelada conformada de una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada es enlazada por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada, donde la plantilla no es un nucleótido natural, cuando la molécula modelada es un péptido.

[0423] En un aspecto adicional de este invento se suministra una molécula modelada conformada de una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada es enlazada por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada, donde la

plantilla no es un nucleótido, cuando la molécula modelada es un péptido.

**[0424]** La molécula modelada puede ser obtenida de acuerdo a los métodos aquí descritos anteriormente. En aspectos adicionales se suministra

5

**[0425]**

i) una molécula modelada comprendida de una secuencia de bloques de construcción enlazados covalentemente;  
 ii) una molécula modelada conformada de una secuencia de bloques de construcción enlazados covalentemente, donde la secuencia de los bloques de construcción enlazados covalentemente comprende a una secuencia de elementos complementarios que forman a una plantilla complementaria capaz de complementar a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada, y donde la molécula modelada está enlazada a la plantilla complementaria o a la plantilla que modelo su síntesis; y  
 iii) una molécula modelada de acuerdo a cualquiera de las declaraciones anteriores, donde la molécula modelada comprende a una secuencia de entidades funcionales que comprenden a por lo menos un grupo funcional, y opcionalmente a por lo menos un grupo reactivo tipo II, y donde cada entidad funcional es enlazada a un elemento complementario o a una plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada.

10

15

**Usos de las moléculas modeladas**

20

**[0426]** Las moléculas modeladas de acuerdo a este invento pueden ser utilizadas para una variedad de propósitos comerciales.

25

**[0427]** En un aspecto, se suministra un método para examinar a moléculas modeladas que tienen, potencialmente, una actividad predeterminada, donde dicho método comprende el paso de suministrar a una molécula objetivo o a una entidad objetivo, incluyendo una superficie, y obtener las moléculas modeladas que tienen una afinidad para con -o un efecto en- dicha molécula objetivo o entidad objetivo.

30

**[0428]** Otro aspecto se refiere a un método para ejecutar ensayos en relación a una actividad asociada potencialmente con una molécula modelada, donde dicho método comprende el paso de suministrar una molécula objetivo o una entidad objetivo, incluyendo una superficie, y obtener moléculas modeladas que tienen una afinidad para con - o un efecto en- dicha molécula objetivo o entidad objetivo, y determinar la actividad de la molécula modelada.

35

**[0429]** En otro aspecto adicional se suministra un método para seleccionar complejos o moléculas modeladas que tienen una actividad predeterminada, donde dicho método comprende el paso de realizar un procedimiento de selección y escoger a moléculas modeladas en base a criterios de selección predeterminados.

40

**[0430]** También se suministra un método para la examinación de una composición de moléculas que tienen una actividad predeterminada el cual comprende:

i) establecer una primera composición de moléculas modeladas tal como se describen este documento, o producidas tal como se define en este documento por medio de cualquier método para preparar moléculas modeladas,  
 ii) expone la primera composición o condiciones que enriquecen a dicha primera composición con moléculas modeladas que tienen una actividad predeterminada, y  
 iii) amplificar opcionalmente las moléculas modeladas de la composición enriquecida obteniendo una 2ª composición,  
 iv) opcionalmente repetir los pasos desde el ii) al iii), y  
 v) obtener una composición adicional que tiene una tasa más alta de moléculas modeladas que tienen la actividad predeterminada específica.

50

**[0431]** En una sección, el método comprende además un paso de mutar a las moléculas modeladas, donde dicha mutagénesis puede ocurrir antes de ejecutar el paso iii), simultáneamente con la ejecución del paso iii), o después de ejecutar el paso iii). La mutagénesis puede ser ejecutada como una mutagénesis aleatoria o dirigida a un lugar.

55

**[0432]** El paso iii) del método comprende preferiblemente una amplificación de  $10^1$  a  $10^{15}$  veces, y los pasos ii) y iii) puede ser repetida, tal como por lo menos 2 veces, 3 veces, 5 veces, o por lo menos 10 veces, tal como por lo menos 15 veces.

60

**[0433]** El método puede comprender un paso adicional de identificar a la molécula modelada que tiene a la actividad predeterminada, y dicha identificación puede ser conducida, por ejemplo, al analizar a la plantilla y/o a la plantilla complementaria físicamente o de otra forma asociada con la molécula.

65

**[0434]** Las condiciones que enriquecen a la primera composición pueden comprender el suministro adicional de un compañero enlazador a dicha molécula modelada que tiene la actividad predeterminada, donde dicho compañero enlazador es inmovilizado directamente o indirectamente en un soporte.

**[0435]** Las condiciones que enriquecen a la composición pueden involucrar cualquier método de última tecnología,

incluyendo a uno o más de una separación electroforética, filtración de geles, inmunoprecipitaciones, enfoque isoeléctrico, centrifugación, e inmovilización. Las condiciones que enriquecen a la composición también pueden comprender el paso adicional de suministrar células capaces de internalizar a la molécula modelada, o realizar cualquier interacción con la molécula modelada que tiene a la actividad predeterminada.

5 **[0436]** La actividad predeterminada de la molécula modelada es preferiblemente una actividad enzimática o una actividad catalizadora.

10 **[0437]** En otro aspecto se suministra un método para amplificar a la plantilla complementaria o a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada que tiene o que tiene potencialmente una actividad predeterminada, donde dicho método comprende el paso de contactar a la plantilla con medios de amplificación, y amplificar a la plantilla. El método para amplificar a la plantilla complementaria o a la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada tiene, o tiene potencialmente, una actividad predeterminada que preferiblemente comprende los pasos de  
15 i) contactar a la plantilla con el medio de amplificación, y amplificar a la plantilla, y ii) obtener a la molécula modelada en un monto incrementado de por lo menos 2 veces.

**[0438]** En otro aspecto se suministra un método para alterar la secuencia de una molécula modelada, incluyendo generar una molécula modelada comprendida de una secuencia nueva o alterada de grupos funcionales, donde dicho método comprende preferiblemente los pasos de  
20 i) suministrar una primera plantilla complementaria o una primera plantilla capaz de modelar a la primera molécula modelada, o una pluralidad de aquellas primeras plantillas complementarias o primeras plantillas capaces de modelar una pluralidad de las primeras moléculas modeladas,  
ii) mutar o modificar a la secuencia de la primera plantilla complementaria o a la primera plantilla, o a la pluralidad de las primeras plantillas complementarias o primeras plantillas, y generar una 2ª plantilla o una 2ª plantilla complementaria, o una pluralidad de segundas plantillas o segundas plantillas complementarias, donde dichas segundas plantillas o plantillas complementarias son capaces de modelar la síntesis de una 2ª molécula modelada, o una pluralidad de segundas moléculas modeladas,  
25 donde dichas segundas moléculas modeladas comprenden una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente que no son idénticos a la secuencia de los grupos funcionales de las primeras moléculas modeladas, y opcionalmente  
30 iii) modelar por medio de dichas segundas plantillas o plantillas complementarias a una 2ª molécula modelada, o una pluralidad de aquellas segundas moléculas modeladas.

**[0439]** En otro aspecto adicional se suministra un método para alterar la secuencia de una molécula modelada, incluyendo generar una molécula modelada comprendida de una secuencia nueva o alterada de grupos funcionales, donde dicho método comprende, preferiblemente, los pasos de  
35 i) suministrar una pluralidad de primeras plantillas complementarias o primeras plantillas capaces de modelar una pluralidad de primeras moléculas modeladas,  
ii) recombinar las secuencias de la pluralidad de primeras plantillas complementarias o primeras plantillas, y generar una 2ª plantilla o una 2ª plantilla complementaria, o una pluralidad de segundas plantillas o segundas plantillas complementarias,  
40 donde dichas segundas plantillas o plantillas complementarias son capaces de modelar la síntesis de una 2ª molécula modelada, o una pluralidad de segundas moléculas modeladas,  
donde dichas segundas moléculas modeladas comprenden una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente que no son idénticos a las secuencias de los grupos funcionales de las primeras moléculas modeladas, y opcionalmente  
45 iii) modelar por medio de dichas segundas plantillas o plantillas complementarias a una 2ª molécula modelada o una pluralidad de dichas segundas moléculas modeladas.

50 **[0440]** Los métodos pueden comprender, preferiblemente, el paso adicional de amplificar a la plantilla complementaria o a la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada, donde dicho paso de amplificación ocurre antes de, simultáneamente con, o después del paso de mutagénesis o de la recombinación.

**[0441]** Cuando se utiliza una mutagénesis, puede ser utilizada como una mutagénesis dirigida a un sitio, mutagénesis de sintasas, mutagénesis químicas, eliminación de lugares únicos (USE - unique site-elimination), PCR propenso a errores, mezcla aleatoria de ADN propenso a errores. La mutagénesis involucra, preferiblemente, a mezclas aleatorias de ADN y/o cualquier forma de recombinación que incluya la recombinación homóloga ya sea in vivo o in vitro.

#### 60 **Variaciones y equivalentes funcionales de las moléculas modeladas**

**[0442]** Este invento también es dirigido a cualquier variación o equivalente funcional de una molécula modelada. Las variaciones y equivalentes funcionales podrían obtenerse por métodos de tecnologías recientes para modificar a moléculas modeladas en la forma de polímeros, incluyendo a péptidos.

65 **[0443]** En el contexto de las moléculas modeladas de este invento, se dice que moléculas son homólogas si

5 contienen estructuras esenciales similares y/o grupos funcionales similares. Los grupos funcionales, o entidades moleculares de grupos funcionales, se dividen en 3 grupos de acuerdo a su homología: los grupos funcionales cargados, los grupos hidrofóbicos, y los grupos hidrofílicos. Cuando un grupo funcional incluye 2 o 3 entidades moleculares que pertenecen a diferentes grupos de homología, se dice que el grupo funcional pertenece a los 2 o 3 grupos de homología diferentes.

[0444] La homología se mide en porcentaje (%). Por ejemplo, las secuencias AABBCA-CAAA y BBAACACBBB (donde A, B y C denotan a un grupo funcional que pertenece a los grupos de homología A, B y C, respectivamente) son homólogos en un 30%.

10

### Elementos

[0445] Los elementos a continuación no deben ser considerados reivindicaciones.

15 1. Un método para sintetizar una molécula modelada que comprende a una pluralidad de grupos funcionales, donde dicho método comprende los pasos de

i) suministrar por lo menos una plantilla que comprende a una secuencia de n elementos codificadores, donde cada elemento codificador comprende por lo menos a un grupo de reconocimiento capaz de reconocer a un elemento complementario predeterminado, y

20 donde n es un número entero de más de uno,

ii) suministrar una pluralidad de bloques de construcción, donde cada bloque de construcción comprende

a) por lo menos a un elemento complementario que comprende a por lo menos un grupo de reconocimiento capaz de reconocer a un elemento codificador predeterminado,

25 b) por lo menos una entidad funcional que comprende a por lo menos un grupo funcional y por lo menos un grupo reactivo, y

c) por lo menos un enlazador que separa a por lo menos una entidad funcional de por lo menos un elemento complementario,

30

iii) contactar a cada uno de dichos elementos codificadores con un elemento complementario capaz de reconocer a dicho elemento codificador,

iv) opcionalmente, obtener a una plantilla complementaria, y

35 v) obtener a una molécula modelada que comprende a grupos funcionales enlazados covalentemente al vincular, por medio de una reacción que involucra a grupos reactivos, a un grupo funcional de por lo menos una entidad funcional a un grupo funcional de otra entidad funcional.

Donde la molécula modelada es capaz de enlazarse por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada, y

40 donde la síntesis de la molécula modelada no involucra la interpretación mediada por ribosomas de un ácido nucleico.

2. El método del elemento 1, donde la molécula modelada es enlazada por medio de un enlazador individual a la plantilla complementaria o a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada.

3. El método del elemento 1, donde los pasos iii) al v) son repetidos.

45

4. El método del elemento 1, donde la plantilla que comprende a n elementos codificadores es una secuencia linear de elementos codificadores.

5. El método del elemento 1, donde la plantilla que comprende a n elementos codificadores es ramificada.

50

6. El método del elemento 1, donde n tiene, preferiblemente, un valor de desde 2 a 200, por ejemplo desde 2 a 100, tal como desde 2 a 80, por ejemplo desde 2 a 60, tal como desde 2 a 40, por ejemplo desde 2 a 30, tal como desde 2 a 20, por ejemplo desde 2 a 15, tal como desde 2 a 10, tal como desde 2 a 8, por ejemplo desde 2 a 6, tal como desde 2 a 4, por ejemplo 2, tal como desde 3 a 100, por ejemplo desde 3 a 80, tal como desde 3 a 60, tal como desde 3 a 40, por ejemplo desde 3 a 30, tal como desde 3 a 20, tal como desde 3 a 15, por ejemplo desde 3 a 15, tal como desde 3 a 10, tal como desde 3 a 8, por ejemplo desde 3 a 6, tal como desde 3 a 4, por ejemplo 3, tal como desde 4 a 100, por ejemplo desde 4 a 80, tal como desde 4 a 60, tal como desde 4 a 40, por ejemplo desde 4 a 30, tal como desde 4 a 20, tal como desde 4 a 15, por ejemplo desde 4 a 10, tal como desde 4 a 8, tal como desde 4 a 6, por ejemplo 4 por ejemplo desde 5 a 100, tal como desde 5 a 80, por ejemplo desde 5 a 60, tal como desde 5 a 40, por ejemplo desde 5 a 30, tal como desde 5 a 20, por ejemplo desde 5 a 15, tal como desde 5 a 10, tal como desde 5 a 8, por ejemplo desde 5 a 6, por ejemplo 5, tal como desde 6 a 100, por ejemplo desde 6 a 80, tal como desde 6 a 60, tal como desde 6 a 40, por ejemplo desde 6 a 30, tal como desde 6 a 20, tal como desde 6 a 15, por ejemplo desde 6 a 10, tal como desde 6 a 8, tal como 6, por ejemplo desde 7 a 100, tal como desde 7 a 80, por ejemplo desde 7 a 60, tal como desde 7 a 40, por ejemplo desde 7 a 30, tal como desde 7 a 20, por ejemplo desde 7 a 15, tal como desde 7 a 10, tal como desde 7 a 8, por ejemplo 7, por ejemplo desde 8 al 100, tal como desde 8 a 80, por ejemplo desde 8 a 60, tal como desde 8 a 40, por ejemplo desde 8 a 30, tal como desde 8 a 20, por ejemplo

65

desde 8 a 15, tal como desde 8 a 10, tal como 8, por ejemplo 9, por ejemplo desde 10 a 100, tal como desde 10 a 80, por ejemplo desde 10 a 60, tal como desde 10 a 40, por ejemplo desde 10 a 30, tal como desde 10 a 20, por ejemplo desde 10 a 15, tal como desde 10 a 12, tal como 10, por ejemplo desde 12 al 100, tal como desde 12 a 80, por ejemplo desde 12 a 60, tal como desde 12 a 40, por ejemplo desde 12 a 30, tal como desde 12 a 20, por ejemplo desde 12 a 15, tal como desde 14 a 100, tal como desde 14 a 80, por ejemplo desde 14 a 60, tal como desde 14 a 40, por ejemplo desde 14 a 30, tal como desde 14 a 20, por ejemplo desde 14 a 16, tal como desde 16 a 100, tal como desde 16 a 80, por ejemplo desde 16 a 60, tal como desde 16 a 40, por ejemplo desde 16 a 30, tal como desde 16 a 20, tal como desde 18 a 100, tal como desde 18 a 80, por ejemplo desde 18 a 60, tal como desde 18 a 40, por ejemplo desde 18 a 30, tal como desde 18 a 20, por ejemplo desde 20 a 100, tal como desde 20 a 80, por ejemplo desde 20 a 60, tal como desde 20 a 40, por ejemplo desde 20 a 30, tal como desde 20 a 25, por ejemplo desde 22 a 100, tal como desde 22 a 80, por ejemplo desde 22 a 60, tal como desde 22 a 40, por ejemplo desde 22 a 30, tal como desde 22 a 25, por ejemplo desde 25 a 100, tal como desde 25 a 80, por ejemplo desde 25 a 60, tal como desde 25 a 40, por ejemplo desde 25 a 30, tal como desde 30 a 100, por ejemplo desde 30 a 80, tal como desde 30 a 60, por ejemplo desde 30 a 40, tal como desde 30 a 35, por ejemplo desde 35 a 100, tal como desde 35 a 80, por ejemplo desde 35 a 60, tal como desde 35 a 40, por ejemplo desde 40 a 100, tal como desde 40 a 80, por ejemplo desde 40 a 60, tal como desde 40 a 50, por ejemplo desde 40 a 45, tal como desde 45 a 100, por ejemplo desde 45 a 80, tal como desde 45 a 60, por ejemplo desde 45 a 50, tal como desde 50 a 100, por ejemplo desde 50 a 80, tal como desde 50 a 60, por ejemplo desde 50 a 55, tal como desde 60 a 100, por ejemplo desde 60 a 80, tal como desde 60 a 70, por ejemplo desde 70 a 100, tal como desde 70 o 90, por ejemplo desde 70 a 80, tal como desde 80 a 100, por ejemplo desde 80 a 90, tal como desde 90 a 100.

7. El método del elemento 1, donde la plantilla es adherida a un soporte sólido o semisólido.
8. El método del elemento 1, donde la plantilla comprende o consiste esencialmente de nucleótidos seleccionados de un grupo que consiste de secuencias de ácidos deoxirribonucleicos (ADN), ácidos ribonucleicos (ARN), ácidos nucleicos de péptidos (PNA - peptide nucleic acids), ácidos nucleicos bloqueados (LNA – locked nucleic acids), y de morfolinos, incluyendo cualquiera de sus análogos o derivados.
9. El método del elemento 1, donde la plantilla comprende o consiste esencialmente de nucleótidos seleccionados de un grupo que consiste de secuencias de ADN, ARN, PNA, LNA y de morfolinos, incluyendo cualquiera de sus análogos o derivados, y donde el elemento complementario comprende o consiste esencialmente de nucleótidos seleccionados de un grupo de secuencias de ADN, ARN, PNA, LNA y de morfolinos, incluyendo cualquiera de sus análogos o derivados.
10. El método del elemento 1, donde la plantilla tiene la capacidad de amplificarse.
11. El método del elemento 1, donde la plantilla comprende una sola hebra de elementos codificadores.
12. El método del elemento 1, donde la una sola hebra de elementos codificadores es capaz de formar una hélice doble por medio de hibridación a una plantilla complementaria comprendida de una sola hebra de elementos complementarios.
13. El método de cualquiera de los elementos uno al 12, donde la plantilla comprende a un lugar cebado.
14. El método de acuerdo al elemento 13, donde el lugar reservado se encuentra corriente arriba de los elementos codificadores y es capaz de enlazar a un cebador para iniciar la incorporación de los bloques de construcción y/o para la amplificación de los elementos codificadores de las plantillas.
15. El método del elemento 13, donde el lugar de cebado es corriente abajo de los elementos codificadores y es capaz de enlazar a un oligonucleótido.
16. El método del elemento 15, donde el oligonucleótido comprende un punto de anclaje, que puede enlazar a la molécula modelada.
17. El método de acuerdo al elemento 15, donde el oligonucleótido es capaz de detener incorporaciones adicionales de los bloques de construcción.
18. El método del elemento 15, donde el lugar reservado es capaz de enlazar a un cebador en reversa.
19. El método del elemento 1, donde cada elemento codificador es enlazado a un elemento codificador cercano por medio de un enlace químico covalente.
20. El método del elemento 1, donde cada elemento codificador es enlazado a cada elemento codificador cercano por medio de un enlace químico covalente.
21. El método de cualquiera de los elementos 14 y 15, donde dicho enlace químico covalente es seleccionado de un

- grupo de enlaces covalentes que consiste de enlaces de fosfodiésteres, enlaces de fosforotioatos y enlaces de péptidos.
- 5 22. El método de cualquiera de los elementos 14 y 15, donde dicho enlace químico covalente es seleccionado de un grupo de enlaces covalentes que consiste de enlaces de fosfodiésteres y enlaces de fosforotioatos.
23. El método del elemento 1, donde por lo menos un elemento codificador es adherido a un soporte sólido o semisólido.
- 10 24. El método del elemento 1, donde los elementos codificadores son seleccionados de un grupo que consiste de nucleótidos, incluyendo cualquiera de sus análogos o derivados, aminoácidos, anticuerpos y antígenos.
25. El método del elemento 19, donde los elementos codificadores son seleccionados de un grupo que consiste de nucleótidos, derivados de nucleótidos y análogos de nucleótidos, incluyendo cualquiera de sus combinaciones.
- 15 26. El método del elemento 20, donde los elementos codificadores son seleccionados de un grupo que consiste de nucleótidos.
- 20 27. El método del elemento 21, donde los nucleótidos son ácidos deoxirribonucleótidos que comprenden una base seleccionada de adenina (A), timina (T), guanina (G), y citosina (C).
28. El método del elemento 21 donde los nucleótidos son ácidos ribonucleicos que comprenden una base seleccionada de adenina (A), uracilo (U), guanina (G), y citosina (C).
- 25 29. El método del elemento 21, donde cada nucleótido es enlazado a un nucleótido cercano por medio de un enlace covalente.
- 30 30. El método del elemento 21, donde cada nucleótido es enlazado a cada nucleótido cercano por medio de un enlace covalente.
- 30 31. El método de cualquiera de los elementos 24 y 25, donde dicho enlace covalente es un enlace de fosfodiéster o un enlace de fosforotioato.
- 35 32. El método del elemento 21, donde los elementos codificadores son nucleótidos naturales y no naturales seleccionados de un grupo que consiste de ácidos deoxirribonucleicos.
33. El método del elemento 21, donde los elementos codificadores son nucleótidos naturales y no naturales seleccionados de un grupo que consiste de ácidos ribonucleicos.
- 40 34. El método del elemento 19, donde los elementos codificadores son seleccionados de un grupo que consiste de nucleótidos, derivados de nucleótidos y análogos de nucleótidos en los cuales uno o más de las partículas bases y/o las partículas de fosfatos y/o la partícula ribosa o deoxirribosa ha sido sustituida por una entidad molecular alterna.
- 45 35. El método del elemento 29, donde los elementos complementarios capaces de interactuar con dichos elementos codificadores comprenden o consisten esencialmente de nucleótidos seleccionados de un grupo que consiste de secuencias de ADN, ARN, PNA, LNA y de morfolinos, incluyendo cualquiera de sus análogos o derivados.
- 50 36. El método de cualquiera de los elementos 27 al 30, donde cada nucleótido es enlazado a un nucleótido cercano por medio de un enlace químico covalente.
- 50 37. El método de cualquiera de los elementos 27 al 30, donde cada nucleótido es enlazado a cada nucleótido cercano por medio de un enlace químico covalente.
- 55 38. El método de cualquiera de los elementos 31 y 32, donde dicho enlace químico covalente es seleccionado de un grupo de enlaces covalentes que consiste de enlaces de fosfodiésteres y enlaces de péptidos.
- 60 39. El método del elemento 1, donde el elemento codificador comprende o consiste esencialmente, preferiblemente, de desde 1 a 100 subunidades, tal como desde 1 a 80 subunidades, por ejemplo desde 1 a 60 subunidades, tal como desde 1 a 40 subunidades, por ejemplo desde 1 a 20 subunidades, tal como desde 1 a 18 subunidades, por ejemplo desde 1 a 16 subunidades, tal como desde 1 a 14 subunidades, por ejemplo desde 1 a 12 subunidades, tal como desde 1 a 10 subunidades, por ejemplo desde 1 a 9 subunidades, tal como desde 1 a 8 subunidades, por ejemplo desde 1 a 7 subunidades, tal como desde 1 a 6 subunidades, por ejemplo desde 1 a 5 subunidades, tal como desde 1 a 4 subunidades, por ejemplo desde 1 a 3 subunidades, tal como desde 1 a 2 subunidades, por ejemplo 1 subunidad, tal como desde 2 a 100 subunidades, tal como desde 2 a 80 subunidades, por ejemplo desde 2 a 60 subunidades, tal como desde 2 a 40 subunidades, por ejemplo desde 2 a 20 subunidades, tal como desde 2 a 18 subunidades, por ejemplo desde 2 a 16 subunidades, tal como desde 2 a 14 subunidades, por ejemplo desde 2 a



41. El método del elemento 40, donde cada subunidad comprende o consiste esencialmente de un nucleótido.
42. El método del elemento 41, donde el nucleótido es un ácido deoxirribonucleico que comprende a una base seleccionada de adenina (A), timina (T), guanina (G), y citocina (C).
- 5 43. El método del elemento 41, donde el nucleótido es un ácido ribonucleico que comprende una base seleccionada de adenina (A), uracilo (U), guanina (G) y citocina (C).
- 10 44. El método del elemento 41, donde cada nucleótido es enlazado a un nucleótido o un análogo de nucleótido cercano por medio de un enlace covalente.
45. El método del elemento 41, donde cada nucleótido es enlazado a cada nucleótido o análogo de nucleótido cercano por medio de un enlace covalente.
- 15 46. El método de cualquiera de los elementos 44 y 45, donde dicho enlace covalente es seleccionado de un grupo que consiste de enlaces de fosfodiésteres, enlaces de fosforotioatos y enlaces de péptidos.
47. El método del elemento 40, donde por lo menos algunos de dichos nucleótidos son seleccionados de un grupo que consiste de derivados de nucleótidos.
- 20 48. El método del elemento 47, donde los derivados de nucleótidos son seleccionados de un grupo que consiste de derivados de ácidos deoxirribonucleicos y derivados de ácidos ribonucleicos.
- 25 49. El método del elemento 39, donde las subunidades del elemento codificador son seleccionadas y un grupo que consiste de nucleótidos, derivados de nucleótidos y análogos de nucleótidos en los cuales una o más de partículas base y/o partículas de fosfato y/o partículas de ribosa y/o partículas de deoxirribosas han sido sustituidas por una entidad molecular alterna.
- 30 50. El método del elemento 49, donde las subunidades del elemento complementario capaces de interactuar con dichas subunidades del elemento codificador comprenden o consisten esencialmente de nucleótidos seleccionados de un grupo que consiste de secuencias de ADN, de ARN, de PNA, de LNA y de morfolinos, incluyendo cualquiera de sus análogos o derivados.
- 35 51. El método del elemento 47, donde cada derivado de nucleótido es enlazado a un nucleótido o análogo de nucleótidos cercano por medio de un enlace químico covalente.
52. El método del elemento 47, donde cada derivado de nucleótido es enlazado a cada nucleótido o análogo de nucleótidos cercano por medio de un enlace químico covalente.
- 40 53. El método de cualquiera de los elementos 51 y 52, donde dicho enlace químico covalente es seleccionado de un grupo de enlaces covalentes que consiste de enlaces de fosfodiésteres, enlaces de fosforotioatos y enlaces de péptidos.
- 45 54. El método de acuerdo al elemento 1, donde una plantilla complementaria es obtenida al complementar a una pluralidad de elementos codificadores predeterminados al contactar a cada uno de dichos elementos codificadores con un elemento complementario capaz de reconocer a dicho elemento codificador.
- 50 55. El método del elemento 1, donde la plantilla complementaria comprende a n elementos complementarios en forma de una secuencia lineal de elementos codificadores.
- 55 56. El método del elemento 1, donde la plantilla complementaria que comprende a n elementos complementarios es ramificada.
- 60 57. El método de cualquiera de los elementos 55 y 56, donde n es preferiblemente un valor que va de desde 2 a 200, por ejemplo desde 2 a 100, tal como desde 2 a 80, por ejemplo desde 2 a 60, tal como desde 2 a 40, por ejemplo desde 2 a 30, tal como desde 2 a 20, por ejemplo desde 2 a 15, tal como desde 2 a 10, tal como desde 2 a 8, por ejemplo desde 2 a 6, tal como desde 2 a 4, tal como 2, tal como desde 3 a 100, por ejemplo desde 3 a 80, tal como desde 3 a 60, tal como desde 3 a 40, por ejemplo desde 3 a 30, tal como desde 3 a 20, tal como desde 3 a 15, por ejemplo desde 3 a 15, tal como desde 3 a 10, tal como desde 3 a 8, por ejemplo desde 3 a 6, tal como desde 3 a 4, por ejemplo 3, tal como desde 4 a 100, por ejemplo desde 4 a 80, tal como desde 4 a 60, tal como desde 4 a 40, por ejemplo desde 4 a 30, tal como desde 4 a 20, tal como desde 4 a 15, por ejemplo desde 4 a 10, tal como desde 4 a 8, tal como desde 4 a 6, tal como 4, por ejemplo desde 5 a 100, tal como desde 5 a 80, por ejemplo desde 5 a 60, tal como desde 5 a 40, por ejemplo desde 5 a 30, tal como desde 5 a 20, por ejemplo desde 5 a 15, tal como desde 5 a 10, tal como desde 5 a 8, por ejemplo desde 5 a 6, por ejemplo 5, tal como desde 6 a 100, por ejemplo desde 6 a 80, tal como desde 6 a 60, tal como desde 6 a 40, por ejemplo desde 6 a 30, tal como desde 6 a 20, tal como desde 6 a 15, por ejemplo desde 6 a 10, tal como desde 6 a 8, tal como 6, por ejemplo desde 7 a 100, tal

- como desde 7 a 80, por ejemplo desde 7 a 60, tal como desde 7 a 40, por ejemplo desde 7 a 30, tal como desde 7 a 20, por ejemplo desde 7 a 15, tal como desde 7 a 10, tal como desde 7 a 8, tal como 7, por ejemplo desde 8 a 100, tal como desde 8 a 80, por ejemplo desde 8 a 60, tal como desde 8 a 40, por ejemplo desde 8 a 30, tal como desde 8 a 20, por ejemplo desde 8 a 15, tal como desde 8 a 10, por ejemplo 8, tal como 9, por ejemplo desde 10 a 100, tal como desde 10 a 80, por ejemplo desde 10 a 60, tal como desde 10 a 40, por ejemplo desde 10 a 30, tal como desde 10 a 20, por ejemplo desde 10 a 15, tal como desde 10 a 12, tal como 10, por ejemplo desde 12 a 100, al como desde 12 a 80, por ejemplo desde 12 a 60, tal como desde 12 a 40, por ejemplo desde 12 a 30, tal como desde 12 a 20, por ejemplo desde 12 a 15, tal como desde 14 a 100, tal como desde 14 a 80, por ejemplo desde 14 a 60, tal como desde 14 a 40, por ejemplo desde 14 a 30, tal como desde 14 a 20, por ejemplo desde 14 a 16, tal como de 16 a 100, tal como desde 16 a 80, por ejemplo desde 16 a 60, tal como desde 16 a 40, por ejemplo desde 16 a 30, tal como desde 16 a 20, tal como desde 18 a 100, tal como desde 18 a 80, por ejemplo desde 18 a 60, tal como desde 18 a 40, por ejemplo desde 18 a 30, tal como desde 18 a 20, por ejemplo desde 20 a 100, tal como desde 20 a 80, por ejemplo desde 20 a 60, tal como desde 20 a 40, por ejemplo desde 20 a 30, tal como desde 20 a 25, por ejemplo desde 22 a 100, tal como desde 22 a 80, por ejemplo desde 22 a 60, tal como desde 22 a 40, por ejemplo desde 22 a 30, tal como desde 22 a 25, por ejemplo desde 25 a 100, tal como desde 25 a 80, por ejemplo desde 25 a 60, tal como desde 25 a 40, por ejemplo desde 25 a 30, tal como desde 30 a 100, por ejemplo desde 30 a 80, tal como desde 30 a 60, por ejemplo desde 30 a 40, tal como desde 30 a 35, por ejemplo desde 35 a 100, tal como desde 35 a 80, por ejemplo desde 35 a 60, tal como desde 35 a 40, por ejemplo desde 40 a 100, tal como desde 40 a 80, por ejemplo desde 40 a 60, tal como desde 40 a 50, por ejemplo desde 40 a 45, tal como desde 45 a 100, por ejemplo desde 45 a 80, tal como desde 45 a 60, por ejemplo desde 45 a 50, tal como desde 50 a 100, por ejemplo desde 50 a 80, tal como desde 50 a 60, por ejemplo desde 50 a 55, tal como desde 60 a 100, por ejemplo desde 60 a 80, tal como desde 60 a 70, por ejemplo desde 70 a 100, tal como desde 70 a 90, por ejemplo desde 70 a 80, tal como desde 80 a 100, por ejemplo desde 80 a 90, tal como desde 90 a 100.
58. El método del elemento 1, donde la plantilla complementaria está adherida a un soporte sólido o semisólido.
59. El método del elemento 1, donde la plantilla complementaria comprende o consiste esencialmente de nucleótidos seleccionados de un grupo que consiste de secuencias de ácidos deoxirribonucleicos (ADN), ácidos ribonucleicos (ARN), ácidos nucleicos de péptidos (PNA - peptide nucleic acids), ácidos nucleicos bloqueados (LNA - locked nucleic acids) y de morfolinos, incluyendo cualquiera de sus análogos o derivados.
60. El método del elemento 1, donde la plantilla complementaria comprende o consiste esencialmente de nucleótidos seleccionados de un grupo que consiste de secuencias de ADN, ARN, PNA, LNA y de morfolinos, incluyendo cualquiera de sus análogos o derivados, donde el elemento codificador correspondiente de la plantilla comprende o consiste esencialmente de nucleótidos seleccionados de un grupo que consiste de secuencias de ADN, ARN, PNA, LNA y de morfolinos, incluyendo cualquiera de sus análogos o derivados.
61. El método del elemento 1, donde la plantilla complementaria tiene la capacidad de amplificarse.
62. El método del elemento 1, donde la plantilla complementaria comprende a una sola hebra de elementos complementarios.
63. El método del elemento 55 y 56, donde la una sola hebra de elementos complementarios es capaz de formar una hélice doble por medio de hibridación a una plantilla que comprende a una sola hebra de elementos codificadores.
64. El método de cualquiera de los elementos 1 a 57, donde la plantilla complementaria comprende a un lugar de cebado.
65. El método del elemento 1, donde cada elemento complementario es vinculado a un elemento complementario cercano por medio de un enlace químico covalente.
66. El método del elemento 1, donde cada elemento complementario es enlazado a un elemento complementario cercano por medio de un enlace químico covalente.
67. El método de cualquiera de los elementos 59 y 60, donde dicho enlace químico covalente es seleccionado de un grupo de enlaces covalentes que consisten de enlaces de fosfodiésteres, enlaces de fosforotioatos y enlaces de péptidos.
68. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 65 a 67, donde el enlace de fosfodiésteres es formado por una reacción entre 2 grupos reactivos tipo I, donde un grupo reactivo tipo I es un grupo hidroxilo y el otro es un grupo fosforimidazol.
69. El método de cualquiera de los elementos 59 y 60, donde dicho enlace químico covalente es seleccionada de un grupo de enlaces covalentes que consiste de enlaces de fosfodiésteres y enlaces de fosforotioatos.

70. El método del elemento 1, donde por lo menos un elemento complementario está adherido a un soporte sólido o semisólido.
- 5 71. El método del elemento 1, donde los elementos complementarios son seleccionados de un grupo que consiste de nucleótidos, incluyendo cualquiera de sus análogos o derivados, aminoácidos, anticuerpos y antígenos.
72. El método del elemento 64 donde los elementos complementarios son seleccionados de un grupo que consiste de nucleótidos, derivados de nucleótidos, análogos de nucleótidos incluyendo cualquiera de sus combinaciones.
- 10 73. El método de acuerdo al elemento 72, donde, para incrementar la diversidad, los derivados de nucleótidos comprenden a derivados naturales, así como derivados no naturales.
74. El método del elemento 73, donde los elementos complementarios son seleccionados de un grupo que consiste de nucleótidos.
- 15 75. El método del elemento 74, donde los nucleótidos son ácidos deoxirribonucleicos que comprenden una base seleccionada de adenina (A), timina (T), guanina (G), citosina (C), 7-deaza-guanina, 7-deaza-adenina.
- 20 76. El método del elemento 74, donde los nucleótidos son ácidos ribonucleicos que comprenden una base seleccionada de adenina (A), uracilo (U), guanina (G), y citosina (C).
77. El método del elemento 74, donde cada nucleótido está enlazado a un nucleótido o análogo de nucleótido cercano por medio de un enlace covalente.
- 25 78. El método del elemento 74, donde cada nucleótido está enlazado a cada nucleótido o análogo de nucleótido cercano por medio de un enlace covalente.
79. El método de cualquiera de los elementos 77 y 78, donde dicho enlace covalente es un enlace de fosfodiésteres o un enlace de fosforotioatos.
- 30 80. El método del elemento 72, donde los elementos complementarios son nucleótidos naturales o no naturales seleccionados de un grupo que consiste de ácidos deoxirribonucleicos.
- 35 81. El método del elemento 72, donde los elementos complementarios son nucleótidos naturales o no naturales seleccionados de un grupo que consiste de ácidos ribonucleicos.
- 40 82. El método del elemento 72, donde los elementos complementarios son seleccionados de un grupo que consiste de nucleótidos, derivados de nucleótidos y análogos de nucleótidos en los cuales una o más de una partícula base y/o una partícula de fosfato y/o una partícula de ribosa y/o una partícula de deoxirribosa ha sido sustituida por una entidad molecular alterna.
- 45 83. El método del elemento 82, donde los elementos codificadores capaces de interactuar con dichos elementos complementarios comprenden o consisten esencialmente de nucleótidos seleccionados de un grupo que consiste de secuencias de ADN, ARN, PNA, LNA y morfolidos, incluyendo cualquiera de sus análogos o derivados.
- 50 84. El método de cualquiera de los elementos 82 y 83, donde cada nucleótido es enlazado a un nucleótido o análogo de nucleótido cercano, por medio de un enlace químico covalente.
- 55 85. El método de cualquiera de los elementos 82 y 83, donde cada nucleótido es enlazado a cada nucleótido o análogo de nucleótidos cercano, por medio de un enlace químico covalente.
- 60 86. El método de cualquiera de los elementos 84 y 85, donde dicho enlace químico covalente es seleccionado de un grupo de enlaces covalentes que consiste de enlaces de fosfodiésteres, enlaces de fosforotioatos, y enlaces de péptidos.
- 65 87. El método de acuerdo al elemento 1, donde un elemento codificador es acoplado de una forma no covalente a otro elemento codificador.
88. El método de acuerdo al elemento 87, donde el acoplamiento no covalente involucra a enlaces de hidrógeno.
89. El método del elemento 1, donde el elemento complementario comprende o consiste esencialmente, preferiblemente, de 1 a 100 subunidades, tal como desde 1 a 80 subunidades, por ejemplo desde 1 a 60 subunidades, tal como desde 1 a 40 subunidades, por ejemplo desde 1 a 20 subunidades, tal como desde 1 a 18 subunidades, por ejemplo desde 1 a 16 subunidades, tal como desde 1 a 14 subunidades, por ejemplo desde 1 a 12 subunidades, tal como desde 1 a 10 subunidades, por ejemplo desde 1 a 9 subunidades, tal como desde 1 a 8 subunidades, por ejemplo desde 1 a 7 subunidades, tal como desde 1 a 6 subunidades, por ejemplo desde 1 a 5 subunidades, tal como desde 1 a 4 subunidades, por ejemplo desde 1 a 3 subunidades, tal como desde 1 a 2



90. El método del elemento 89, donde cada subunidad comprende o consiste esencialmente de un nucleótido o análogo de nucleótido.
- 5 91. El método del elemento 90, donde cada subunidad comprende o consiste esencialmente de un nucleótido.
92. El método del elemento 91, donde el nucleótido es un ácido deoxirribonucleico que comprende a una base seleccionada de adenina (A), timina (T), guanina (G), y citosina (C).
- 10 93. El método del elemento 91, donde el nucleótido es un ácido ribonucleico que comprende a una base seleccionada de adenina (A), uracilo (U), guanina (G), y citosina (C).
94. El método del elemento 91, donde cada nucleótido es enlazado a un nucleótido o análogo de nucleótido cercano por medio de un enlace covalente.
- 15 95. El método del elemento 91, donde cada nucleótido es enlazado a cada nucleótido o análogo de nucleótido cercano por medio de un enlace covalente.
96. El método del elemento 94, donde dicho enlace covalente es seleccionado de un grupo que consiste de enlaces de fosfodiésteres, enlaces de fosforotioatos y enlaces de péptidos.
- 20 97. El método del elemento 90, donde por lo menos algunos de dicho nucleótido son seleccionados de un grupo que consiste de derivados de nucleótidos.
98. El método del elemento 97, donde los derivados de nucleótidos son seleccionados de un grupo que consiste de derivados de ácidos deoxirribonucleicos y derivados de ácidos ribonucleicos.
- 25 99. El método del elemento 90, donde las subunidades de los elementos complementarios son seleccionadas de un grupo que consiste de nucleótidos, derivados de nucleótidos y análogos de nucleótidos en los cuales uno o más de una partícula base y/o una partícula de fosfato y/o una partícula de ribosa y/o una partícula de deoxirribosa ha sido sustituida por una entidad molecular alterna.
- 30 100. El método del elemento 99, donde las subunidades del elemento codificador capaces de interactuar con dichas subunidades de los elementos complementarios comprenden o consisten esencialmente de nucleótidos seleccionados de un grupo que consiste de secuencias de ADN, de ARN, de PNA, de LNA y de morfolidos, incluyendo a cualquiera de sus análogos o derivados.
- 35 101. El método del elemento 93, donde dicho derivado de nucleótido es enlazado a un nucleótido o análogo de nucleótido cercano, por medio de un enlace químico covalente.
- 40 102. El método del elemento 93, donde dicho derivado de nucleótido es enlazado a cada nucleótido o análogo de nucleótido cercano por medio de un enlace químico covalente.
103. El método de cualquiera de los elementos 97 y 98, donde dicho enlace químico covalente es seleccionado de un grupo de enlaces covalentes que consiste de enlaces de fosfodiésteres, enlaces de fosforotioatos y enlaces de péptidos.
- 45 104. El método del elemento 1, donde los elementos complementarios son seleccionados de nucleótidos, y los elementos complementarios son enlazados enzimáticamente.
- 50 105. El método de acuerdo al elemento 100, donde la enzima es seleccionada de un grupo que consiste de polimerasas de ADN y de ARN que dependen de la plantilla, incluyendo a transcriptasas reversas, ligasas de ADN y ligasas de ARN, ribozimas y deoxirribozimas, incluyendo a la transcriptasa reversa de VIH-1, la transcriptasa reversa de AMV, la polimerasa de ARN de T7, la polimerasa mutante Y639F de ARN de T7, Secuenasas, la polimerasa de ADN de Taq, el fragmento de Klenow (un fragmento grande de polimerasa I de ADN), ligasas de ADN, polimerasas de ADN de T7, polimerasas de ADN de T4, ligasas de ADN de T4, polimerasas de ARN de E colli, polimerasa de ADN de rTh, polimerasas de ADN de Vent, polimerasas de ADN de Pfu, polimerasas de ADN de Tte, polimerasas de reparación y ribozimas con actividades de ligasas o replicasas.
- 55 106. El método del elemento 105, donde la enzima es seleccionada de un grupo que consiste de transcriptasas reversas de VIH-1, transcriptasas reversas de AMV, polimerasas de ARN de T7, polimerasas mutantes Y639F de ARN de T7, Secuenasas, polimerasas de ADN de Taq, el fragmento de Klenow (un fragmento grande de polimerasa I de ADN), ligasas de ADN, polimerasas de ADN de T7, polimerasas de ADN de T4, y ligasas de ADN de T4.
- 60 107. El método de cualquiera de los elementos 104 a 106, donde los nucleótidos forman una plantilla complementaria en el momento de su incorporación.
- 65

108. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 104 a 107, donde el cebador es recosido a un lugar de cebado de la plantilla y una polimerasa o transcriptasa adecuada se extiende al cebador por medio de la incorporación de bloques de construcción para obtener una plantilla complementaria.
- 5 109. El método de acuerdo al elemento 108, donde el bloque de construcción es un derivado de un mono-, di- u oligonucleótido.
110. El método de acuerdo al elemento 109, donde el bloque de construcción es un derivado de un mononucleótido.
- 10 111. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 109 a 110, donde la entidad funcional está adherida a la partícula de la base nitrogenada a través de un enlazador.
112. El método de acuerdo al elemento 107, donde el enlazador comprende un enlace triple.
- 15 113. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 108 a 112, donde el bloque de construcción está diseñado para que la entidad funcional sobresalga y se introduzca adentro de la ranura mayor de la hélice del ácido nucleico, cuando se incorpora en una plantilla complementaria.
- 20 114. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 104 a 106, donde los elementos complementarios son seleccionados de oligonucleótidos y los elementos complementarios son enlazados enzimáticamente utilizando una ligasa.
115. El método de acuerdo al elemento 114, donde los oligonucleótidos del elemento complementario cada uno comprenden 3 o más monómeros de ácidos nucleicos.
- 25 116. El método de acuerdo al elemento 115, donde el elemento complementario es un oligonucleótido que comprende a desde 4 a 100 monómeros de ácidos nucleicos.
117. El método de acuerdo al elemento 1, donde un elemento complementario recose al elemento codificador, sin acoplarse a otro elemento complementario.
- 30 118. El método de acuerdo al elemento 117, donde el elemento complementario comprende un oligonucleótido que tiene desde 6 a 100 monómeros de nucleótidos.
- 35 119. El método de acuerdo al elemento 119, donde el oligonucleótido tiene desde 10 a 50 monómeros de nucleótidos.
120. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 114 a 119, donde la longitud es de por lo menos la mitad de la longitud del elemento complementario.
- 40 121. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 114 a 120, donde el enlazador comprende a un oligonucleótido.
- 45 122. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 118 a 121, donde el elemento complementario del oligonucleótido y el enlazador del oligonucleótido es un oligonucleótido continuo.
123. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 121 a 122, donde los 2 enlazadores de diferentes bloques de construcción cada uno contienen una parte de una pareja molecular, donde dicha pareja molecular es capaz de una interacción reversible.
- 50 124. El método de acuerdo al elemento 123, donde la pareja molecular comprende a una secuencia de doble hebra de ácidos nucleicos que forman un dominio de dimerización en los enlazadores.
125. El método de acuerdo al elemento 123 a 124, donde la parte del dominio de dimerización de un enlazador que está cerca de la entidad funcional.
- 55 126. El método de acuerdo al elemento 124 o 125, donde la secuencia de los monómeros de ácidos nucleicos que forman la una parte de la pareja molecular es separada con 2, 1, o 0 monómeros de ácidos nucleicos de la entidad funcional.
- 60 127. El método de acuerdo al elemento 126, donde la entidad funcional está adherida directamente al dominio de dimerización.
128. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 123 a 127, donde la secuencia de monómeros de ácidos nucleicos comprende a desde 3 a 20 ácidos mononucleicos.
- 65 129. El método de acuerdo al elemento 128, donde la secuencia comprende a desde 3 a 15 monómeros de ácidos

nucleicos.

130. El método de acuerdo al elemento 129, donde la secuencia comprende a desde 4 a 12 monómeros de ácidos nucleicos.

131. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 114 a 130, donde la entidad funcional está adherida a una base nitrogenada del enlazador de oligonucleótidos.

132. El método de acuerdo al elemento 131, donde la entidad funcional está adherida a un nucleótido terminal del enlazador.

133. El método del elemento 1, donde los elementos complementarios son seleccionados de nucleótidos, y los elementos complementarios son enlazados al usar un agente químico, un cambio de pH, luz, un catalizador, radiación, tal como radiación electromagnética, o por medio de acoplamientos espontáneos cuando se los pone en un contacto reactivo entre sí.

134. El método de acuerdo al elemento 133, donde el agente químico comprende un grupo de fosfoimidazolidas.

135. El método de acuerdo al elemento 133 y 134, donde el grupo de fosfoimidazolidas está adherido al extremo 5' del bloque de construcción y el bloque de construcción está enlazado a una plantilla complementaria naciente en su grupo hidroxilo de 3'.

136. El método del elemento 1, donde por lo menos un subconjunto de dicha pluralidad de bloques de construcción comprende, preferiblemente, a un elemento complementario y/o una entidad funcional y/o un enlazador.

137. El método del elemento 1, donde un subconjunto de dicha pluralidad de bloques de construcción comprende a un enlazador selectivamente separable que divide a la entidad funcional del elemento complementario, donde dicho enlazador selectivamente separable no es divisible bajo condiciones que resultan en la separación de enlazadores separables que dividen a la entidad funcional del elemento complementario de bloques de construcción no pertenecen a un subconjunto de bloques de construcción que comprenden a un enlazador selectivamente separable.

138. El método de acuerdo al elemento 102, donde la entidad funcional es liberada al dividir a enlazadores separables de tal forma que no aparezcan vestigios del enlazador en la entidad funcional.

139. El método del elemento 137 o 138, donde los enlazadores separables son divididos, y donde el por lo menos un enlazador selectivamente separable no es separado, y donde la molécula modelada es enlazada a la plantilla y/o al elemento complementario por medio de dicho enlazador selectivamente separable.

140. El método de los elementos 138 a 139, donde los enlazadores son separados por medio de ácidos, bases, agentes químicos, luz, radiación electromagnética, una enzima o un catalizador.

141. El método de acuerdo al elemento 140, donde el enlazador separado por luz comprende a una partícula de nitrofenilo.

142. El método del elemento 1, donde la longitud del enlazador o del enlazador selectivamente separable está en el rango de desde alrededor de 0.8 Å a alrededor de 70 Å, tal como en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 60 Å, por ejemplo en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 50 Å, tal como en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 40 Å, por ejemplo en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 30 Å, tal como en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 25 Å, por ejemplo en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 20 Å, tal como en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 18 Å, por ejemplo en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 16 Å, tal como en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 14 Å, por ejemplo en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 12 Å, tal como en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 10 Å, por ejemplo en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 8 Å, tal como en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 7 Å, por ejemplo en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 6 Å, tal como en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 5 Å, por ejemplo en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 4 Å, tal como en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 3.5 Å, por ejemplo en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 3.0 Å, tal como en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 2.5 Å, por ejemplo en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 2.0 Å, tal como en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 1.5 Å, por ejemplo en el rango de desde 0.8 Å a alrededor de 1.0 Å.

143. El método del elemento 1, donde la longitud del enlazador o del enlazador selectivamente separable está en el rango de desde alrededor de 1.0 Å a alrededor de 60 Å, tal como en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 40 Å, por ejemplo en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 30 Å, tal como en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 25 Å, por ejemplo en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 20 Å, tal como en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 18 Å, por ejemplo en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 16 Å, tal como en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 14 Å, por ejemplo en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 12 Å, tal como en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 10 Å, por ejemplo en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 8 Å, tal como en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 7 Å, por ejemplo en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 6 Å, tal como en el rango de desde 1.0 Å

a alrededor de 5 Å, por ejemplo en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 4 Å, tal como en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 3.5 Å, por ejemplo en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 3.0 Å, tal como en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 2.5 Å, por ejemplo en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 2.0 Å, tal como en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 1.5 Å, por ejemplo en el rango de desde 1.0 Å a alrededor de 1.2 Å.

5 144. El método del elemento 1, donde la longitud del enlazador o del enlazador selectivamente separable está en el rango de desde alrededor de 2 Å a alrededor de 40 Å, tal como en el rango de desde 2 Å a alrededor de 30, tal como en el rango de desde 2 Å a alrededor de 25 Å, por ejemplo en el rango de desde 2 Å a alrededor de 20 Å, tal como en el rango de desde 2 Å a alrededor de 18 Å, por ejemplo en el rango de desde 2 Å a alrededor de 16 Å, tal como en el rango de desde 2 Å a alrededor de 14 Å, por ejemplo en el rango de desde 2 Å a alrededor de 12 Å, tal como en el rango de desde 2 Å a alrededor de 10 Å, por ejemplo en el rango de desde 2 Å a alrededor de 8 Å, tal como en el rango de desde 2 Å a alrededor de 7 Å, por ejemplo en el rango de desde 2 Å a alrededor de 6 Å, tal como en el rango de desde 2 Å a alrededor de 5 Å, por ejemplo en el rango de desde 2 Å a alrededor de 4 Å, tal como en el rango de desde 2.0 Å a alrededor de 3.5 Å, por ejemplo en el rango de desde 2 Å a alrededor de 3.0 Å, tal como en el rango de desde 2 Å a alrededor de 2.5 Å, por ejemplo en el rango de desde 2.0 Å a alrededor de 2.2 Å.

145. El método del elemento 1, donde la longitud del enlazador o del enlazador selectivamente separable está en el rango de desde alrededor de 4 Å a alrededor de 40 Å, tal como en el rango de desde 4 Å a alrededor de 30 Å, tal como en el rango de desde 4 Å a alrededor de 25 Å, por ejemplo en el rango de desde 4 Å a alrededor de 20 Å, tal como en el rango de desde 4 Å a alrededor de 18 Å, por ejemplo en el rango de desde 4 Å a alrededor de 16 Å, tal como en el rango de desde 4 Å a alrededor de 14 Å, por ejemplo en el rango de desde 4 Å a alrededor de 12 Å, tal como en el rango de desde 4 Å a alrededor de 10 Å, por ejemplo en el rango de desde 4 Å a alrededor de 8 Å, tal como en el rango de desde 4 Å a alrededor de 7 Å, por ejemplo en el rango de desde 4 Å a alrededor de 6 Å, tal como en el rango de desde 4 Å a alrededor de 5 Å.

146. El método del elemento 1, donde la longitud del enlazador o del enlazador selectivamente separable está en el rango de desde alrededor de 6 Å a alrededor de 40 Å, tal como en el rango de desde 6 Å a alrededor de 30 Å, tal como en el rango de desde 6 Å a alrededor de 25 Å, por ejemplo en el rango de desde 6 Å a alrededor de 20 Å, tal como en el rango de desde 6 Å a alrededor de 18 Å, por ejemplo en el rango de desde 6 Å a alrededor de 16 Å, tal como en el rango de desde 6 Å a alrededor de 14 Å, por ejemplo en el rango de desde 6 Å a alrededor de 12 Å, tal como en el rango de desde 6 Å a alrededor de 10 Å, por ejemplo en el rango de desde 6 Å a alrededor de 8 Å, tal como en el rango de desde 6 Å a alrededor de 7 Å.

147. El método del elemento 1, donde la longitud del enlazador o del enlazador selectivamente separable está en el rango de desde alrededor de 8 Å a alrededor de 40 Å, tal como en el rango de desde 8 Å a alrededor de 30 Å, tal como en el rango de desde 8 Å a alrededor de 25 Å, por ejemplo en el rango de desde 8 Å a alrededor de 20 Å, tal como en el rango de desde 8 Å a alrededor de 18 Å, por ejemplo en el rango de desde 8 Å a alrededor de 16 Å, tal como en el rango de desde 8 Å a alrededor de 14 Å, por ejemplo en el rango de desde 8 Å a alrededor de 12 Å, tal como en el rango de desde 8 Å a alrededor de 10 Å.

148. El método de acuerdo al elemento 1, donde la molécula modelada obtenida comprende a una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, por medio de una reacción que involucra a grupos reactivos, a un grupo funcional de por lo menos una entidad funcional y a un grupo funcional de una entidad funcional cercana.

149. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 1 al 148, donde la molécula modelada es una secuencia lineal de grupos funcionales.

150. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 1 al 148, donde la molécula modelada es una secuencia ramificada de grupos funcionales.

151. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 1 al 148, donde la molécula modelada es una secuencia cíclica de grupos funcionales.

152. El método del elemento 1, donde la molécula modelada es un oligómero o polímero que contiene a por lo menos una secuencia repetitiva de grupos funcionales.

153. El método del elemento 152, donde la secuencia de por lo menos 3 grupos funcionales es repetida por lo -2 veces en la molécula modelada.

154. El método del elemento 152, donde cualquier secuencia de por lo menos 3 grupos funcionales en la molécula modelada ocurre solamente una vez.

155. El método del elemento 1, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de aminoácidos seleccionados de un grupo que consiste de  $\alpha$ -aminoácidos,  $\beta$ -aminoácidos,  $\gamma$ -aminoácidos,  $\omega$ -aminoácidos.

156. El método del elemento 1, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de residuos de

aminoácidos naturales.

- 5 157. El método del elemento 1, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de  $\alpha$ -aminoácidos.
158. El método del elemento 1, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de  $\alpha$ -aminoácidos mono sustituidos.
- 10 159. El método del elemento 1, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de  $\alpha$ -aminoácidos di-sustituidos.
160. El método del elemento 1, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de  $\beta$ -aminoácidos monosustituidos.
- 15 161. El método del elemento 1, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de  $\beta$ -aminoácidos di-sustituidos.
162. El método del elemento 1, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de  $\beta$ -aminoácidos tri-sustituidos.
- 20 163. El método del elemento 1, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de  $\beta$ -aminoácidos tetrasustituidos.
164. El método de cualquiera de los elementos 115 a 118, donde la estructura esencial de dichos  $\beta$ - aminoácidos comprende o consiste esencialmente de una estructura cíclica hexana y/o ciclopentana.
- 25 165. El método del elemento 1, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de  $\gamma$ -aminoácidos.
- 30 166. El método del elemento 1, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de  $\omega$ -aminoácidos.
167. El método del elemento 1, donde la molécula comprende o consiste esencialmente de aminoácidos vinílogos.
- 35 168. El método del elemento 1, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de glicinas N-sustituidas.
169. El método del elemento 1, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de moléculas o entidades moleculares seleccionadas de un grupo de  $\alpha$ -péptidos,  $\beta$ -péptidos,  $\gamma$ -péptidos,  $\omega$ -péptidos;  $\alpha$ -péptidos,  $\beta$ -péptidos,  $\gamma$ -péptidos,  $\omega$ -péptidos mono-, di-, y tri- sustituidos, donde los residuos de aminoácidos están en la forma L- o en la forma D-, polipéptidos vinílogos, glicopoli-péptidos, poliamidas, péptidos de sulfonamidas vinílogas, polisulfonamidas, péptidos conjugados que comprenden a, por ejemplo, grupos prostéticos, poliésteres, polisacáridos, policarbamatos, policarbonatos, poliureas, polipeptidilfosfonatos, poliuretanos, azatidas, glicinas oligos N-sustituidos, poliéteres, oligómeros de etoxiformacetales, poli-tioéteres, polietilenglicoles (PEG), polietilenos, polidisulfuros, sulfuros de poliarilenos, polinucleótidos, PNAs, LNAs, morfolinos, oligopirrolinonas, polioximas, poliiiminas, polietileniminas, poliimididas, poliacetales, poliacetatos, poliestirenos, polivinilos, lípidos, fosfolípidos, glicolípidos, compuestos policíclicos que comprenden a, por ejemplo, ciclos alifáticos o aromáticos, incluyendo compuestos poliheterocíclicos, proteoglicanos, y polisiloxanos, incluyendo cualquiera de sus combinaciones.
- 40 170. El método del elemento 1, donde los residuos cercanos de la molécula modelada están enlazados por medio de un enlace químico seleccionado de un grupo de enlaces químicos que consisten de enlaces de péptidos, enlaces de sulfonamidas, enlaces de ésteres, enlaces de sacáridos, enlaces de carbamatos, enlaces de carbonatos, enlaces de ureas, enlaces de fosfonatos, enlaces de uretanos, enlaces de azatidas, enlaces de peptóides, enlaces de éteres, enlaces de etoxis, enlaces de tioéteres, enlaces carbonos individuales, enlaces carbono dobles, enlaces carbonos triples, enlaces de disulfuros, enlaces de sulfuros, enlaces de fosfodiésteres, enlaces de oximas, enlaces de iminas, enlaces de imidas, incluyendo cualquiera de sus combinaciones.
- 50 171. El método de acuerdo al elemento 170, donde el enlace químico que vincula a las entidades funcionales de 2 o más bloques de construcción se forma por medio de una reacción de un grupo de nucleófilos de una primera entidad funcional con un éster o tioéster de otra entidad funcional.
- 60 172. El método de acuerdo al elemento 171, donde el enlazador del bloque de construcción que porta al grupo tioéster es separado simultáneamente con la formación de los enlaces que resultan en una transferencia del grupo funcional al bloque de construcción nucleofílico.
- 65 173. El método de acuerdo al elemento 171 y 172, donde el grupo nucleofílico es seleccionado de -NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>NHN-

,HOHN-, H2N-C(O)-NH-.

- 5 174. El método del elemento 1, donde la estructura esencial de dicha molécula modelada comprende o consiste esencialmente de un grupo molecular seleccionado de -NHN(R)CO-; -NHB(R)CO-; -NHC(RR')CO-; -NHC(=CHR)CO-; -NHC6H4CO-; -NHCH2 CHRCO-; -NHCHRCH2 CO-; -COCH2-; -COS-; -CONR-; -COO-; -CSNH-; -CH2 NH- ; -CH2CH2-; -CH2S-; -CH2 SO-; -CH2SO2-; -CH(CH3)S-; -CH=CH-; -NHCO-; -NHCONH-; -CONHO-; -C(=CH2)CH2-; PO2-NH-; -PO2-CH2-; -PO2-CH2N+-; -SO2NH--; y lactámicos.
- 10 175. El método del elemento 1, donde la entidad funcional es seleccionada de un grupo de precursores seleccionados de precursores de  $\alpha$ - aminoácidos, precursores de  $\beta$ - aminoácidos, precursores de  $\gamma$ - aminoácidos y precursores de  $\omega$ -aminoácidos.
- 15 176. El método del elemento 175, donde el precursor de  $\beta$ -aminoácidos es un derivado de una estructura anular de N-carboxianhídrido.
- 20 177. El método del elemento 171, donde el precursor del  $\beta$ -aminoácidos es un derivado de la estructura anular de tiocarboxianhídrido (NTA).
- 25 178. El método de acuerdo al elemento 1, donde un grupo funcional de por lo menos una entidad funcional es enlazada a otra entidad funcional por medio de una molécula de conexión.
- 30 179. El método de acuerdo al elemento 178, donde las entidades funcionales son cercanas.
- 35 180. El método del elemento 1, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de por lo menos 2 grupos funcionales diferentes, tales como 3 grupos funcionales diferentes, por ejemplo por lo menos 4 grupos funcionales diferentes, tal como por lo menos 5 grupos funcionales diferentes, por ejemplo por lo menos 6 grupos funcionales diferentes, tal como por lo menos 7 grupos funcionales diferentes, por ejemplo por lo menos 8 grupos funcionales diferentes, tal como por lo menos 9 grupos funcionales diferentes, por ejemplo por lo menos 10 grupos funcionales diferentes, tal como más de 10 grupos funcionales diferentes.
- 40 181. El método del elemento 180, donde los grupos funcionales son idénticos.
- 45 182. El método del elemento 1, donde cada bloque de construcción comprende a por lo menos un grupo reactivo de tipo I.
- 50 183. El método de acuerdo al elemento 1, donde cada bloque de construcción comprende a por lo menos un grupo reactivo tipo II.
- 55 184. El método del elemento 182, donde cada bloque de construcción comprende a 2 grupos reactivos tipo I.
- 60 185. El método del elemento 183, donde cada bloque de construcción comprende a 2 grupos reactivos tipo II.
- 65 186. El método de acuerdo al elemento 185, donde por lo menos un bloque de construcción comprende a 3 o más, tal como 4 o más grupos reactivos tipo II.
187. El método de acuerdo a los elementos 185 o 186, donde los grupos reactivos tipo II son similares.
188. El método de acuerdo a los elementos 185 o 186, donde los grupos reactivos tipo II son compañeros de reacción
189. El método de acuerdo a los elementos 187 o 188, donde los grupos reactivos tipo II son capaces de formar un enlace entre los grupos funcionales a través de una molécula de conexión.
190. El método de acuerdo al elemento 189, donde la molécula de conexión es un compuesto di-funcional con grupos reactivos que son compañeros de reacción en relación a los grupos reactivos tipo II de las entidades funcionales.
191. El método de acuerdo al elemento 185, donde los grupos reactivos tipo II no son similares.
192. El método de acuerdo al elemento 191, donde los grupos reactivos tipo II que no son similares son compañeros de reacción.
193. El método de acuerdo al elemento 191 o 192, donde los grupos reactivos tipo II son capaces de formar un enlace entre los grupos funcionales a través de una molécula de conexión.
194. El método de acuerdo al elemento 191, donde la molécula de conexión es un compuesto di-funcional con

grupos reactivos que son compañeros de reacción en relación a los grupos reactivos tipo II de las entidades funcionales.

- 5 195. El método de cualquiera de los elementos 182 a 194, donde el por lo menos un grupo reactivo tipo II de la entidad funcional es seleccionado de un grupo que consiste de N-carboxianhídrido (NCA), N-tiocarboxianhídrido (NTA), cumarina, amine, ácido carboxílico, cetona, aldehído, hidroxilo, tiol, éster, tioéster, alquenilo, cualquier sistema conjugado de enlaces dobles, hidracina, éster de N-hidroxisuccinimida, un epóxido.
- 10 196. El método de los elementos 178 a 190, donde el grupo reactivo tipo II es un electrófilo.
197. El método de acuerdo al elemento 191, donde el grupo reactivo tipo II es un electrófilo seleccionado de un grupo que consiste de  $-X-C(O)R$ ,  $-X-C(O)-CHR-C(O)-R$ ,  $-X-C(O)-CR=CH-R$ , y  $-X-C(O)-CHR-NHR$ , donde X es un S u O, y R es independientemente un grupo funcional.
- 15 198. El método de los elementos 183 a 195, donde el grupo reactivo tipo II es un nucleótido.
199. El método de acuerdo al elemento 198, donde el grupo reactivo tipo II es un nucleótido seleccionado de un grupo que consiste de  $-NH_2$ ,  $H_2NHN-$ ,  $HOHN-$ , y  $H_2N-C(O,S)NH-$ .
- 20 200. El método de los elementos 183 a 195, donde el grupo reactivo tipo II es un radical.
201. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos anteriores, donde la entidad funcional comprende a un grupo reactivo tipo II conectado al enlazador.
- 25 202. El método de acuerdo al elemento 201, donde dicha entidad funcional comprende además a por lo menos un grupo reactivo tipo II adicional.
- 30 203. El método de acuerdo al elemento 202, donde la entidad funcional que comprende de por lo menos un grupo reactivo tipo II adicional es capaz de formar un enlace a una 2ª entidad funcional que tiene un grupo reactivo tipo II separado entre dicha entidad funcional y el enlazador, por medio de una reacción que involucra al grupo reactivo tipo II en dicha entidad funcional adicional.
- 35 204. El método de acuerdo al elemento 203, donde el enlace entre la 2ª entidad funcional y el enlazador es separada lo cual resulta en una translocación del grupo funcional de la 2ª entidad funcional a la primera entidad funcional.
205. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 201 a 204, donde el enlace entre la primera y 2ª entidad funcional se forma por medio de una reacción directa para con sus grupos reactivos tipo II respectivos.
- 40 206. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 201 a 204, donde el enlace entre la primera y 2ª entidad funcional son formadas a través de una molécula de conexión.
207. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos anteriores, donde varios grupos funcionales son enlazados por medio de una secuencia de reacciones que involucran a una pluralidad de bloques de construcción.
- 45 208. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 201 a 207, donde varios grupos funcionales son enlazados por medio de una secuencia de reacciones que involucra una pluralidad de bloques de construcción, donde cada uno de dichos bloques de construcción comprenden a una entidad funcional que tiene a un primer grupo reactivo tipo II conectado al enlazador, donde dicha entidad funcional comprende a por lo menos un grupo reactivo tipo II adicional.
- 50 209. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos anteriores, donde la entidad funcional es restringida en lo que se refiere a la rotación para obtener una orientación preferida durante la formación de enlaces a las otras entidades funcionales.
- 55 210. El método de acuerdo al elemento 209, donde uno o más enlaces que vinculan a la entidad funcional al elemento complementario son fijados en relación a su rotación.
- 60 211. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 209 y 210, donde la orientación preferida es obtenida al acoplar a la entidad funcional a la base, así como a la partícula de (deoxi)ribosa de un bloque de construcción de nucleótidos.
212. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 209 a 211, donde la entidad funcional es acoplada a 2 bases de un dinucleótido.
- 65 213. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos anteriores, donde la formación de la molécula modelada involucra a los grupos reactivos tipo II capaces de formar un polímero a través de una polimerización aniónica,

catiónica o radical.

214. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos anteriores, que comprenden a una entidad funcional portadora que comprende a uno o más grupos reactivos tipo II, donde dicha entidad funcional portadora es la estructura química básica para formar a una molécula modelada por medio de la adición de grupos funcionales que emanan de la pluralidad de bloques de construcción.

215. El método de acuerdo al elemento 214, donde la entidad funcional portadora comprende a 2 o más grupos reactivos tipo II.

216. El método de acuerdo al elemento 214 o 215, donde la entidad funcional portadora es enlazada covalentemente a la plantilla.

217. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 214 a 215, donde la entidad funcional portadora es enlazada a un elemento complementario capaz de reconocer a un elemento codificador de la plantilla.

218. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 214 a 217, donde los bloques de construcción adheridos a la plantilla comprenden a entidades funcionales que portan a los grupos reactivos tipo II capaces de formar a un enlace a la entidad funcional portadora.

219. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 214 a 218, donde una mezcla de enlaces de grupos funcionales a la entidad funcional portadora es obtenida al tener un número diferente grupos reactivos tipo II en la entidad funcional portadora en comparación al número de grupos reactivos tipo II en las entidades funcionales de la pluralidad de bloques de construcción.

220. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos 214 a 219, donde la reacción de los grupos reactivos tipo II en el portador y los grupos reactivos tipo II correspondientes en los bloques de construcción resultan en un enlace simultáneo de los grupos funcionales en relación a la entidad funcional portadora y una separación del enlazador que conecta a la entidad funcional con el elemento complementario.

221. El método de acuerdo a cualquiera de los elementos anteriores, donde se utiliza una pluralidad de plantillas que tienen diferentes elementos codificadores y/o diferente orden de elementos de codificación.

222. El método de acuerdo al elemento 221, donde 2 o más plantillas diferentes son utilizadas.

223. El método de acuerdo al elemento 221 o 222, donde 4 o más plantillas diferentes, tal como más de  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$ ,  $10^9$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{13}$ ,  $10^{15}$ ,  $10^{17}$  plantillas diferentes son utilizadas.

224. El método de acuerdo al elemento 221, donde la pluralidad de diferentes plantillas resulta en una biblioteca de diferentes moléculas modeladas, donde cada molécula modelada es conectada a la plantilla o plantilla complementaria específica que modelo a la molécula.

225. El método de cualquiera de los elementos anteriores que comprende el paso adicional de liberar a la plantilla o a la plantilla complementaria de la molécula modelada, y obtener una molécula modelada que no está enlazada a la plantilla complementaria o a la plantilla que modelo la síntesis de la molécula modelada.

226. Una molécula modelada que se puede obtener de acuerdo a cualquiera de los elementos 1 a 225, una pluralidad de grupos funcionales enlazados donde cada uno comprende un residuo, donde los residuos enlazados covalentemente son capaces de generar a un polímero que comprende, exclusivamente o en combinación con porciones adicionales, a por lo menos una porción seleccionada de un grupo de porciones poliméricas que consisten de  $\alpha$ -péptidos,  $\beta$ -péptidos,  $\gamma$ -péptidos,  $\omega$ -péptidos;  $\alpha$ -péptidos,  $\beta$ -péptidos,  $\gamma$ -péptidos,  $\omega$ -péptidos, mono-, di-, y tri-sustituídos donde los residuos de aminoácidos están en la forma de L- o en la forma de D-, polipéptidos vinílogos, glicopoli-péptidos, poliamidas, péptidos vinílogos de sulfonamidas, polisulfonamidas, péptidos conjugados que comprenden a, por ejemplo, grupos prostéticos, poliésteres, polisacáridos, policarbamatos, policarbonatos, poliureas, polipeptidilfosfonatos, poliuretanos, azatidas, glicinas oligo N-sustituídas, poliéteres, oligómeros de etoxiformacetales, poli-tioéteres, polietilenglicoles (PEG), polietilenos, polidisulfuros, sulfuros de poliarilenos, polinucleótidos, PNAs, LNAs, morfolinós, pirrolinonas de oligos, polioximas, poliiminas, polietileniminas, poliimidaz, poliacetatos, poliestirenos, polivinilos, lípidos, fosfolípidos, glicolípidos, compuestos policíclicos que comprenden a, por ejemplo, ciclos alifáticos o aromáticos, incluyendo a compuestos poliheterocíclicos, proteoglicanos y polisiloxanos, y donde la pluralidad de residuos es preferiblemente desde 2 a 200, por ejemplo desde 2 a 100, tal como desde 2 a 80, por ejemplo desde 2 a 60, tal como desde 2 a 40, por ejemplo desde 2 a 30, tal como desde 2 a 20, por ejemplo desde 2 a 15, tal como desde 2 a 10, tal como desde 2 a 8, por ejemplo desde 2 a 6, tal como desde 2 a 4, por ejemplo 2, tal como desde 3 a 100, por ejemplo desde 3 a 80, tal como desde 3 a 60, tal como desde 3 a 40, por ejemplo desde 3 a 30, tal como desde 3 a 20, tal como desde 3 a 15, por ejemplo desde 3 a 10, tal como desde 3 a 8, por ejemplo desde 3 a 6, tal como desde 3 a 4, por ejemplo 3, tal como desde 4 a 100, por ejemplo desde 4 a 80, tal como desde 4 a 60, tal como desde 4 a 40, por ejemplo desde

4 a 30, tal como desde 4 a 20, tal como desde 4 a 15, por ejemplo desde 4 a 10, tal como desde 4 a 8, tal como desde 4 a 6, por ejemplo 4, por ejemplo desde 5 a 100, tal como desde 5 a 80, por ejemplo desde 5 a 60, tal como desde 5 a 40, por ejemplo desde 5 a 30, tal como desde 5 a 20, por ejemplo desde 5 a 15, tal como desde 5 a 10, tal como desde 5 a 8, por ejemplo desde 5 a 6, por ejemplo 5, tal como desde 6 a 100, por ejemplo desde 6 a 80, tal como desde 6 a 60, tal como desde 6 a 40, por ejemplo desde 6 a 30, tal como desde 6 a 20, tal como desde 6 a 15, por ejemplo desde 6 a 10, tal como desde 6 a 8, tal como 6, por ejemplo desde 7 a 100, tal como desde 7 a 80, por ejemplo desde 7 a 60, tal como desde 7 a 40, por ejemplo desde 7 a 30, tal como desde 7 a 20, por ejemplo desde 7 a 15, tal como desde 7 a 10, tal como desde 7 a 8, por ejemplo 7, por ejemplo desde 8 a 100, tal como desde 8 a 80, por ejemplo desde 8 a 60, tal como desde 8 a 40, por ejemplo desde 8 a 30, tal como desde 8 a 20, por ejemplo desde 8 a 15, tal como desde 8 a 10, tal como 8, por ejemplo 9, por ejemplo desde 10 a 100, tal como desde 10 a 80, por ejemplo desde 10 a 60, tal como desde 10 a 40, por ejemplo desde 10 a 30, tal como desde 10 a 20, por ejemplo desde 10 a 15, tal como desde 10 a 12, tal como 10, por ejemplo desde 12 a 100, tal como desde 12 a 80, por ejemplo desde 12 a 60, tal como desde 12 a 40, por ejemplo desde 12 a 30, tal como desde 12 a 20, por ejemplo desde 12 a 15, tal como desde 14 a 100, tal como desde 14 a 80, por ejemplo desde 14 a 60, tal como desde 14 a 40, por ejemplo desde 14 a 30, tal como desde 14 a 20, por ejemplo desde 14 a 16, tal como desde 16 a 100, tal como desde 16 a 80, por ejemplo desde 16 a 60, tal como desde 16 a 40, por ejemplo desde 16 a 30, tal como desde 16 a 20, tal como desde 18 a 100, tal como desde 18 a 80, por ejemplo desde 18 a 60, tal como desde 18 a 40, por ejemplo desde 18 a 30, tal como desde 18 a 20, por ejemplo desde 20 a 100, tal como desde 20 a 80, por ejemplo desde 20 a 60, tal como desde 20 a 40, por ejemplo desde 20 a 30, tal como desde 20 a 25, por ejemplo desde 22 a 100, tal como desde 22 a 80, por ejemplo desde 22 a 60, tal como desde 22 a 40, por ejemplo desde 22 a 30, tal como desde 22 a 25, por ejemplo desde 25 a 100, tal como desde 25 a 80, por ejemplo desde 25 a 60, tal como desde 25 a 40, por ejemplo desde 25 a 30, tal como desde 30 a 100, por ejemplo desde 30 a 80, tal como desde 30 a 60, por ejemplo desde 30 a 40, tal como desde 30 a 35, por ejemplo desde 35 a 100, tal como desde 35 a 80, por ejemplo desde 35 a 60, tal como desde 35 a 40, por ejemplo desde 40 a 100, tal como desde 40 a 80, por ejemplo desde 40 a 60, tal como desde 40 a 50, por ejemplo desde 40 a 45, tal como desde 45 a 100, por ejemplo desde 45 a 80, tal como desde 45 a 60, por ejemplo desde 45 a 50, tal como desde 50 a 100, por ejemplo desde 50 a 80, tal como desde 50 a 60, por ejemplo desde 50 a 55, tal como desde 60 a 100, por ejemplo desde 60 a 80, tal como desde 60 a 70, por ejemplo desde 70 a 100, tal como desde 70 a 90, por ejemplo desde 70 a 80, tal como desde 80 a 100, por ejemplo desde 80 a 90, tal como desde 90 a 100.

227. La molécula modelada de acuerdo al elemento 226, donde la molécula modelada es un polímero.
228. La molécula modelada de acuerdo al elemento 227, donde el polímero es lineal.
229. La molécula modelada de acuerdo al elemento 227, donde el polímero es ramificado.
230. La molécula modelada de acuerdo al elemento 226 a 229, donde los residuos enlazados covalentemente son capaces de generar a un polímero que comprende, exclusivamente o en combinación con porciones adicionales seleccionadas de un grupo de, por lo menos una porción seleccionada de un grupo de porciones poliméricas que consisten de  $\alpha$ -péptidos,  $\beta$ -péptidos,  $\gamma$ -péptidos,  $\omega$ -péptidos;  $\alpha$ -péptidos,  $\beta$ -péptidos,  $\gamma$ -péptidos,  $\omega$ -péptidos mono-, di-, y tri- sustituidos, péptidos donde los residuos de aminoácidos están en la forma de L- o en la forma de D-, y polipéptidos vinílogos.
231. La molécula modelada de acuerdo a los elementos 226 a 230, donde los residuos enlazados covalentemente son capaces de generar a un polisacárido.
232. Una molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos 226 a 231, que comprende a una secuencia de grupos funcionales, donde los grupos funcionales cercanos están enlazados por medio de una partícula molecular que no es asociada naturalmente con dichos grupos funcionales.
233. Una molécula modelada que comprende a una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada no comprende o consiste de un  $\alpha$ -péptido o un nucleótido.
234. Una molécula modelada que comprende a una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada no comprende o consiste de un  $\alpha$ -péptido o un nucleótido monosustituido.
235. Una molécula modelada que comprende a una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada no comprende o consiste de un péptido o un nucleótido.
236. Una composición modelada de moléculas preparadas de acuerdo a cualquiera de los elementos 221 a 224, donde dicha composición comprende a una pluralidad de más de o alrededor de  $10^3$  moléculas modeladas diferentes, tal como más de o alrededor de  $10^4$  moléculas modeladas diferentes, por ejemplo más de o alrededor de  $10^5$  moléculas modeladas diferentes, tal como más de o alrededor de  $10^6$  moléculas modeladas diferentes, por ejemplo más de o alrededor de  $10^7$  moléculas modeladas diferentes, tal como más de o alrededor de  $10^8$  moléculas modeladas diferentes, por ejemplo más de o alrededor de  $10^9$  moléculas modeladas diferentes, tal como más de o alrededor de  $10^{10}$  moléculas modeladas diferentes, por ejemplo más de o alrededor de  $10^{11}$  moléculas modeladas

- diferentes, tal como más de o alrededor de  $10^{12}$  moléculas modeladas diferentes, por ejemplo más de o alrededor de  $10^{13}$  moléculas modeladas diferentes, tal como más de o alrededor de  $10^{14}$  moléculas modeladas diferentes, por ejemplo más de o alrededor de  $10^{15}$  moléculas modeladas diferentes, tal como más de o alrededor de  $10^{16}$  moléculas modeladas diferentes, por ejemplo más de o alrededor de  $10^{17}$  moléculas modeladas diferentes, tal como más de o alrededor de  $10^{18}$  moléculas modeladas diferentes.
- 5
237. La composición de acuerdo al elemento 236, donde la pluralidad de moléculas modeladas es seleccionada de un grupo de moléculas modeladas definidas en cualquiera de los elementos 226 a 235.
- 10 238. La composición de acuerdo a cualquiera de los elementos 236 y 237, donde dicha composición comprende además a la plantilla capaz de modelar a cada molécula modelada, o uno de sus subconjuntos.
239. Una composición de acuerdo al elemento 238, donde la molécula modelada es enlazada a la plantilla capaz de modelar a la molécula modelada.
- 15 240. La composición de acuerdo al elemento 239, donde la molécula modelada es enlazada covalentemente a la plantilla.
241. La composición de acuerdo al elemento 239, donde la molécula modelada es enlazada no covalentemente a la plantilla.
- 20 242. La composición de acuerdo al elemento 241, donde el enlace no covalente involucra uno o más enlaces seleccionados de un grupo que consiste de enlaces de hidrógeno, enlaces de van der Waals, y enlaces iónicos.
243. Un complejo que comprende a una molécula modelada y a la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada.
- 25 244. La composición de acuerdo a cualquiera de los elementos 236 a 242, donde la plantilla no es un nucleótido natural, cuando la molécula modelada es un  $\alpha$ - péptido.
- 30 245. La composición de acuerdo a cualquiera de los elementos 236 a 242, donde la molécula modelada no es un  $\alpha$ - péptido que ocurre naturalmente.
246. La composición de acuerdo a cualquiera de los elementos 236 a 242, donde la molécula modelada no es un  $\alpha$ - péptido.
- 35 247. La composición de acuerdo al elemento 236 al 242, donde la plantilla no consiste exclusivamente de nucleótidos naturales, cuando la molécula modelada es un péptido que comprende exclusivamente a  $\alpha$ - aminoácidos monosustituídos.
- 40 248. La composición de acuerdo a los elementos 236 a 242, donde la plantilla no es un nucleótido natural, cuando la molécula modelada es un  $\alpha$ -péptido natural.
249. La composición de acuerdo a los elementos 236 al 242, donde la plantilla no es un nucleótido, cuando la molécula modelada es un  $\alpha$ -péptido natural.
- 45 250. La composición de acuerdo al elemento 236 a 242, donde la plantilla no es un nucleótido, cuando la molécula modelada es un  $\alpha$ -péptido monosustituído.
251. La composición de acuerdo al elemento 236 al 242, donde la plantilla no es un nucleótido, cuando la molécula modelada es un  $\alpha$ -péptido.
- 50 252. La composición de acuerdo a los elementos 236 al 242, donde la plantilla no es un nucleótido natural, cuando la molécula modelada es un péptido.
- 55 253. La composición de acuerdo a los elementos 236 al 242, donde la plantilla no es un nucleótido, cuando la molécula modelada es un péptido.
254. Una molécula modelada comprendida de una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, cuando la molécula modelada es enlazada por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o a la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada, donde la molécula modelada no comprende o consiste de un  $\alpha$ - péptido.
- 60 255. Una molécula modelada comprendida de una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente donde la molécula modelada es enlazada por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o a la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada, donde la molécula modelada no comprende a un  $\alpha$ -péptido monosustituído.
- 65

- 5 256. Una molécula modelada comprendida de una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada es enlazada por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o a la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada, donde la molécula modelada no comprende o consiste de un  $\alpha$ - péptido o un nucleótido.
- 10 257. Una molécula modelada comprendida de una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada es enlazada por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada, donde la plantilla no es un nucleótido natural, cuando la molécula modelada es un  $\alpha$ - péptido.
- 15 258. Una molécula modelada comprendida de una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada es enlazada por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o a la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada, donde la plantilla no consiste exclusivamente de nucleótidos naturales, cuando la molécula modelada es un péptido comprendido exclusivamente de  $\alpha$ -aminoácidos monosustituídos.
- 20 259. Una molécula modelada comprendida de una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada es enlazada por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o a la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada, donde la plantilla no es un nucleótido natural, cuando la molécula modelada es un  $\alpha$ -péptido natural.
- 25 260. Una molécula modelada comprendida de una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente donde la molécula modelada es enlazada por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o a la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada, donde la plantilla no es un nucleótido, cuando la molécula modelada es un  $\alpha$ -péptido natural.
- 30 261. Una molécula modelada comprendida de una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada es enlazada por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o a la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada, donde la plantilla no es un nucleótido, cuando la molécula modelada es un  $\alpha$ -péptido monosustituído.
- 35 262. Una molécula modelada comprendida de una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada es enlazada por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o a la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada, donde la plantilla no es un nucleótido, cuando la molécula modelada es un  $\alpha$ -péptido.
- 40 263. Una molécula modelada conformada de una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada es enlazada por medio de un enlazador a una plantilla complementaria o a la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada, donde la plantilla no es un nucleótido natural, cuando la molécula modelada es un péptido.
- 45 264. Una molécula modelada conformada de una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente, donde la molécula modelada es enlazada por medio de un enlazador a la plantilla complementaria o a la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada, donde la plantilla no es un nucleótido, cuando la molécula modelada es un péptido.
- 50 265. La molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos 226 al 235, y 254 al 264, donde la molécula modelada es un oligómero o un polímero que comprende por lo menos a una secuencia repetitiva de grupos funcionales.
- 55 266. La molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos 226 al 235, y 254 al 264, donde la secuencia de por lo menos 3 grupos funcionales es repetida por lo menos 2 veces en una molécula modelada.
- 60 267. La molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos 226 al 235, y 254 al 264, donde cualquier secuencia de por lo menos 3 grupos funcionales en la molécula modelada ocurre solamente una vez.
- 65 268. La molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos 226 al 235, y 254 al 264, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de aminoácidos seleccionados de un grupo que consiste de  $\alpha$ -aminoácidos,  $\beta$ -aminoácidos,  $\gamma$ -aminoácidos,  $\omega$ -aminoácidos.
269. La molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos 226 al 235, y 254 al 264, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de residuos de aminoácidos naturales.
270. La molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos 226 al 235, y 254 al 264, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de  $\alpha$ -aminoácidos.

271. La molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos 226 al 235, y 254 al 264, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de  $\alpha$ -aminoácidos monosustituídos.
- 5 272. La molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos 226 al 235, y 254 al 264, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de  $\alpha$ -aminoácidos disustituídos.
273. La molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos 226 al 235, y 254 al 264, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de  $\beta$ - aminoácidos monosustituídos.
- 10 274. La molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos 226 al 235, y 254 al 264, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de  $\beta$ -aminoácidos disustituídos.
275. La molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos 226 al 235, y 254 al 264, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de  $\beta$ -aminoácidos trisustituídos.
- 15 276. La molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos 226 al 235, y 254 al 264, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de  $\beta$ -aminoácidos tetrasustituídos.
277. La molécula modelada de cualquiera de los elementos 273 a 276, donde la estructura esencial de dichos  $\beta$ - aminoácidos comprende o consiste esencialmente de una estructura de ciclohexano y/o una estructura de ciclopentano.
- 20 278. La molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos 226 al 235, y 254 al 264, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de  $\gamma$ -aminoácidos.
- 25 279. La molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos 226 a 235, y 254 a 264, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de  $\omega$ -aminoácidos.
280. La molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos 226 al 235, y 254 al 264, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de aminoácidos vinílogos.
- 30 281. La molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos 226 al 235, y 254 al 264, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de glicinas N-sustituídas.
- 35 282. La molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos 226 al 235, y 254 al 264, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de moléculas o entidades moleculares seleccionadas de un grupo de  $\alpha$ -péptidos,  $\beta$ -péptidos,  $\gamma$ -péptidos,  $\omega$ -péptidos;  $\alpha$ -péptidos,  $\beta$ -péptidos,  $\gamma$ -péptidos,  $\omega$ -péptidos mono-, di-, y tri sustituídos, péptidos en los cuales los residuos de aminoácidos están en la forma de L- o en la forma de D-, polipéptidos vinílogos, glicopoli-péptidos, poliamidas, péptidos vinílogos de sulfonamidas, polisulfonamidas, péptidos conjugados que comprenden a, por ejemplo, grupos prostéticos, poliésteres, polisacáridos, policarbamatos, policarbonatos, poliureas, polipeptidilfosfonatos, poliuretanos, azatidas, glicinas oligo N-sustituídas, poliéteres, oligómeros de etoxiformacetales, poli-tioéteres, polietilenglicoles (PEG), polietileno, polidisulfuros, sulfuros de poliarilenos, polinucleótidos, PNA's, LNA's, morfolinós, pirrolinonas de oligos, polioximas, poliiminas, polietileniminas, poliimidás, poliacetales, poliacetatos, poliestirenos, polivinilos, lípidos, fosfolípidos, glicolípidos, compuestos policíclicos que comprenden a, por ejemplo, ciclos alifáticos o aromáticos, incluyendo a compuestos poliheterocíclicos, proteoglicanos, y polisiloxanos, incluyendo a cualquiera de sus combinaciones.
- 40 283. La molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos 226 al 235, y 254 al 264, donde los residuos cercanos de la molécula modelada están enlazados por medio de un enlace químico seleccionado de un grupo de enlaces químicos que consisten de enlaces péptidos, enlaces de sulfonamidas, enlaces de ésteres, enlaces de sacáridos, enlaces de carbamatos, enlaces de carbonatos, enlaces de ureas, enlaces de fosfonatos, enlaces de uretanos, enlaces de azatidas, enlaces de peptoides, enlaces de éteres, enlaces de etoxis, enlaces de tioéteres, enlaces individuales de carbonos, enlaces dobles de carbono, enlaces triples de carbono, enlaces de disulfuros, enlaces de sulfuros, enlaces de fosfodiésteres, enlaces de oximas, enlaces de iminas, enlaces de imidas, aminas, amidás, incluyendo a cualquiera de sus combinaciones.
- 50 284. La molécula modelada de acuerdo al elemento 283, donde la molécula modelada no es un  $\alpha$ - péptido.
- 55 285. La molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos 226 al 235, y 254 al 264, donde la estructura esencial de dicha molécula modelada comprende o consiste esencialmente de un grupo molecular seleccionado de - NHN(R)CO- ; - NHB(R)CO-; -NHC(RR')CO- ; -NHC(=CHR)CO-; -NHC6 H4 CO-; -NHCH2 CHRCO-; -NHCHRCH2 CO-; -COCH2-; -COS-; -CONR-; -COO-; -CSNH-; -CH2 NH-; -CH2CH2-; -CH2S-; -CH2SO-; -CH2SO2-; -CH(CH3)S- ; -CH=CH-; -NHCO-; -NHCONH-; -CONHO-; -C(=CH2)CH2-; -PO2-NH-; -PO2-CH2- ; -PO2-CH2N+-; -SO2NH- ; y lactámicos incluyendo a cualquiera de sus combinaciones.
- 60 286. La molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos 226 al 235, y 254 al 264, donde el precursor es seleccionado de un grupo de precursores seleccionados de precursores de  $\alpha$ -aminoácidos, precursores de  $\beta$ -
- 65

aminoácidos, precursores de  $\gamma$ -aminoácidos, y precursores de  $\omega$ -aminoácidos.

287. La molécula modelada que de acuerdo a cualquiera de los elementos 219 al 226, y 240 al 250, donde la molécula modelada comprende o consiste esencialmente de por lo menos 2 grupos funcionales diferentes, tales como por lo menos 3 grupos funcionales diferentes, por ejemplo por lo menos 4 grupos funcionales diferentes, tal como por lo menos 5 grupos funcionales diferentes, por ejemplo por lo menos 6 grupos funcionales diferentes, como por lo menos 7 grupos funcionales diferentes, por ejemplo por lo menos 8 grupos funcionales diferentes, tal como por lo menos 9 grupos funcionales diferentes, por ejemplo por lo menos 10 grupos funcionales diferentes, tal como más de 10 grupos funcionales diferentes.

288. La molécula modelada de acuerdo al elemento 287, donde los grupos funcionales son idénticos.

289. La molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos 226 al 235, y 254 al 264, donde la molécula modelada es obtenible por medio de un método de acuerdo a cualquiera de los elementos 1 al 218.

290. Una molécula modelada comprendida de una secuencia de bloques de construcción enlazados covalentemente, donde la secuencia de los bloques de construcción enlazados covalentemente comprende a una secuencia de elementos complementarios que forman a una plantilla complementaria capaz de complementar a la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada, y donde la molécula modelada es enlazada a la plantilla complementaria o a la plantilla que modeló su síntesis.

291. Una molécula modelada de acuerdo a cualquiera de los elementos anteriores, donde la molécula modelada comprende a una secuencia de entidades funcionales que comprenden a por lo menos un grupo funcional, y opcionalmente a por lo menos un grupo reactivo tipo II, y donde cada entidad funcional es enlazada a un elemento complementario o a una plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada.

292. La composición de acuerdo a los elementos 226 al 291, donde la modelación es preparada de acuerdo al elemento 1 al 225, donde dicha molécula modelada es enlazada a otra molécula seleccionada de un grupo que consiste de ADN, ARN, anticuerpos, péptidos o proteínas, o sus derivados.

293. Un método para examinar moléculas modeladas que tienen potencialmente una actividad predeterminada, donde dicho método comprende el paso de suministrar a una molécula objetivo o a una entidad objetivo, incluyendo una superficie, y obtener a moléculas modeladas que tengan una afinidad para con -o un efecto en- dicha molécula objetivo o entidad objetivo.

294. Un método para efectuar ensayos en actividades asociadas potencialmente con moléculas modeladas, donde dicho método comprende el paso de suministrar a una molécula objetivo o a una entidad objetivo, incluyendo una superficie, y obtener a moléculas modeladas que tengan una afinidad para con -o un efecto en- dicha molécula objetivo o entidad objetivo, y determinar la actividad de la molécula modelada.

295. Un método para seleccionar complejos o moléculas modeladas que tengan una actividad predeterminada, donde dicho método comprende el paso de realizar un procedimiento de selección y seleccionar a moléculas modeladas basándose en criterios predeterminados de selección.

296. Un método para examinar una composición de moléculas que tienen una actividad predeterminada el cual comprende:

i) Establecer una primera composición de moléculas modeladas, donde dichas moléculas modeladas son definidas como en cualquiera de los elementos 226 al 235, y 254 al 290, o producidos tal como se define en cualquiera de los elementos 1 al 225.

ii) Exponer a la primera composición a condiciones que enriquezcan a dicha primera composición con moléculas modeladas que tengan a la actividad predeterminada, y

iii) Amplificar opcionalmente a las moléculas modeladas de la composición enriquecida obteniendo a una 2ª composición,

iv) Opcionalmente y adicionalmente repetir los pasos ii) al iii), y

v) Obtener una composición adicional que tenga una tasa más alta de moléculas modeladas que tengan a la actividad específica predeterminada.

297. El método del elemento 296, que comprende adicionalmente un paso de mutar a las moléculas modeladas, donde dicha mutagénesis puede ocurrir antes de ejecutar el paso iii), simultáneamente al ejecutar el paso iii) o después de ejecutar el paso iii).

298. El método del elemento 297, donde la mutagénesis es ejecutada como una mutagénesis aleatoria o dirigida a un lugar específico.

299. El método del elemento 296, donde el paso iii) comprende a una amplificación de  $10^1$  a  $10^{15}$  veces.

300. El método del elemento 296, donde los pasos ii) y iii) son repetidos por lo menos 2, 3, 5 veces, tal como por lo menos 10 veces, tal como por lo menos 15 veces.
- 5 301. El método del elemento 296, que comprende adicionalmente un paso de identificación de la molécula modelada que tiene a la actividad predeterminada.
302. El método del elemento 296, donde la identificación es realizada por un análisis de la plantilla y/o físicamente de la plantilla complementaria o por otros medios asociados con la molécula.
- 10 303. El método del elemento 296, donde las condiciones de enriquecimiento de la composición comprenden suministrar a un compañero de enlaces a dicha molécula modelada que tiene la actividad predeterminada, donde dicho compañero de enlaces es inmovilizado directamente o indirectamente a un soporte.
- 15 304. El método del elemento 296, donde las condiciones de enriquecimiento de la composición involucran a cualquiera o a más de uno de los siguientes métodos: separación electroforética, filtración de geles, inmunoprecipitaciones, enfoques isoeléctricos, centrifugación, e inmovilización.
- 20 305. El método del elemento 296, donde la actividad predeterminada es una actividad enzimática o una actividad catalítica.
306. El método del elemento 296, donde las condiciones que enriquecen a la composición comprenden suministrar células capaces de internalizarse en la molécula modelada, o realizar una interacción con la molécula modelada que tiene a la actividad predeterminada
- 25 .
307. Un método para amplificar a la plantilla complementaria o a la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada que tiene, o que tiene potencialmente una actividad predeterminada, donde dicho método comprende el paso de contactar a la molécula con medios de amplificación y amplificar a la plantilla.
- 30 308. Un método para amplificar a la plantilla complementaria o a la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada que tenga, o que tenga potencialmente, una actividad predeterminada, donde dicho método comprende los pasos de i) contactar a la plantilla con medios de amplificación, y amplificar a la plantilla, y ii) obtener la molécula modelada que ha sido incrementada en un monto de por lo menos 2 veces.
- 35 309. Un método para alterar la secuencia de una molécula modelada, incluyendo generar a una molécula modelada que comprende a una secuencia nueva o alterada de grupos funcionales, donde dicho método comprende preferiblemente los pasos de:
- 40 i) Suministrar una primera plantilla complementaria o una primera plantilla capaz de modelar a la primera molécula modelada, o una pluralidad de dichas primeras plantillas complementarias o primeras plantillas capaces de modelar una pluralidad de primeras moléculas modeladas,
- 45 ii) mutar o modificar la secuencia de la primera plantilla complementaria o de la primera plantilla, o pluralidad de primeras plantillas complementarias o primeras plantillas, y generar una 2ª plantilla o una 2ª plantilla complementaria, o una pluralidad de segundas plantillas o segundas plantillas complementarias, donde dicha o dichas segundas plantillas o plantillas complementarias son capaces de modelar la síntesis de una 2ª
- 50 molécula modelada, o una pluralidad de segundas moléculas modeladas, donde dicha 2ª molécula o moléculas modeladas comprenden a una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente que no son idénticos a la secuencia de los grupos funcionales de la primera molécula o moléculas modeladas, y opcionalmente
- iii) modelar por medio de dicha 2ª plantilla o plantillas o plantillas complementarias a una 2ª molécula modelada, o una pluralidad de dichas segundas moléculas modeladas.
310. Un método para alterar la secuencia de una molécula modelada, incluyendo generar a una molécula modelada que comprende a una secuencia nueva o alterada de grupos funcionales, donde dicho método comprende, preferiblemente, los pasos de
- 55 i) suministrar una pluralidad de primeras plantillas complementarias o de primeras plantillas capaces de modelar una pluralidad de primeras moléculas modeladas,
- 60 ii) recombinar las secuencias de la pluralidad de las primeras plantillas complementarias o las primeras plantillas, y generar una 2ª plantilla o una 2ª plantilla complementaria, o una pluralidad de segundas plantillas o de segundas plantillas complementarias,
- 65 donde dicha 2ª plantilla o plantillas o plantillas complementarias son capaces de modelar la síntesis de una 2ª molécula modelada, o una pluralidad de segundas moléculas modeladas, donde dicha 2ª molécula o moléculas modeladas comprenden a una secuencia de grupos funcionales enlazados covalentemente que no son idénticos a la secuencia de los grupos funcionales de la primera molécula o moléculas modeladas, y opcionalmente
- iii) modelar por medio de una 2ª plantilla o plantillas o plantillas complementarias a una 2ª molécula modelada, o una pluralidad de dichas segundas moléculas modeladas.

311. El método de cualquiera de los elementos 309 y 310, que comprende un paso adicional de amplificar a la plantilla complementaria o a la plantilla que modeló la síntesis de la molécula modelada, donde dicho paso de amplificación ocurre antes de, simultáneamente con, o después del paso de mutagénesis o de recombinación.

312. El método del elemento 309 al 310, donde la mutagénesis es conducida como una mutagénesis dirigida a un sitio específico, mutagénesis de cintas, mutagénesis química, eliminación de lugares únicos (USE - unique site-elimination), PCR propenso a errores, mezcla aleatoria de ADN propenso a errores.

313. El método del elemento 309 al 310, donde la mutagénesis es realizada por medio de una mezcla aleatoria de ADN o cualquier forma de recombinación incluyendo a recombinaciones homólogas ya sea in vivo o in vitro.

314. Un bloque de construcción que comprende

i) un elemento complementario capaz de reconocer específicamente a un elemento codificador que tiene a un grupo de reconocimiento, donde dicho elemento complementario es seleccionado de nucleótidos, aminoácidos, anticuerpos, antígenos, proteínas, péptidos y moléculas con la capacidad de reconocer a nucleótidos,

ii) por lo menos una entidad funcional seleccionada de un precursor de  $\alpha$ -péptidos,  $\beta$ -péptidos,  $\gamma$ -péptidos,  $\omega$ -péptidos;  $\alpha$ -péptidos,  $\beta$ -péptidos,  $\gamma$ -péptidos,  $\omega$ -péptidos mono-, di-, y tri-sustituídos, péptidos donde los residuos de aminoácidos están en la forma de L- o en la forma de D-, polipéptidos vinílogos, glicopoli-péptidos, poliamidas, péptidos vinílogos de sulfonamidas, polisulfonamidas, péptidos conjugados que comprenden a, por ejemplo, grupos prostéticos, poliésteres, polisacáridos, policarbamatos, policarbonatos, poliureas, polipeptidilfosfonatos, poliuretanos, azatidas, glicinas oligo N-sustituídas, oligómeros de etoxiformacetales, poli-tioéteres, polietilenglicoles (PEG), polietilenos, polidisulfuros, sulfuros de poliarilenos, polinucleótidos, PNAs, LNAs, morfolinos, pirrolinonas de oligos, polioximas, poliiminas, polietileniminas, poliimidias, poliacetales, poliacetatos, poliestirenos, polivinilos, lípidos, fosfolípidos, glicolípidos, compuestos policíclicos que comprenden a, por ejemplo, ciclos alifáticos o aromáticos,

incluyendo a compuestos poliheterocíclicos, proteoglicanos y polisiloxanos, y

iii) un enlazador que separa a la entidad funcional del elemento complementario.

315. El bloque de construcción de acuerdo al elemento 314, donde el elemento complementario es seleccionado de una secuencia de nucleótidos, tal como una secuencia de desde 1-4 nucleótidos, tal como desde 1-3 nucleótidos, tal como 2 nucleótidos o 3 nucleótidos.

316. El bloque de construcción de acuerdo al elemento 314, donde la entidad funcional es seleccionada de un precursor o un aminoácido seleccionado de aminoácidos alfa, aminoácidos beta, aminoácidos gama, aminoácidos di-sustituídos, aminoácidos poli-sustituídos, aminoácidos vinílogos, derivados N-sustituídos de glicina, y otros aminoácidos modificados.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 al 7: Preparación del bloque de construcción de mononucleótidos (I)

[0446] El bloque de construcción I podría ser preparado de acuerdo al esquema general se muestra más adelante:

5

10

15

20

25

30

35

40

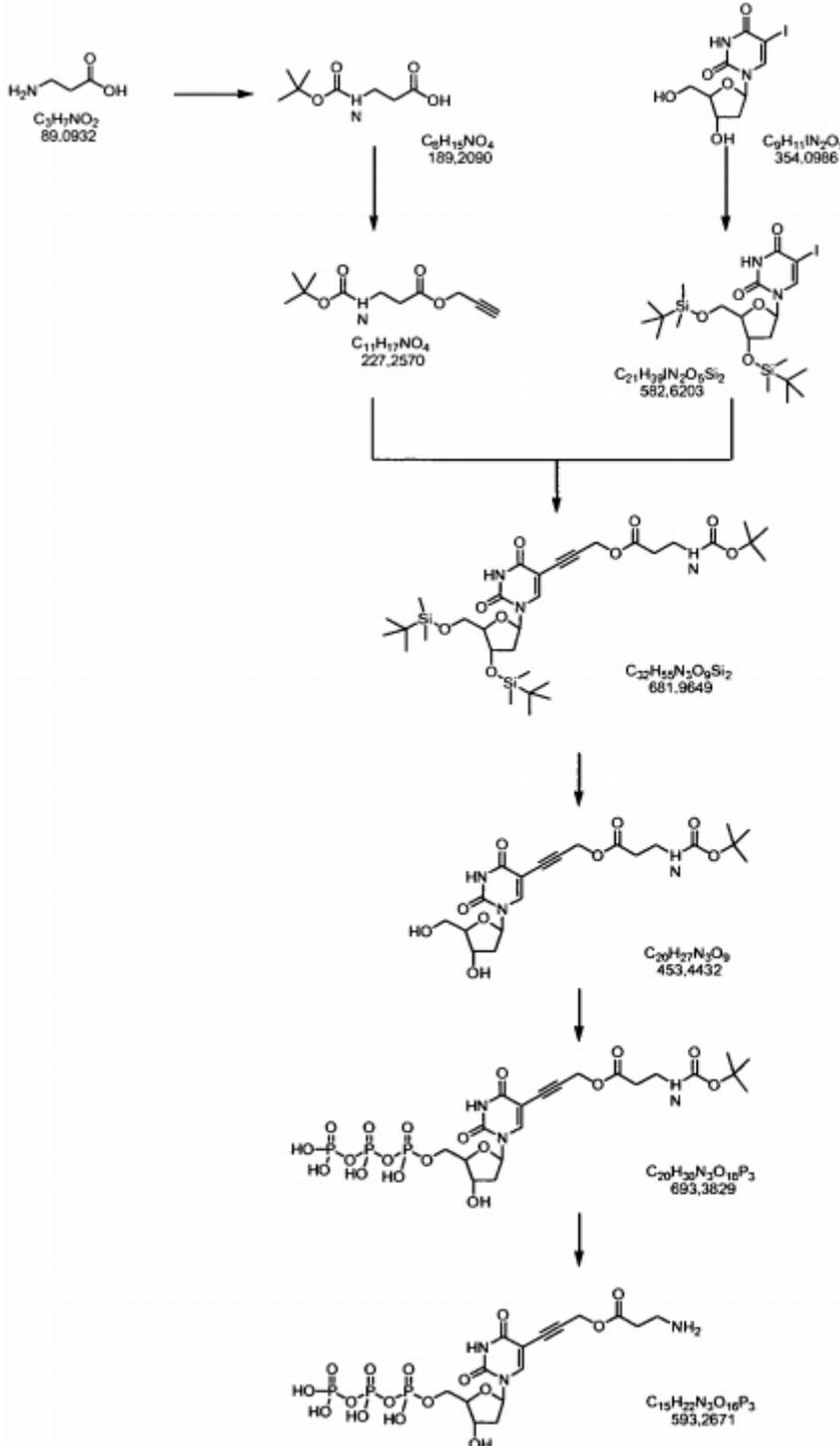
45

50

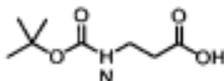
55

60

65



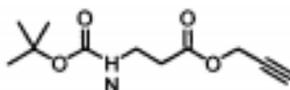
5 Ejemplo 1: Preparación del ácido 3- *terc*-Butoxicarbonilamino-propiónico (N-Boc-β-alanina)(1a)  
 [0447]



10  
 15 [0448] A una solución de β-alanina (2,25 g, 25 mmol) en NaHCO<sub>3</sub> aq. (25 mL) se agregó bicarbonato de di-*terc*-butilo (4.36 g, 20 mmol) y acetonitrilo (25 ml). La mezcla de la reacción fue agitada a la temperatura del cuarto durante 18 horas. Se agregó EtOAc (100 mL) y el pH fue ajustado a 4-5 al agregar NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> -el producto fue extraído a EtOAc (3 x 50 mL), secado (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y evaporado hasta secarse al vacío para generar a 3. 71 g (98%).

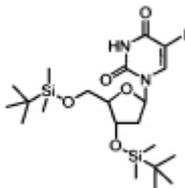
[0449] <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 11 (1H, br s, COOH), 5,07 (1H, br s, NH), 3,40 (2H, m), 2,58 (2H, m), 1,44 (9H, s, <sup>t</sup>Bu).  
 Ejemplo 2: Preparación de éster de propargilo de N-Boc-β-alanina (1b).

20 [0450]



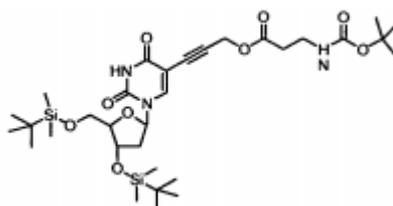
25 [0451] N-Boc-β-alanina (1,91 g, 10.1 mmol) y alcohol propargílico (0.6 5 75 g, 12 mmol) fueron disueltos en EtOAc (25 mL). Se agregó dicitclohexil-carbodiimida (DCC, 2.06 g, 10 mmol) a la solución y después de 16 horas de agitarse a la temperatura del cuarto, la mezcla de la reacción fue filtrada y evaporada hasta secarse al vacío. Se generó al producto crudo.

30 Ejemplo 3: Preparación del éter de 3',5'-Di-*terc*-butildimetilsililo de 5-yodo-2'-deoxiuridina (1c).  
 [0452]



35  
 40 [0453] Se disolvieron 5-yodo-2'-deoxiuridina (Aldrich, 2.39 g, 6.7 mmol) e imidazol (2.025 g, 29.7 mmol) en DMF anhidrido (10 ml). Una solución de cloruro de *terc*-butildimetilsililo (2.24 gramos, 14.9 milimoles) en DMF anhidrido (5 ml) se agregó y la mezcla resultante fue agitada durante 16 horas a la temperatura del cuarto.  
 45 La mezcla de la reacción fue vertida en EtOAc (400 mL), lavada con NH<sub>4</sub>Cl (50% sat. aq, 80 mL) seguido por agua (80 ml). Después de secarse con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se removió el EtOAc bajo presión reducida para dejar a un aceite incoloro que se solidificó al reposar. La re - cristalización en n-hexano (14 ml) generó a: 2.64 g, 80%.  
 50 <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.18 (1H, br s, NH); 8.10 (1H, s); 6,23 (1H, dd); 4,40 (1H, dt); 4.05 (1H, dd); 3.92 (1H, dd); 3.78 (1H,dd); 2,32 (1H, ddd); 2.05 (1H, ddd); 0.95(9H, s, <sup>t</sup>Bu); 0.90(9H, s, <sup>t</sup>Bu); 0.15 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0.13 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0.08 (3H, s,CH<sub>3</sub>); 0.07 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

55 Ejemplo 4: Preparación del compuesto (1d)  
 [0454]



60  
 65 Compuesto (1d)  
 [0455] Una solución de éter de sililo de yodo (1c) (1.62 gramos, 2.7 milimoles, N- Boc-β-alanina (1a) (2.03 g, 8.9 mmol) y trietilamina (0.585 gramos, 5.8 milimoles) en 10 ml de DMF seco fueron agitados a la temperatura del cuarto. N<sub>2</sub> fue pasado a través de la solución durante 20 minutos. Se agregaron tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (25

69 mg, 0.2 milimoles) y yoduro de cobre (I) (90 mg, 0.4 milimoles) y la mezcla de la reacción fue agitada a la temperatura del cuarto durante 32 horas.

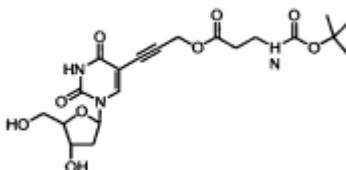
Se vertió EtOAc (100 mL) a la mezcla de la reacción, seguido de un lavado (aq Na-HCO<sub>3</sub> aq (50 mL); salmuera (50 mL)), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y una remoción del solvente por medio de evaporación al vacío.

El producto crudo (2.4 gramos) fue purificado por medio de cromatografía de columna sílice eluyéndose con un gradiente de EtOAc:Heptano (1:2)-(5:3) (volumen/volumen). Generación del producto 1.15 g, 60%.

**[0456]** <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.45 (1H, s), 8.05 (1H, s, 6-H), 7.35 (1H, bs, NH), 6.25 (1H, dd, 1'-H), 4.82 (2H, s, CH<sub>2</sub>O), 4.39 (1H, m, 3'-H), 3.97 (1H, m, 4'-H), 3.80 (2H, dd, 5',5''-H), 3.40 (2H, m, CH<sub>2</sub>N), 2.58 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 2,2 (1H, m, 2'-H), 2.0 (1H, m, 2''-H), 1.45 (9H, s, <sup>t</sup>Bu), 0.93 (9H, s, <sup>t</sup>Bu), 0.89 (9H, s, <sup>t</sup>Bu), 0.15 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.13 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.08 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.07 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

Ejemplo 5: Preparación del compuesto (1e).

**[0457]**



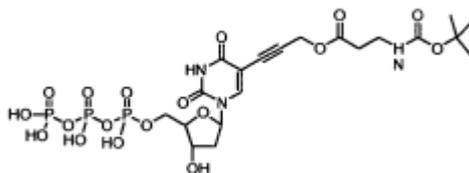
Compuesto (1e)

**[0458]** Una solución de éter de sililo de N-Boc-β-alanina (1d) (100 mg, 0.15 milimoles), ácido acético glacial (75 mg, 1.25 mmol) y trihidrato de cloruro de tetrabutilamonio (TBAF - tetrabutylammonium fluoride trihydrate) (189 mg, 0.6 milimoles) en 2 ml de THF seco se agitó a la temperatura del cuarto durante 3d. La mezcla de la reacción fue evaporada y purificada por medio de cromatografía de columna de sílice eluyéndose con un gradiente de dicloroetano (DCM):metanol (MeOH) (95:5)-(88:12) (v/v). Generación del producto 26 mg, 38%.

**[0459]** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 8.35 (1H, s, 6-H), 6.15 (1H, t, 1'-H), 4.80 (2H, s, CH<sub>2</sub>O), 4,32 (1H, dt, 3'-H), 3.86 (1H, q, 4'-H), 3.70 (2H, dd, 5',5''-H), 3.24 (2H, m, CH<sub>2</sub>N), 2.47 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 2,28-2.10 (1H, m, 2',2''-H), 1.44 (9H, s, <sup>t</sup>Bu).

Ejemplo 6: Preparación del compuesto (1f)

**[0460]**



COMPUESTO 1f

**[0461]** Se disolvieron nucleósidos de N-Boc-β-alanina (1e) (26 mg, 57 μmol) en 200 μl de trimetilfosfato seco. Después de enfriarse a 0 °C, una solución de oxiclورو de fósforo (POCl<sub>3</sub>) en trimetilfosfato seco fue agregada (100 μl de solución madre (104 mg/mililitros), 68 μmol). La mezcla de la reacción fue agitada a 0 °C durante 2 horas.

Subsiguientemente una solución de pirofosfato de tributilamonio (Sigma P-8533) (67.8 mg, 143 μmol en 300 mL de DMF seco) y tributilamina (26.9 mg, 145 μmol en 150 μL de DMF seco) fue agregada a 0 °C. La reacción fue agitada a la temperatura del cuarto durante 3 minutos y luego detenida por medio de la adición de 1 ml de 1.0 de hidrogenocarbonato de trietilamonio.

EJEMPLO 7: Preparación del compuesto I

**[0462]**

COMPUESTO I

Remoción del grupo de protección de N-Boc

**[0463]** Después de la fosforilación, 50 μl de la mezcla de la reacción de fosforilación es ajustada a un pH = 1 utilizando HCl e incubándose a la temperatura del cuarto durante 30 minutos. A la mezcla se le ajusta el pH = 5.5

utilizando NaOH y Na-acetato equimolar (pH 5.5) antes de la purificación en TLC.

Purificación de los derivados de nucleótidos utilizando cromatografía de capa delgada (TLC - thin-layer chromatography)

5 [0464] A partir de la mezcla cruda, 20 muestras de 2 µl fueron colocadas en gel de Kiesel 60 F254 TLC (Merck). Los solventes orgánicos y los nucleósidos no-fosforilados fueron separados de los derivados de nucleótidos utilizando 100% de metanol como una solución de ejecución. Subsiguientemente, la placa TLC fue secada al aire y el derivado de nucleótidos fue identificado por medio de sombras ultravioleta. El Kiesel que contenía al derivado de los nucleótidos fue aislado y extraído 2 veces utilizando 10 mM de Na-acetato (pH = 5.5) como un solvente. El gel de Kiesel fue removido por medio de centrifugación y es sobrenadante fue secado al vacío. El derivado de nucleótidos fue re-suspendido en 50-100 ml de H<sub>2</sub>O a una concentración final de 1-3 mM. La concentración de cada derivado de nucleótidos fue evaluada por medio de absorción ultravioleta antes de usarse en reacciones de extensión de polimerasas.

15 **Ejemplos 8 al 13: Preparación de los bloques de construcción de mononucleótidos (II)**

[0465] El bloque de construcción II podría ser preparado de acuerdo al esquema general que se muestra a continuación:

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

5

10

15

20

25

30

35

40

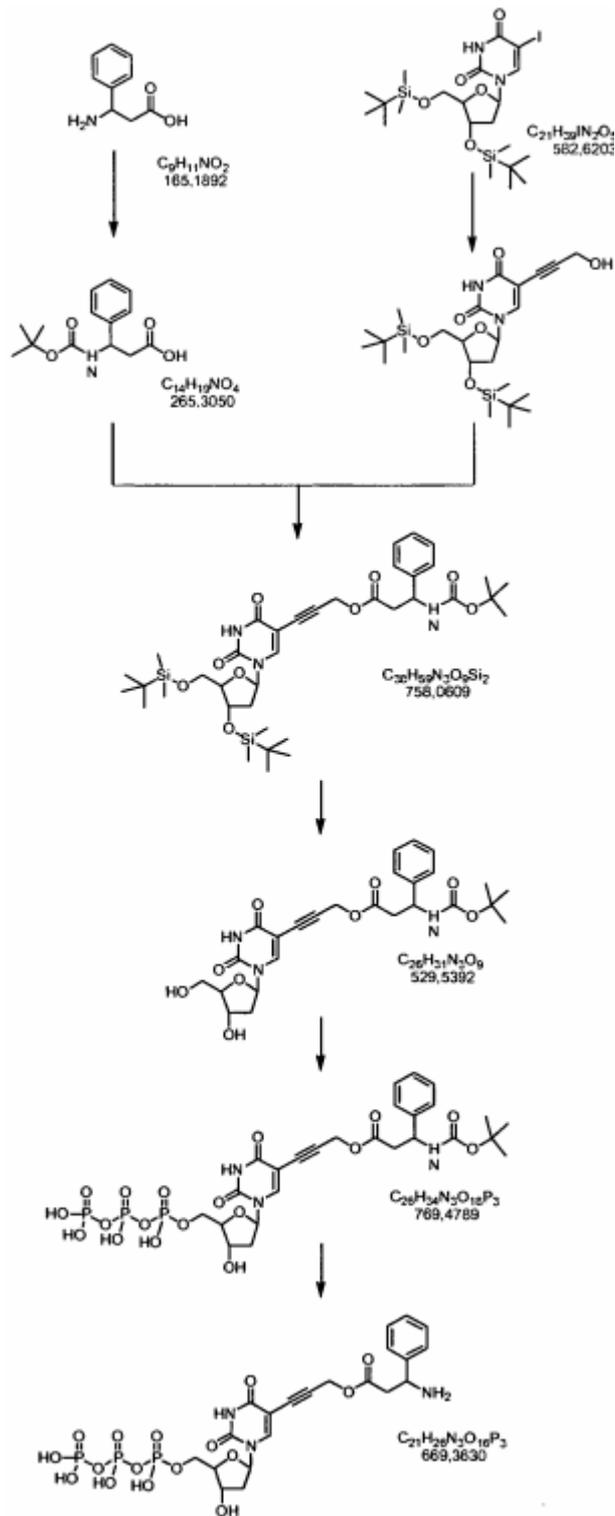
45

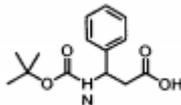
50

55

60

65

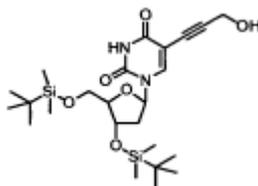


Ejemplo 8: Preparación de N-Boc-3-fenil-β-alanina (2a).**[0466]**

## COMPUESTO 2a

**[0467]** A una solución de ácido 3-amino-3-fenilpropiónico (3.30 gramos, 20 mmol) en NaHCO<sub>3</sub> (50% de sat. aq, 25 mL) se agregó bicarbonato de di-*tert*-butilo (4.36 gramos, 20 mmol) y acetonitrilo (30 ml). La mezcla de la reacción fue agitada a la temperatura del cuarto durante 18 horas. Se agregó bicarbonato de di-*tert*-butilo (4.36 gramos, 20 mmol) y la mezcla de la reacción fue agitada a la temperatura del cuarto durante 18 horas.

Se agregó EtOAc (100 mL) y el pH fue ajustado a 4-5 por medio de la adición de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. El producto fue extraído a EtOAc (3 x 100 mL), secado (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y evaporado hasta secarse al vacío para generar al producto crudo 5.6 gramos (105%)

Ejemplo 9: La preparación de éter de 3',5'-Di-*tert*-butildimetilsililo de 5-(3-Hidroxipropin-1-il)-2'-deoxiuridina (2b).**[0468]**

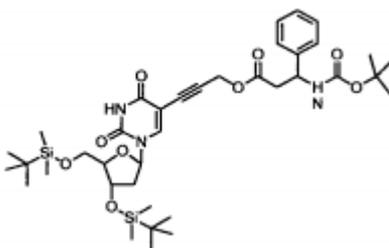
## COMPUESTO 2b

**[0469]** Una solución de éter de sililo de yodo (3) (1.30 gramos, 2.2 milimoles), alcohol propargílico (0.386 g, 6.9 milimoles) y trietilamina (0.438 gramos, 4.3 milimoles) en 7 ml de DMF seco se le sacó el aire con N<sub>2</sub>. Se agregó Tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (228 mg, 0.2 mmol) y yodo de cobre (I) (120 mg, 0.4 mmol) y a la mezcla de la reacción se la agitó a la temperatura del cuarto durante 32 horas.

**[0470]** Se vertió EtOAc (100 mL) a la mezcla de la reacción, seguido de un lavado (Na-HCO<sub>3</sub> aq (50 mL); salmuera (50 mL)), un secado (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y una remoción del solvente por medio de evaporación al vacío.

El producto crudo (1.73 g) fue purificado por cromatografía de columna sílice eluyéndose con un gradiente de EtOAc:Heptano (2:3)-3:2 (v/v). Generación del producto 0.713 gramos, 63%.

**[0471]** <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.47 (1H, s), 8.05 (1H, s, 6-H), 6.29 (1H, dd, 1'-H), 4.42 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 4.39 (1H, m, 3'-H), 3.98 (1H, m, 4'-H), 3.83 (2H, dd, 5',5''-H), 2.32 (1H, m, 2'-H), 2.02 (1H, m, 2''-H), 0.93 (9H, s, <sup>t</sup>Bu), 0.89 (9H, s, <sup>t</sup>Bu), 0.15 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.13 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.08 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.07 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

Ejemplo 10: Preparación del compuesto (2c)**[0472]**

**[0473]** Se disolvieron N-Boc-3-fenil-β-alanina (8)(265 mg, 1.0 mmol) y el compuesto (2b) (255 mg, 0.5 milimoles) en THF (15 ml). Se agregaron Diisopropil-carbodiimida (DIC, 126 mg, 1 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 10 mg) a la solución, y después de 16 horas de agitarse a la temperatura del cuarto la mezcla de la reacción fue vertida en EtOAc (100 mL), lavada con NaHCO<sub>3</sub> (50% sat. aq, 50 mL), secada (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrada y evaporado al vacío.

El producto crudo fue purificado por medio de cromatografía de columna sílice eluyéndose con un gradiente de EtOAc:Heptano (1:2)-(2:3) (v/v). Generación del producto 335 mg, 88%.

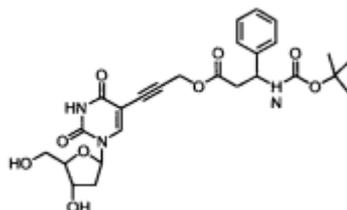
**[0474]** <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.49 (1H, s), 8.04 (1H, s, 6-H), 7.29 (5H, m, Ph), 6.27 (1H, dd, 1'-H), 5.5 (1H, bd), 5.09

(1H,m), 4,80 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 4,39 (1H, m, 3'-H), 3,98 (1H, m, 4'-H), 3,82 (2H, dd, 5',5''-H), 2,87 (2H, d), 2,29 (1H, m, 2'-H), 2,01 (1H, m, 2''-H), 1,41 (9H, s, <sup>t</sup>Bu), 0,91 (9H, s, <sup>t</sup>Bu), 0,89 (9H, s, <sup>t</sup>Bu), 0,15 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0,13 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0,08

(3H, s, CH<sub>3</sub>), 0,07 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

5 Ejemplo 11: Preparación de compuesto 2d

[0475]



15 COMPUESTO 2d

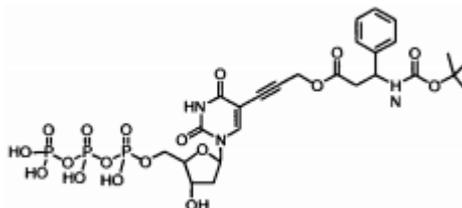
[0476] Una solución del compuesto (2c) (334 mg, 440 μmol), ácido acético glacial (190 mg, 3.15 milimoles) y trihidrato de fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) (500 mg, 1.58 mmol) en 6 ml de THF seco se agitó a la temperatura del cuarto durante 18 horas.

20 La mezcla de la reacción fue evaporada y purificada por medio de cromatografía de columna sílice eluyéndose con un gradiente de (DCM):(MeOH) (95:5)-(9:1) (v/v). Generación del producto 122 mg, 52%.

25 [0477] <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 10.1 (1H, s), 8.24 (1H, s, 6-H), 7.3 (5H, m, Ph), 6.37 (1H, dd, 1'-H), 5.6 (1H, bs), 5.09 (1H,m), 4,79 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 4,52 (1H, m, 3'-H), 4,0 (1H, m, 4'-H), 3,85 (2H, dd, 5',5''-H), 2,87 (2H, d), 2,4 (1H, m, 2'-H), 2,25 (1H, m, 2''-H), 1,4 (9H, s, <sup>t</sup>Bu).

30 Ejemplo 12: Preparación del compuesto (2e):

[0478]



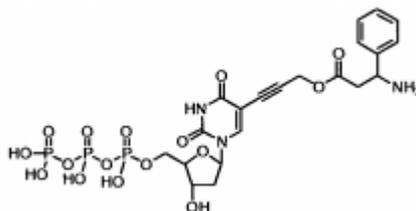
35 COMPUESTO 2e

40 [0479] El compuesto (2d) (122 mg, 230 μmol) fue disuelto en 400 μl de trimetilfosfato seco. Después de enfriarse a 0 °C, se agregó una solución de oxiclورو de fósforo (POCl<sub>3</sub>) en trimetilfosfato seco (400 μl de solución madre (105 mg/mL), 276 micromoles). La mezcla de la reacción fue agitada a 0 °C durante 2 horas.

45 Subsiguientemente una solución de pirofosfato de tributilamonio (273 mg, 576 μmol en 1.2 ml de DMF seco) y tributilamina (109 mg, 587 μmol en 600 μl de DMF seco) fue agregada a 0 °C. La reacción fue agitada a la temperatura del cuarto durante 10 minutos y luego se detuvo por medio de la adición de 1.0 M de hidrogenocarbonato de trietilamonio (1 ml).

50 Ejemplo 13: Preparación del compuesto II

[0480]



55 COMPUESTO II

60 Remoción del grupo de protección de N-Boc

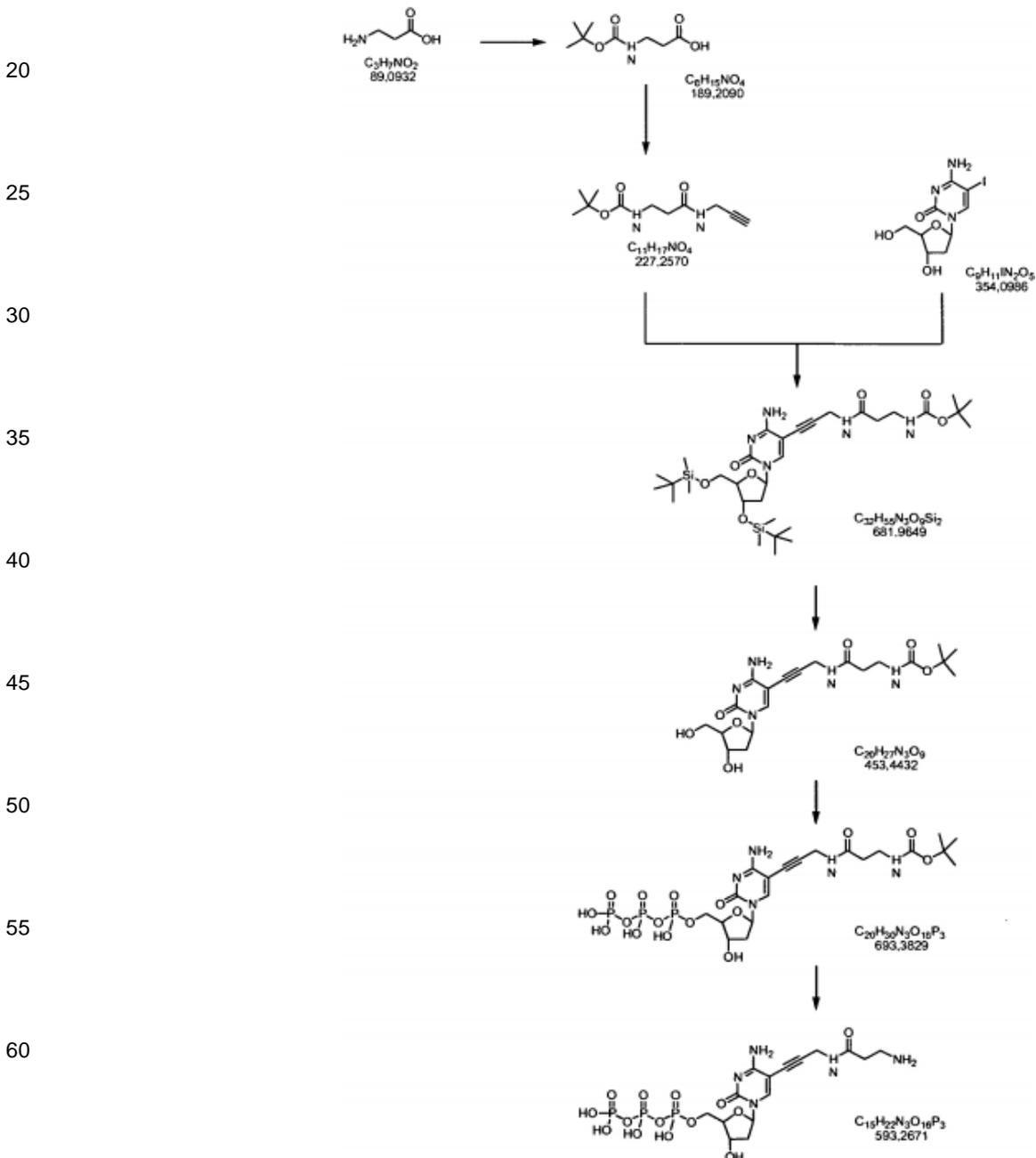
65 [0481] Después de la fosforilación, 50 μl de la mezcla de la reacción de fosforilación se ajustó a un pH = 1 utilizando HCl e incubándose a la temperatura del cuarto durante 30 minutos. A la mezcla se le ajustó el pH = 5.5 utilizando NaOH y Na-acetato equimolar (pH 5.5) antes de su purificación con TLC.

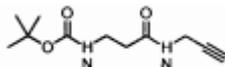
Purificación de los derivados de nucleótidos utilizando cromatografía de capa delgada (TLC - thin-layer chromatography)

5 [0482] De la mezcla cruda, 20 muestras de 2 µl fueron colocadas en TLC de gel de Kiesel 60 F254 TLC (Merck). Los solventes orgánicos y los nucleósidos no fosforilados fueron separados de los derivados de nucleótidos utilizando un 100% de metanol como una solución de ejecución. Subsecuentemente, la placa de TLC fue secada al aire y el derivado de nucleótidos fue identificado por medio de sombras de ultravioleta. El Kiesel que contenía a los derivados de nucleótidos fue aislado y extraído 2 veces utilizando 10 mM de Na-acetato (pH = 5.5) en calidad de solvente. El gel de Kiesel fue removido por medio de centrifugación y el sobrenadante fue secado al vacío. El derivado de los nucleótidos fue re - suspendido en 50-100 µl de H<sub>2</sub>O a una concentración final de 1-3 mM. La concentración de cada derivado de nucleótidos fue evaluada por medio de absorción ultravioleta antes de usarse en reacciones de extensión de polimerasas.

15 **Ejemplos 14 al 18: Preparación del bloque de construcción de mononucleótidos (III)**

[0483] El bloque de construcción III podría ser preparado de acuerdo al esquema general que se muestra a continuación:

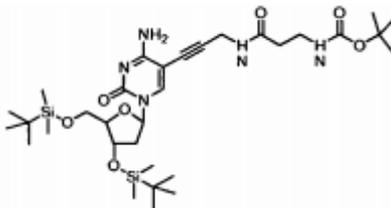


Ejemplo 14: Preparación de amidas de propargilo de N-Boc-β-alanina (3a)**[0484]**

## 10 COMPUESTO 2A

**[0485]** Se disolvió a N-Boc-β-alanina(1a) (1,05g, 5.5 mmol) y amina de propargilo (0.90 gramos, 16.5 milimoles) en THF (10 ml). Se agregó Diisopropil-carbodiimida (DIC, 695 g, 5.5 mmol) y la mezcla de la reacción fue agitada durante 16 horas a la temperatura del cuarto. Se agregó agua (20 ml) y el producto fue extraído a EtOAc (3x30 mL). El EtOAc combinado fue secado (Na2SO4) y evaporado. El producto crudo fue purificado por medio de cromatografía de columna de sílice eluyéndose con un gradiente de EtOAc:Heptano (2:3)-(3:2.5) (v/v). Generación del producto 0.925 gramos 74%.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 6.69 (1H, bs, NH), 5.32 (1H, bs, NH), 4.04 (2H, bs), 3.41 (2H, dd), 2.45 (2H, t), 2.24 (1H, s), 1.44 (9H, s, <sup>t</sup>Bu).

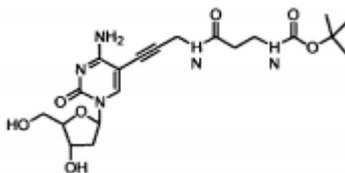
20 Ejemplo 15: Preparación del compuesto (3b)**[0486]**

## 30 COMPUESTO 3b

**[0487]** Una solución de 5-yodo-2'-deoxiciditidina (176 mg, 0.5 mmol), amida de propargilo de N-Boc-β-alanina (14) y trietilamina (100 mg, 1.0 mmol) en DMF seco (5 ml) se agitó a la temperatura del cuarto. Se pasó N<sub>2</sub> a través de la solución durante 20 minutos. Se agregaron tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (66.5 mg, 0.057 mmol) y yoduro de cobre (I) (20.7 mg, 0.108 mmol) y la mezcla de la reacción fue agitada a la temperatura del cuarto durante 5 d. Se agregó imidazol (112 mg, 1.6 mmol). Una solución de cloruro de terc-butildimetilsililo (234 mg, 1.5 mmol) en DMF anhídrido (1 ml) fue agregada y la mezcla resultante fue agitada durante 16 horas a la temperatura del cuarto. La mezcla de la reacción fue evaporada y se agregó EtOAc (25 mL). La mezcla resultante fue filtrada y el solvente fue removido por medio de evaporación al vacío.

El producto crudo fue purificado por medio de cromatografía de columna sílice eluyéndose con DCM:MeOH (92.5-7.5) (v/v). Generación del producto 80 mg, 25%.

**[0488]** <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.13 (H, s), 6.21 (1H, dd, 1'-H), 4.66 (1H, m), 4.16 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 4.04-3.85 (4H, m), 3.35-3.31 (2H, m), 2.43-2.36 (2H, m), 2.12-1.99 (1H, m), 1.44 (9H, s, <sup>t</sup>Bu), 0.95 (9H, s, <sup>t</sup>Bu), 0.92 (9H, s, <sup>t</sup>Bu), 0.17 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.15 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.13 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.12 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

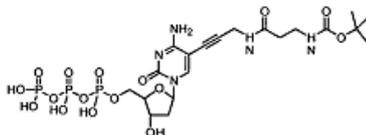
Ejemplo 16: Preparación del compuesto (3c)**[0489]**

## 55 COMPUESTO 3c

**[0490]** Una solución del compuesto (3b) (84 mg, 0.12 milimoles) y trihidrato de fluoruro de Tetrabutilamonio (155 mg, 0.45 mmol) en 2 ml de THF seco se agitó a la temperatura del cuarto durante 4 días. La mezcla de la reacción fue evaporada y purificada por medio de cromatografía de columna sílice eluyéndose con un gradiente de DCM:MeOH (9:1)-(8:2) (v/v). Generación del producto 27 mg, 48%.

**[0491]** <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.32 (1H, s), 6.20 (1H, dd, 1'-H), 4.35 (1H, dt), 4.15 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 3.95 (1H, q), 3.83 (1H, dd), 3.72 (1H, dd), 3.36-3.30 (3H, m), 2.42-2.36 (3H, m), 2.13 (1H, dt), 1.40 (9H, s, <sup>t</sup>Bu).

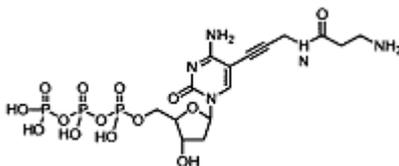
65

Ejemplo 17: Preparación del compuesto (3d)**[0492]**

## COMPUESTO 3d

**[0493]** El compuesto (3c) (27 mg, 60  $\mu$ mol) fue disuelto en 100  $\mu$ l de trimetilfosfato seco. Después de enfriarse a 0 °C, una solución de oxicluro de fósforo (POCl<sub>3</sub>) en trimetilfosfato seco fue agregada (100  $\mu$ L de solución madre (110 mg/mL), 72  $\mu$ mol). La mezcla de la reacción fue agitada a 0 °C durante 2 horas.

Subsiguientemente se agregó una solución de pirofosfato de tributilamonio (71 mg, 150  $\mu$ mol en 300  $\mu$ l de DMF seco) y tributilamina (28.3 miligramos, 153  $\mu$ mol en 150  $\mu$ l de DMF seco) fue agregada a 0 °C. La reacción fue agitada a la temperatura del cuarto durante 3 minutos y luego se detuvo por medio de la adición de 1.0 M de hidrogenocarbonato de trietilamonio (1 ml).

Ejemplo 18: Preparación del compuesto III**[0494]**

## COMPUESTO III

Remoción del grupo de protección de N-Boc

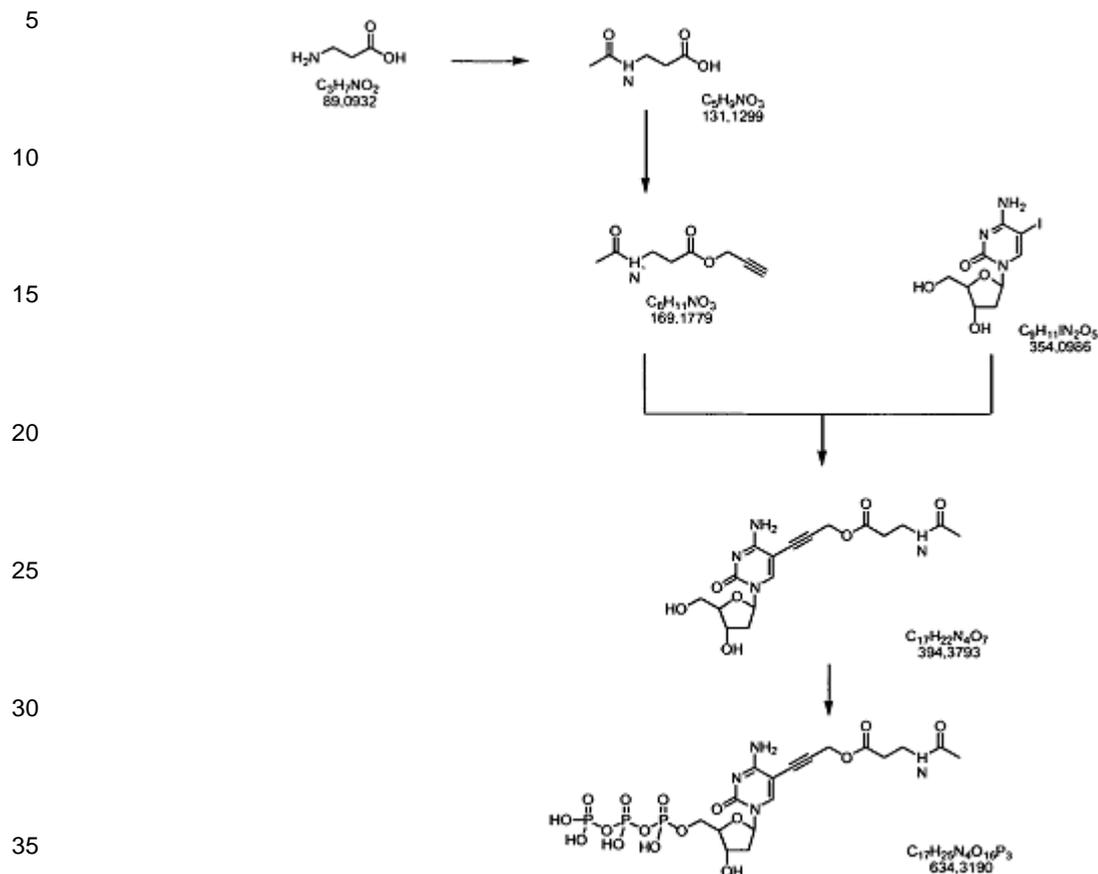
**[0495]** Después de la fosforilación, 50  $\mu$ l de la mezcla de la reacción de la fosforilación es ajustada a un pH = 1 utilizando HCl e incubándose a la temperatura del cuarto durante 30 minutos. La mezcla es ajustada a un pH 5.5 utilizando NaOH y Na-acetato equimolar (pH 5.5) antes de su purificación en TLC.

Purificación de derivados de nucleótidos utilizando cromatografía de capa delgada (TLC - thin-layer chromatography)

**[0496]** Desde la mezcla del crudo, 20 muestras de 2  $\mu$ l fueron colocadas en TLC de gel de Kiesel F254 (Merck). Los solventes orgánicos y los nucleósidos no fosforilados fueron separados de los derivados de nucleótidos utilizando un 100% de metanol como solución de ejecución. Subsiguientemente, la placa TLC es secada al aire y el derivado del nucleótido es identificado por medio de sombras de ultravioleta. El Kiesel que contiene al derivado de los nucleótidos fue aislado y extraído 2 veces utilizando 10 mM de Na-acetato (pH = 5.5) en calidad de solvente. El gel de Kiesel fue removido por medio de centrifugación y el sobrenadante fue secado al vacío. El derivado de nucleótidos fue re-suspendido en 50-100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O a una concentración final de 1-3 mM. La concentración de cada derivado de nucleótido fue evaluada por medio de absorción de ultravioleta antes de utilizarse en reacciones de extensión de polimerasas.

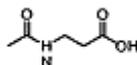
Ejemplo 19 a 22: Preparación de los bloques de construcción de mononucleótidos (IV)

**[0497]** El bloque de construcción IV puede ser preparado de acuerdo al esquema general que se muestra a continuación:



Ejemplo 19: Preparación de la N-acetil-β-alanina (4a)

[0498]



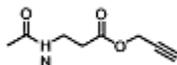
COMPUESTO 4a

[0499] A una solución de β-alanina (2,25 g, 25 mmol) en NaHCO<sub>3</sub> aq. (15 mL) se agregó acetonitrilo (15 ml) y anhídrido acético (2.55 gramos, 25 mmol). La mezcla de la reacción fue agitada a la temperatura del cuarto durante 3 horas. Se agregó anhídrido acético (: 55 g, 25 mmol) y después de 2 horas el pH fue ajustado a 4-5 por medio de la adición de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

[0500] El producto fue extraído a EtOAc (3 x 50 mL), secado (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y evaporado hasta secarse al vacío para generar a 1.96 gramos (60%).

Ejemplo 20: Preparación de éster de propargilo de N-Acetil-β-alanina (4b).

[0501]



COMPUESTO 4b

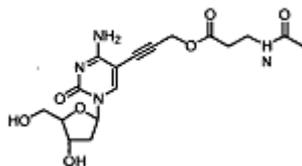
[0502] A una solución de N-Acetil-β-alanina (4a) en THF (20 mL) se agregó alcohol propargílico (840 mg, 15 mmol), hidrocloreuro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) (1.035 gramos, 5.39 milimoles), trietilamina (540 mg, 5.4 milimoles) y 4-dimetilaminopiridina (5 mg). La mezcla de la reacción fue agitada la temperatura del cuarto durante 2d.

La mezcla de la reacción fue vertida en EtOAc (100 mL), lavada con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50% de sat. aq, 2x50 mL) seguido

por NaHCO<sub>3</sub> (50% de sat. aq, 50 mL). Después de secarse (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), el EtOAc fue removido bajo presión reducida para dejar un aceite incoloro que se solidificó al reposar. Generación del producto 536 mg, 50 9%.

Ejemplo 21: Preparación del compuesto (4c)

**[0503]**



COMPUESTO 4c

**[0504]** Una solución de 5-yodo-2'-deoxicidina (200 mg, 0.56 mmol), trietilamina (100 mg, 1 mmol y el compuesto (4b)

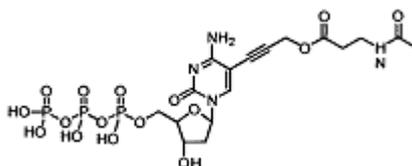
(190 mg, 1.13 mmol) en DMF anhídrido (7 ml) se agitó a la temperatura del cuarto. Se pasó N<sub>2</sub> a través de la solución durante 20 minutos. Se agregaron tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (70mg, 0.06 mmol) y yoduro de cobre (I) (22 mg, 0.12 mmol) y la mezcla de la reacción fue agitada la temperatura del cuarto durante 4 d.

La mezcla de la reacción fue evaporada y purificada por medio de cromatografía de columna sílice eluyéndose con un gradiente de DCM:MeOH (9:1)-(8:2) (v/v). Generación del producto 141 mg, 63%.

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 8.41 (1H, s), 6.20 (1H, dd, 1'-H), 4.97 (2H, s), 4.38 (1H, dt), 3.97 (1H, q), 3.85 (1H, dd), 3.75 (1H, dd), 3.46 (2H, t), 2.61 (2H, t), 2.39 (1H, m), 2.18 (1H, m).

Ejemplo 22: preparación del compuesto IV:

**[0505]**



COMPUESTO IV

**[0506]** El compuesto (4c) (140 mg, 355 μmol) fue disuelto en 600 μl de trimetilfosfato seco. Después de enfriarse a 0 °C, una solución de oxiclórico de fósforo (POCl<sub>3</sub>) en trimetilfosfato seco fue agregada (600 microlitros de solución madre (108 mg/mL), 420 micromoles). La mezcla de la reacción fue agitada a 0 °C durante 2 horas.

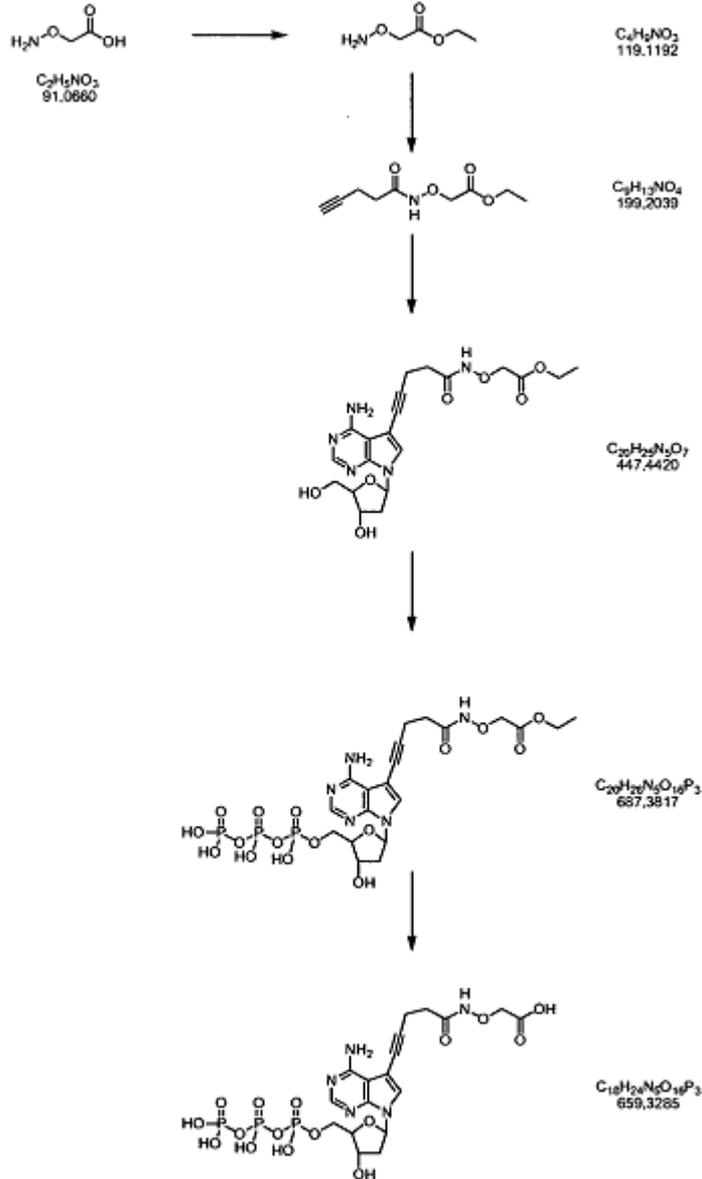
Subsiguientemente una solución de pirofosfato de tributilamonio (422 mg, 890 μmol en 1.8 ml de DMF seco) y tributilamina (168 mg, 900 μmol en 0.9 mililitros de DMF seco) fue agregada a 0 °C. La reacción fue agitada a la temperatura del cuarto durante 3 minutos y luego detenida por medio de la adición de 1.0 de hidrogenocarbonato de trelilamonio (1 ml).

**[0507]** A partir de la mezcla cruda, 20 muestras de 2 μl fueron colocadas en el TLC de gel de Kiesel 60 F254 (Merck). Los solventes orgánicos y los nucleósidos no fosforilados fueron separados de los derivados de nucleótidos utilizando un 100% de metanol como solución ejecutora. Subsiguientemente, la placa PLC fue secada al aire y el derivado de nucleótidos fue identificado por medio de sombras de ultravioleta. El Kiesel que contenía al derivado de nucleótidos fue aislado y extraído 2 veces utilizando 10 mM de Na-acetato (pH = 5.5) como solvente. El gel de Kiesel fue removido por medio de centrifugación y el sobrenadante fue secado al vacío. El derivado de nucleótidos fue re-suspendido en 50-100 μl de H<sub>2</sub>O a una concentración final de 1-3 mM. La concentración de cada derivado de nucleótidos fue evaluada por medio de la absorción de ultravioleta antes de usarse en reacciones de extensión de polimerasas.

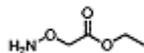
**Ejemplos 23 al 27: Preparación del bloque de construcción de mononucleótidos (V)**

**[0508]** El bloque de construcción V puede ser preparado de acuerdo al esquema general que se muestra a continuación:

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50



Ejemplo 23: Preparación del éster etílico de ácido 2-aminooxi-acético (5a)  
**[0509]**



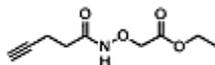
COMPUESTO 5a

**[0510]** Se agregó cloruro de acetilo (5 ml) a etanol abs. (50 ml) y la solución fue enfriada a la temperatura del cuarto. Se agregó ácido 2-aminooxi-acético (2:1) (1.10 gramos, 10 mmol) y la mezcla de la reacción fue agitada durante 16 horas a la temperatura del cuarto. La mezcla de la reacción fue evaporada, se agregó K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aq. (2M) (10 mL) y el producto fue extraído a éter dietílico (5x20 mL), secado (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), evaporada y enfriada para generar 1.007 gramos, 84%.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 4.24 (2H, s), 4.22 (2H, q), 1.30 (3H, t).

Ejemplo 24: Preparación de éster etílico de ácido Pent-4-inoilaminooxi-acético

5

**[0511]**

10

COMPUESTO 5b

**[0512]** A una solución de éster etílico de ácido 2-aminooxi-acético (5<sup>o</sup> 73 mg, 4.8 milimoles) y ácido 4-pentinóico (441 mg, 4.5 milimoles) en 15 ml de EtOAc se agregó dicitclohexilcarbodiimida (928 mg, 4.5 mmol) y la mezcla resultante fue agitada la temperatura del cuarto durante 16 horas.

La mezcla de la reacción fue filtrada, y la filtración fue lavada con EtOAc (2x5 mL). El EtOAc combinado fue lavado con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> aq y NaHCO<sub>3</sub> aq, secado (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y evaporado para generar a 950 mg del producto crudo.

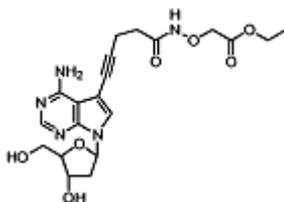
El producto crudo fue purificado por medio de cromatografía de columna sílice eluyéndose con un gradiente de EtOAc:Heptano (1:3)-(1:1) (v/v). Generación del producto 700 mg, 78%.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 4.41 (2H, s), 4.18 (2H, q), 2.77 (1H, t), 2.34 (2H, dt), 2.17 (2H, bt), 1.40(3H,t).

Ejemplo 25: Preparación del compuesto 5c

**[0513]**

25



30

COMPUESTO 5c

**[0514]** Una solución de 7-Deaza-7-yodo-2'-deoxiadenosina (125 mg, 0.33 mmol), (preparada tal como fue descrito por Seela, F.; Synthesis (Síntesis) 1996, 726-730), trietilamina (67 mg, 0.66 mmol) y el compuesto (5b) (305 mg, 1.53 mmol) en DMF anhídrido (7mL) fue agitada a la temperatura del cuarto. Se pasó N<sub>2</sub> a través de la solución durante 20 minutos. Se agregaron Tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (75mg, 0.065 mmol) y yoduro de cobre (I) (24 mg, 0.33 mmol) y la mezcla de la reacción fue agitada a la temperatura del cuarto durante 16 horas.

La mezcla de la reacción fue evaporada y purificada por medio de cromatografía de columna sílice eluyéndose con DCM:MeOH (9:1) (v/v). Generación del producto 129 mg, 86%.

<sup>1</sup>H NMR (d<sup>6</sup> DMSO) δ 11.6 (1H, s), 8.09 (1H, s), 7.63 (1H, s), 6.47 (1H, dd), 5.26 (1H, d), 5.08 (1H, t), 4.42 (2H, s), 4.32

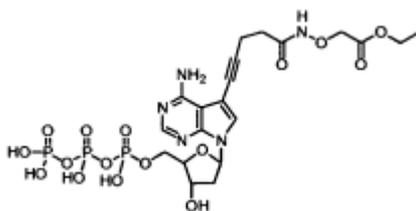
(1H, m), 4.08 (2H, q), 3.81 (1H, m), 3.54 (2H, m), 2.66 (1H, t), 2.46 (1H, m), 2.30 (2H, t), 2.15 (2H, ddd), 1.15 (3H, t).

Ejemplo 26: Preparación del compuesto 5d:

45

**[0515]**

50



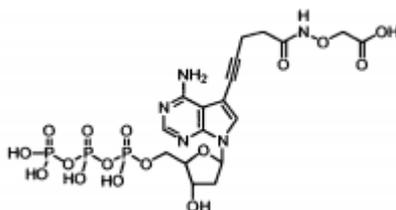
55

COMPUESTO 5d

**[0516]** El compuesto (5c) (117 mg, 260 μmol) fue disuelto en 500 μl de trimetilfosfato seco. Después de enfriarse a 0 °C, una solución de oxocloruro de fósforo (POCl<sub>3</sub>) en trimetilfosfato seco fue agregada (400 de solución madre (120 mg/mL), 310 μmol). La mezcla de la reacción fue agitada a 0 °C durante 2 horas.

Subsiguientemente una solución de tributilamoniopirofosfato (200 mg, 420 μmol en 1.00 mL de DMF seco) y tributilamina (123.6 mg, 670 μmol en 500 μmol de DMF seco) se agregó a 0 °C. La reacción fue agitada a la temperatura del cuarto durante 3 minutos y luego se detuvo al agregarse 1 ml de 1.0 M de trietilamoniohidrocarbonato.

65

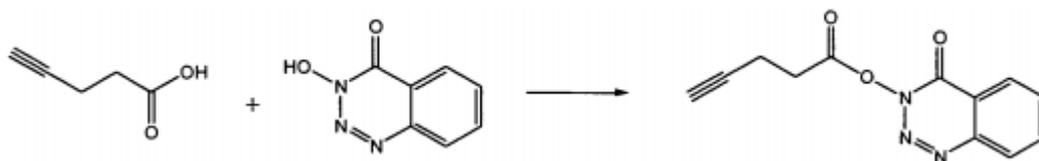
Ejemplo 27: Preparación del compuesto V:**[0517]****COMPUESTO V**

**[0518]** La mezcla de la reacción del compuesto (5d) (2.0 mililitro) fue diluida con agua (6.0 mililitro) y ajustada a pH = 13 utilizando NaOH (2M, aq). Después de la incubación a 5 °C durante 64 horas, la mezcla de la reacción fue extraída con EtOAc (5x5 mL), ajustada a pH 7.0 utilizando HCl (2M, aq), evaporada y diluida con un amortiguador de acetato de trietilamonio (500 µl, 0.1 M aq).

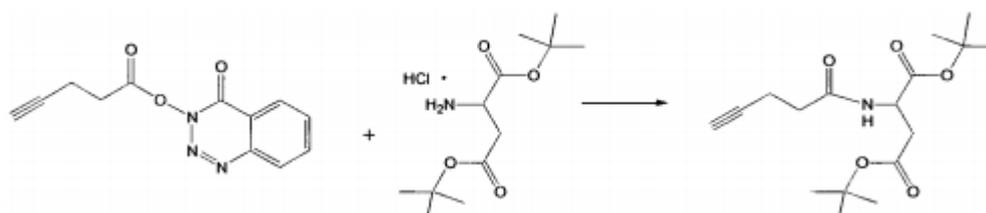
El producto crudo de trifosfato fue purificado por medio de HPLC en una columna Waters Xterra MS C18, utilizando el siguiente sistema de amortiguación: (A) acetato de trietilamonio acuoso (0.1 M, pH 7) y (B) acetonitrilo: agua (80:20) que contenía acetato de trietilamonio (0.1 M). La tabla de tiempo gradiente contiene 8 registros que son:

Tiempo	A%	B%
0.00	98	2
1.00	98	2
10.00	90	10
16.00	85	15
18.00	65	35
20.00	0	100
25.00	0	100
25.10	100	0

**[0519]** Los tiempos de reacción del compuesto V y del compuesto 5d fueron 4.82 minutos y 7.29 minutos respectivamente, medidos por medio de un monitoreo de absorción ultravioleta a 260 nm. Las fracciones que contenían al producto puro fueron agrupadas y liofilizadas 2 veces a partir de agua (3 ml).

**Ejemplos 28 al 30: Preparación del bloque de construcción de mononucleótidos (VI)**Ejemplo 28: Preparación del éster de 4-oxo-4H-benzo[d][1,2,3]triazin-3-ilo de ácido pent-4-ynóico**[0520]**

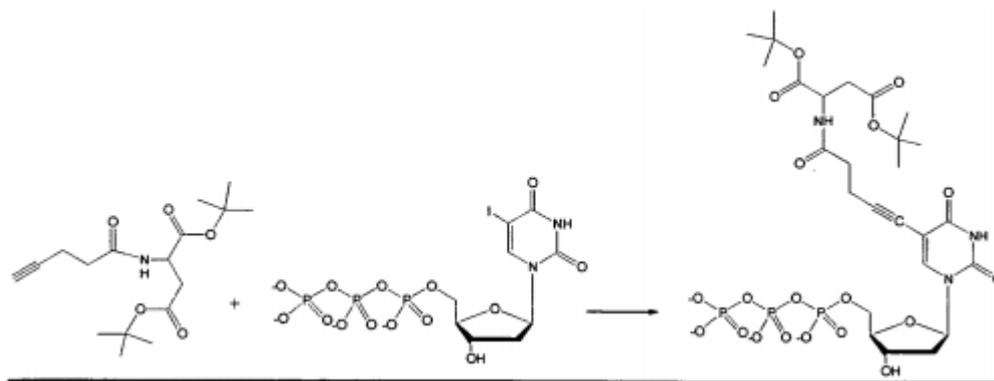
**[0521]** Se disolvió a ácido pentinóico (200 mg, 2.04 milimoles) en THF (4 ml). La solución fue enfriada en un baño de salmuera-agua helada. Se agregó una solución de diciclohexilcarbodiimida (421 mg, 2.04 mmol) en THF (2 mL). 3-Hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona (333 mg, 2.04 mmol) fue agregada después de 5 minutos. La mezcla de la reacción fue agitada durante una hora a 10 °C y luego durante 2 horas a la temperatura del cuarto. El TLC indicó una conversión completa de 3-hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona (eluyente: acetato etílico). Las sales precipitadas fueron filtradas. La filtración fue concentrada al vacío y cristalizada a partir de hexano (4 ml). Los cristales fueron filtrados, sacados y secados. Producción: 450 mg, 93% RF = 0.8 (acetato etílico).

Ejemplo 29: Preparación del éster de 4-isopropilo de éster de 1-terc-butilo de ácido 2-Pent-4-inoilamino-succinicco (6b)**[0522]**

**[0523]** Se disolvió a hidrocloreto de éster de  $\alpha,\beta$ -di-*tert*-butilo de ácido L-aspártico (Novabiochem 04-12-5066, 200 mg, 0.71 mmol) en THF (5 ml). El éster activado 6a (173 mg, 0.71 mmol) y diisopropiletilamina (0.15 mL, 0.86 mmol) fueron agregados. La mezcla fue agitada durante la noche. Se agregó diclorometano (10 ml). La fase orgánica fue lavada con ácido cítrico (2 x 10 mL), NaHCO<sub>3</sub> saturado (aq, 10 mL), salmuera (10 ml), secada (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y concentrada a un jarabe. Un espectro NMR indicó que el jarabe era lo suficientemente puro para más síntesis. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  6.6 (1H, NH), 4.6 (1H, CH), 2.8 (2H, CH<sub>2</sub>), 2.4 (4H, 2 x CH<sub>2</sub>), 1.9 (1H, CH), 1.2 (18H, 6 x CH<sub>3</sub>).

**Ejemplo 30: Preparación del éster de di-*tert*-butilo de ácido 2-{5-[1-(4-Hidroxi-5-(*O*-trifosfato-hidroximetil)-tetrahidrofurano-2-il)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidro-pirimidin-5-il]-pent-4-inoilamino}-succinicco (VI)**

**[0524]**



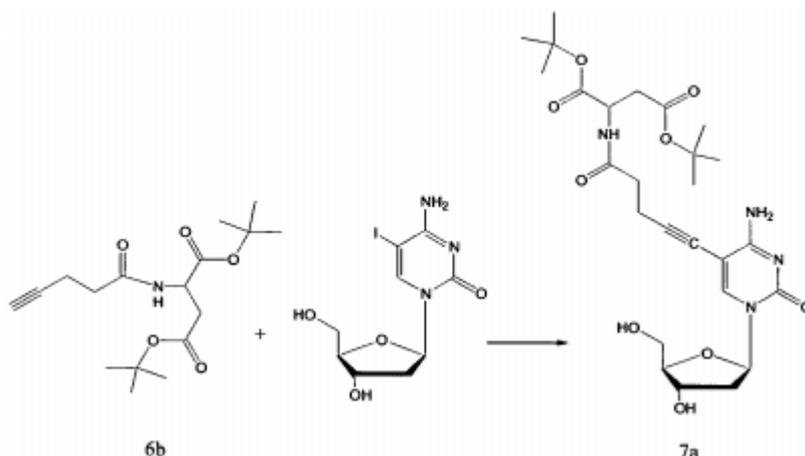
**[0525]** El nucleótido (20 mg, 0.022 milimoles) fue disuelto en agua-etanol (1:1, 2 ml) la solución fue desgasificada y mantenida bajo una atmósfera de argón. El catalizador Pd(PPh<sub>2</sub>(*m*-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>SO<sub>3</sub>Na<sup>+</sup>))<sub>4</sub> (20 mg, 0.016 mmol) preparado de acuerdo a A.L. Casalnuovo et al. J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 4324-4330, trietilamina (0.02 mililitros, 0.1 milimoles) y el alquino (compuesto 6b) (20 mg, 0.061 milimoles) fueron agregados. Algunos cristales de CuI fueron agregados. La mezcla de la reacción fue agitada durante 6 horas. La sal de trietilamonio de LH8037 fue obtenida después de la purificación por medio de RP-HPLC (eluyente: 100 mM de acetato de trietilamonio → 20% de acetonitrilo en 100 mM de acetato de trietilamonio). <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O):  $\delta$  8.1 (1H, CH), 6.2 (1H, CH), 4.8 (1H, CH), 4.6 (1H, CH), 4.1 (3H, CH, CH<sub>2</sub>), 2.8 (2H, CH<sub>2</sub>), 2.7 (2H, CH<sub>2</sub>), 2.5 (2H, CH<sub>2</sub>), 2.3 (2H, CH<sub>2</sub>), 1.4 (18H, 6 x CH<sub>3</sub>).

**[0526]** Inmediatamente antes de la incorporación o después de la incorporación, los grupos protectores de éster de di-*tert*-butilo pueden ser separados para obtener al ácido carboxílico libre correspondiente.

**Ejemplos 31 al 32: Preparación del bloque de construcción de mononucleótidos (VII)**

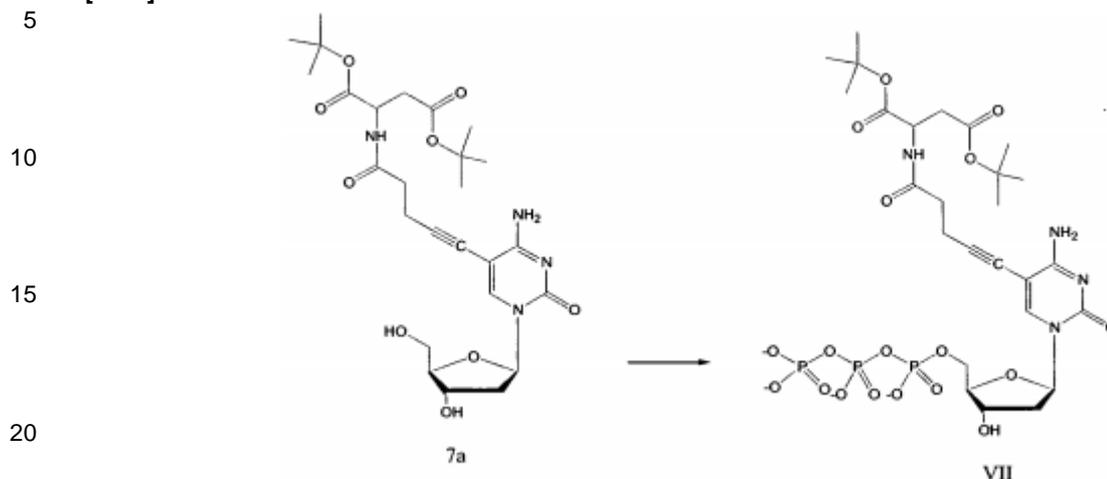
**Ejemplo 31: Preparación del éster de di-*tert*-butilo de ácido 2-{5-[4-amino-1-(4-hidroxi-5-hidroximetil-tetrahidrofuran-2-il)-2-oxo-1,2-dihidro-pirimidin-5-il]-pent-4-inoilamino}-succinicco**

**[0527]**



**[0528]** El compuesto (7a) (30 mg, 19%) fue obtenido del compuesto (6b) (140 mg, 0.43 milimoles) y 5-yodo-2-deoxicidina (100 mg, 0.28 milimoles) utilizando el procedimiento descrito para la síntesis del compuesto VI. <sup>1</sup>H-NMR (MeOD-D<sub>3</sub>):  $\delta$  8.3 (1H, CH), 6.2 (1H, CH), 4.8 (1H, CH), 4.6 (1H, CH), 4.4 (1H, CH), 4.0 (1H, CH), 3.8 (2H, CH<sub>2</sub>), 2.8 (4H, 2 x CH<sub>2</sub>), 2.7 (2H, CH<sub>2</sub>), 2.4 (1H, CH<sub>2</sub>), 2.2 (1H, CH<sub>2</sub>), 1.4 (18H, 6 x CH<sub>3</sub>).

Ejemplo 32: Preparación del éster de di-terc-butilo de ácido 2-[5-[4-amino-1-(4-hidroxi-5-(O-trifosfato-hidroximetil)-tetrahidro-furan-2-il)-2-oxo-1,2-dihidro-pirimidin-5-il]-pent-4-inoilamino}-succínico (Compuesto VII)  
**[0529]**



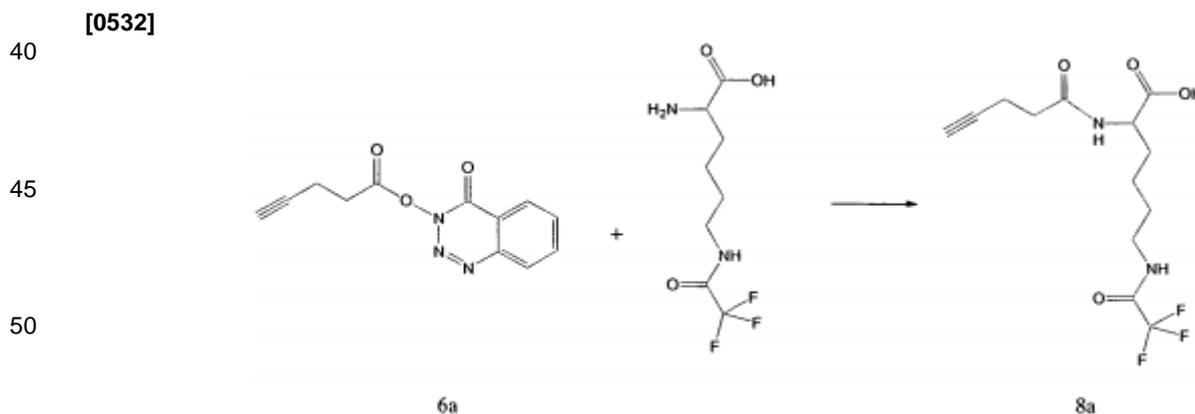
25 **[0530]** Se agregó cloruro de fosforoxi (6.0 microlitros, 0.059 milimoles) a una solución fría (0 °C) de 7a (30 mg, 0.054 milimoles) fosfato de trimetilo (1 ml). La mezcla fue agitada durante una hora. Una solución de pirofosfato de bis-n-tributilamonio (77 mg, 0.16 milimoles) en DMF (1 ml) y tributilamina (40 µl, 0.16 milimoles) fue agregada. Se agregó agua (2 ml). El pH de la solución fue medido y se determinó que era neutral. La solución fue agitada a la temperatura del cuarto durante 3 horas y a 5 °C durante la noche. Un monto pequeño del compuesto VII (unos miligramos) fue obtenido después de la purificación por medio de RP-HPLC (eluyente: 100 mM de acetato de trietilamonio → 20% de acetonitrilo en 100 mM de acetato de trietilamonio). 7a (18 mg) se obtuvo otra vez.

30

**[0531]** Inmediatamente antes de, o subsiguientemente a la incorporación se podrían separar a los grupos protectores de éster de di-terc-butilo para obtener al correspondiente ácido carboxílico libre.

**Ejemplos 33 y 34: Preparación del bloque de construcción de mononucleótidos (VIII)**

35 Ejemplo 33: Preparación del ácido 2-pent-4-inoilamino-6-(2,2,2-trifluoro-acetilamino)-hexanóico, (8a)



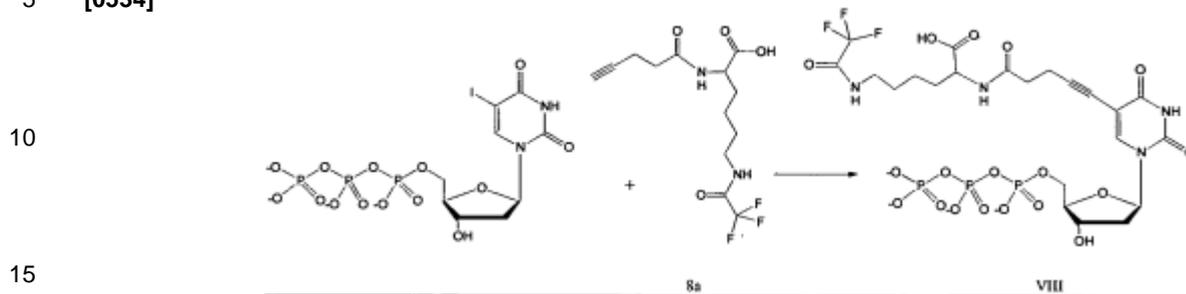
55 **[0533]** El compuesto 6a (250 mg, una. 0 mmol) fue agregado a una solución de N-ε-trifluoroacetil-L-lisina (Novabiochem, 04-12-5245) (250 mg, 1.0 mmol) en DMF (3 mL). Se agregó etildiisopropilamina (0.2 mL, 1.2 mmol). La solución fue agitada a la temperatura del cuarto durante la noche y procesada por medio de RP-HPLC (eluyente: metanol de agua). Producción: 50 mg, 15%. <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): δ 4.4 (1H, CH), 3.4 (2H, CH<sub>2</sub>), 2.5 (4H, 2 x CH<sub>2</sub>), 2.3 (1H, CH), 1.9 (1H, CH<sub>2</sub>), 1.8 (1H, CH<sub>2</sub>) 1.6 (2H, CH<sub>2</sub>), 1.5 (2H, CH<sub>2</sub>).

60

65

Ejemplo 34: La preparación de ácido 2-{5-[1-(4-Hidroxi-5-(O-trifosfato-hidroximetil)-tetrahidrofuran-2-il)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidro-pirimidin-5-il]-pent-4-inoilamino}-6-(2,2,2-trifluoro-acetilamino)-hexanóico (Compuesto VIII)

5 [0534]

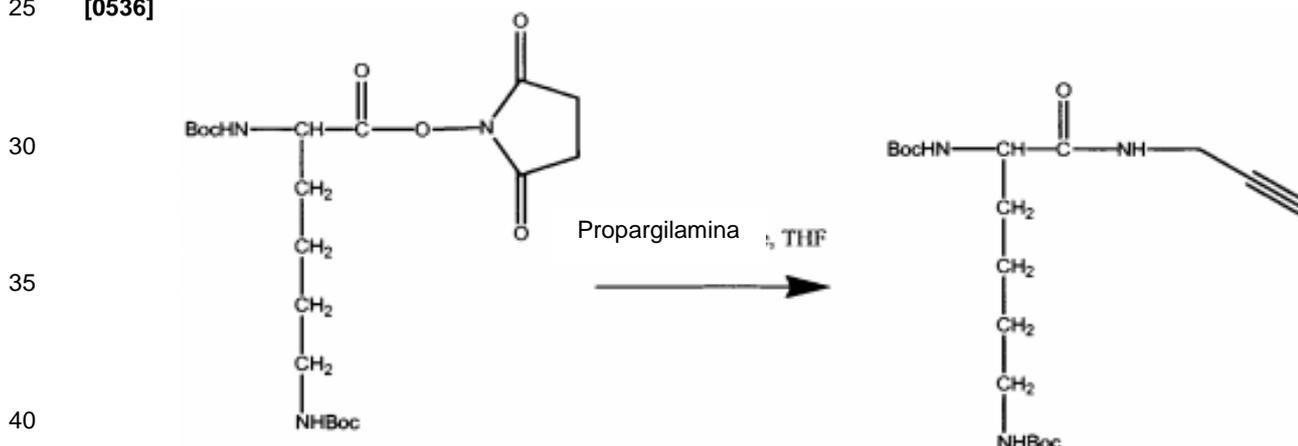


20 [0535] La sal de trietilamonio del compuesto VIII (11 miligramos) fue obtenida del compuesto 8a (50 mg, 0.15 milimoles) y 5-yodo-2-deoxiuracilo (50 mg, 0.06 mmol) utilizando el procedimiento descrito para la síntesis del compuesto VI.

**Ejemplos 35 al 39: Preparación del bloque de construcción de mononucleótidos (IX)**

Ejemplo 35: Preparación de la amida de di-Boc-Lisin-propargilo (compuesto 9a) C<sub>19</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> Mw 383.48

25 [0536]



45 [0537] Se disolvió Boc-Lys-(Boc)-OSu (Novabiochem 04-12-0017, 0.887 g, 2 mmol) en THF (10 ml). Se agregó propargilamina (0.412 mililitros, 6 mmol) y la solución fue agitada durante 2 horas. El TLC (etilacetato:heptano 1:1) mostró sólo un producto. Se agregó diclorometano (20 ml) y la mezcla fue lavada sucesivamente con ácido cítrico (1M, 10 ml) y saturada con carbonato de hidrógeno de sodio (10 ml), la fase orgánica fue secada con sulfato de magnesio filtrada y evaporada para dar al compuesto 9a (0.73 gramos) en forma de un jarabe incoloro.

50 [0538] <sup>1</sup>H-NMR: δ 6.55 (1H, NH), 5.15 (1H, NH), 4.6 (1H, CH-NH), 4.05 (2H, CH-C-CH<sub>2</sub>-N), 3.75 (1H, NH), 3.1 (2H, CH<sub>2</sub>-NH) 2.25 (1H, CH-C-CH<sub>2</sub>), 1.9-1.3 (6H, 3 x CH<sub>2</sub>), 1.4 (18H, 6 x CH<sub>3</sub>).

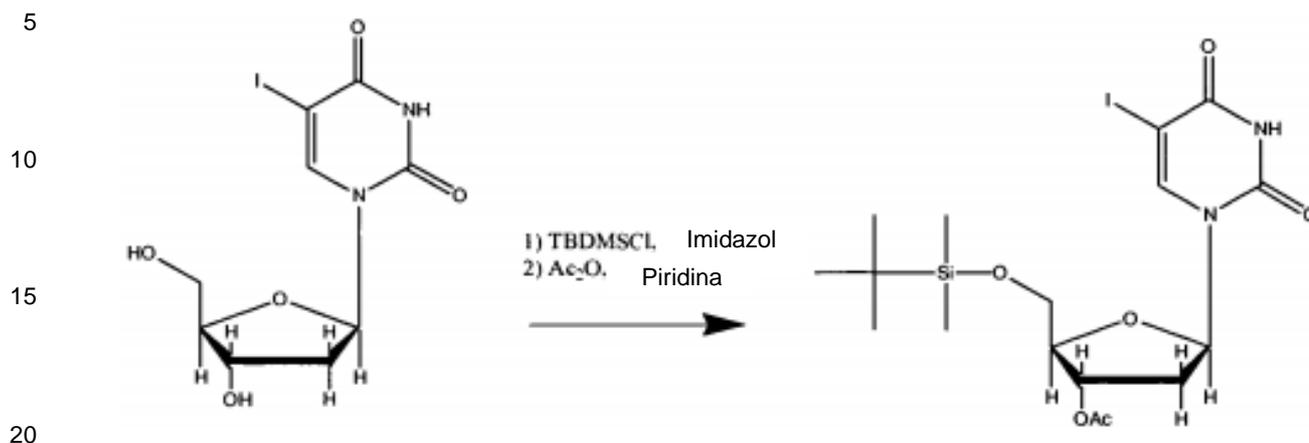
Ejemplo 36: Preparación de 5-yodo-3'-O-acetil-5'-O-TBDMS-2'-deoxiuridina (compuesto 9b) C<sub>17</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Si Mw 510.40

55

60

65

[0539]



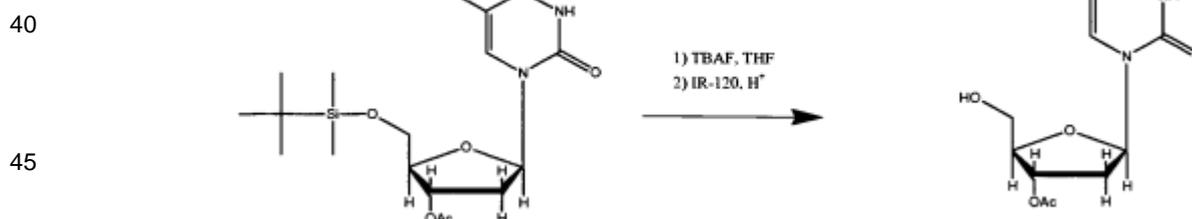
25

30

[0540] Se disolvió 5-yodo-2'-deoxiuridina (Sigma I-7125, 2.50 g, 7.06 mmol) e imidazol (0.961 g, 14.12 mmol) en DMF (10 ml) se enfrió a 0 °C y una solución de TBDMS-Cl (t-butil-dimetil-cloruro, 1.12 g, 7.41 mmol) en diclorometano (5.0 mililitro) fue ejecutada durante 20 minutos. La agitación continuó a la temperatura del cuarto durante 18 horas, y la mezcla fue evaporada. El nucleósido mono-sililado crudo fue disuelto en piridina (40 ml) y enfriado a 0 °C. El anhídrido acético (4.0 mililitros, 42.3 milimoles) fue agregado durante 30 minutos y la agitación continuó durante 18 horas a la temperatura del cuarto. La mezcla de la reacción fue evaporada y disuelta en diclorometano (20 ml) y se agregó ácido cítrico (2M, 20 ml). La fase acuosa fue extraída y recuperada con diclorometano (2 x 20 ml). Las fases orgánicas combinadas fueron lavadas con bicarbonato de sodio saturado (20 ml) secadas con sulfato de sodio y evaporadas (5.85 gramos). La forma de re cristalización de etilacetato/EtOH generó a 9b (2.54, g) puro para una síntesis de TLC (acetato etílico). Más re - cristalizaciones generaron una muestra pura analítica mp.172.4-173.1 °C.

35 Ejemplo 37: Preparación de 5-yodo-3'-O-acetil-2'-deoxiuridina (compuesto 9c) C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> Mw 396.14

[0541]



50

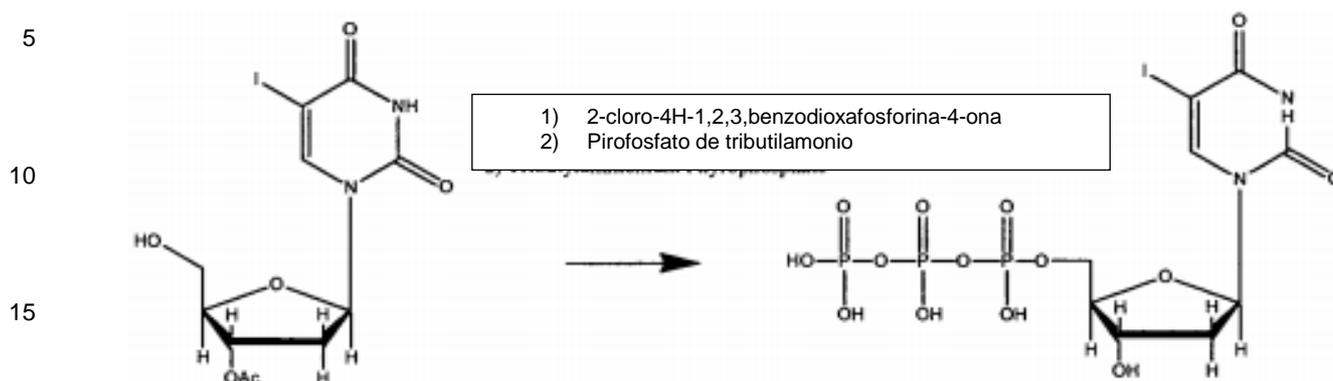
[0542] Se disolvió a 5-yodo-3'-O-acetil-5'-O-TBDMS-2'-deoxiuridina (compuesto 9b) (2.54 g, 4.98 mmol) en THF (25 ml), se agregó trihidrato de fluoruro de amonio de tetra butilo (TBAF - tetra butyl ammonium fluoride trihydrat, 3.2 g, 10.1 mmol) y se agitó durante 18 horas a la temperatura del cuarto. A la mezcla de la reacción se le agregó agua (25 ml) y se agitó durante una hora. Se agregó entonces resina de intercambio de iones IR-120 H<sup>+</sup> (26 ml) y la agitación continuó durante una hora. La solución fue filtrada y reducida a aproximadamente 10 ml al vacío. Los cristales fueron recaudados y secados al vacío (1.296 gramos).

55 Ejemplo 38 Preparación de 5-yodo-5'-trifosfato-2'-deoxiuridina, sal de trietil-amonio (compuesto 9d) C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>14</sub>P<sub>3</sub> + n·N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Mw 897.61 para n =3.

60

65

[0543]



20 **[0544]** Se disolvió 5-yodo-3'-O-acetil-2'-deoxiuridina (compuesto 9c) (2.54 g, 4.98 mmol) en piridina (3.2 mililitros) y dioxano (10 ml). Una solución de 2-cloro-4H-1,3,2-benzodioxafosforina-4-ona en dioxano (3.60 mililitros, 1M, 3.60 milimoles) se agregó agitándose. La mezcla de la reacción fue agitada durante 10 minutos a la temperatura del cuarto seguida por adiciones simultáneas de pirofosfato de bis(tri-n-butilamnio) en DMF (9.81 ml, 0.5 M, 4.91 mmol) y tri-n-butilamina (3.12 mililitros, 13.1 milimoles) se continuó agitándose durante 10 minutos y el intermedio fue oxidado al agregar una solución de yodo (90 ml, 1% masa/volumen en piridina/agua (98/2, volumen/volumen)) hasta que se alcanzó el color permanente de yodo. A la mezcla de la reacción se la dejó a reposar durante 15 minutos y luego se le quitó el color con tiosulfato de sodio (5% en solución acuosa, masa/volumen). La mezcla de la reacción fue evaporada hasta generar un aceite amarillo. El aceite fue agitado en agua (20 ml) durante 30 minutos y concentrado y luego se agregó armonio acuoso (100 ml, 25%). Esta mezcla fue agitada durante 1.5 horas a la temperatura del cuarto y luego evaporada a un aceite de un producto trifosfato crudo. El material crudo fue purificado utilizando la columna DEAE Sephadex A25 (aproximadamente 100 ml) eluida con un gradiente lineal de hidrogenocarbonato de trietil-amonio [TEAB - hidrogenocarbonato de trietil-amonio] de 0.05 M a 1.0 M (pH aproximadamente 7.0-7.5); un flujo de 8 ml/fracción/15 minutos. Las fracciones positivas fueron identificadas por medio de RP18 HPLC eluyéndose con un gradiente de 10 mM de TEAA (acetato de trietilamonio - triethylammonium acetate) en agua a 10 mM de TEAA con un 20% de agua en acetonitrilo. Las fracciones apropiadas fueron agrupadas y evaporadas. Producción aproximadamente 1042 mg.

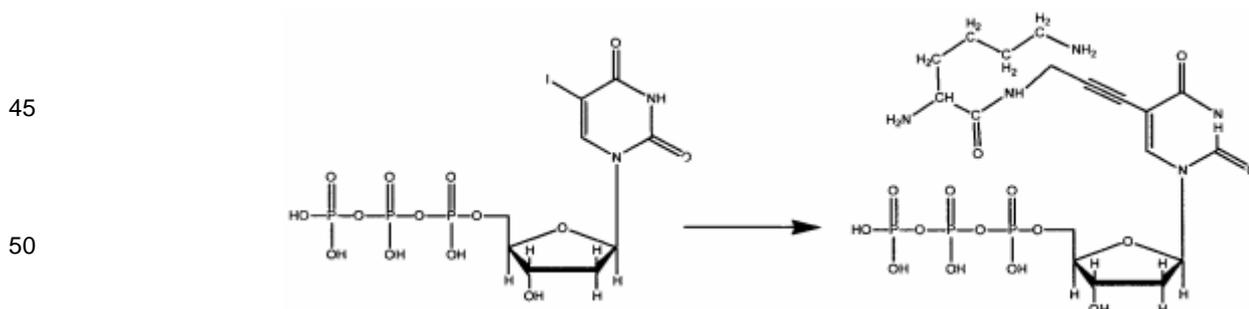
25

30

35

Ejemplo 39: Preparación de 5-(amida de Lisin-propargilo)-5'-trifosfato-2'-deoxicidina, sal de trietilamonio (compuesto IX) C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>N<sub>5</sub>O<sub>15</sub>P<sub>3</sub> + n·N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Mw 952.95 para n =3

[0545]



55 **[0546]** 5-yodo-3'-O-acetil-5'-trifosfato-2'-deoxiuridina, sal de trietilamonio (compuesto 9d) (0.0087 g, 9.7 micromoles) fueron disueltos en agua (100  $\mu$ l). Se reemplazó cuidadosamente al aire con argón. La amida de Di-Boc-Lisina-propargilo (compuesto 9a) (18.6 miligramos, 48.5 micromoles) fue disuelta en dioxano (100  $\mu$ l), se agregó trietilamina (2.7 microlitros, 19.4 microlitros, Pd((PPh<sub>2</sub>)(m-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>3</sub>Na<sup>+</sup>)(H<sub>2</sub>O))<sub>4</sub> (compuesto 9d) (5 mg, 4.4 micromoles) y yoduro de cobre (I) (0.4 microlitros, 2.1 micromoles) en el orden especificado. La mezcla de la reacción fue agitada durante 18 horas a la temperatura del cuarto en una atmósfera inerte y luego se evaporó. El material crudo fue tratado con ácido clorhídrico acuoso (0.2 M, 1 ml) durante 15 minutos a 30 °C. El (compuesto IX) fue obtenido por medio de HPLC C18 con 10 mM de TEA (acetato de trietilamonio - triethylammonium acetate) en agua a 10 mM de TEAA con un 20% de agua en acetonitrilo. Las fracciones apropiadas fueron desaladas utilizando filtraciones de gel (farmacia G-10, 0.7 ml).

60

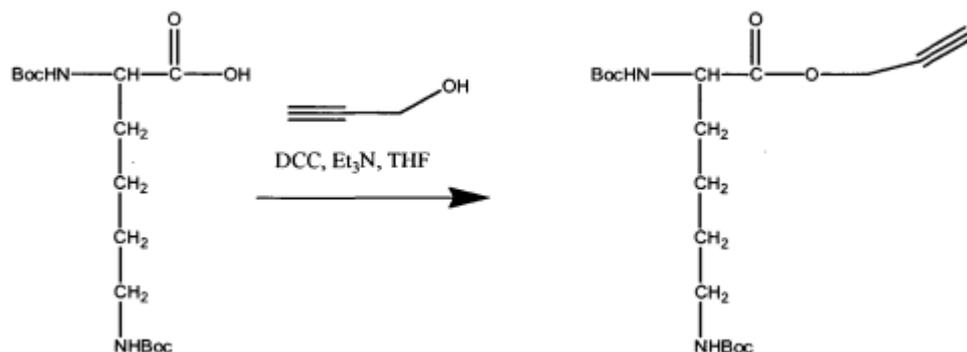
65 **Ejemplos 40 a 45: Preparación del bloque de construcción de mononucleótidos (X)**

Ejemplo 40: Preparación de Boc-Lys-(Boc)-OH (compuesto 10a) C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> Mw 346.42

**[0547]** Se disolvió lisina (Novabiochem 04-10-0024; 3.65 g, 20 mmol) en hidróxido de sodio (2 M, 40 ml), se agregó dioxano (60 ml) y bicarbonato de di-terc-butilo (8.73 gramos, 40 mmol) en el orden especificado. La mezcla fue agitada durante 1.75 horas a 60 °C. Se agregó agua (50 ml) y la solución fue lavada con diclorometano (4 x 25 ml). La fase acuosa fue enfriada a 0 °C con hielo y luego se acidificó con 2 M de HCl (pH = 3) y se extrajo con diclorometano (4 x 25 ml). La fase orgánica fue secada con sulfato de magnesio. La evaporación facilitó (compuesto 10a) 6.8 gramos en forma de aceite incoloro. <sup>1</sup>H-NMR: δ 9.5 (1H, COOH), 5.3 (1H, CH), 4.7 (1H, NH), 4.3 (1H, NH), 3.1 (2H, CH<sub>2</sub>-NH), 1.8 (2H, CH<sub>2</sub>-CH), 1.5(6H,3xCH<sub>2</sub>), 1.45 (18H, 6 x CH<sub>3</sub>).

**Ejemplo 41: Preparación de éster de di-Boc-Lisina-propargilo (compuesto 10b) C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> Mw 384.47**

**[0548]**



**[0549]** Se disolvió Boc-Lis-(Boc)-OH (compuesto 10a) (3.46 g, 10 mmol) en THF (25 ml). Una solución, a 0 °C, de dicitohexilcarbodiimida (2.02 g, 10 mmol) en THF (25 ml) y trietilamina (1.39 ml) fue agregada en el orden especificado. A la mezcla se le permitió calentarse a la temperatura del cuarto y se agitó durante 18 horas. La suspensión resultante fue filtrada y evaporada. El aceite 5.45 g fue pre-purificado por medio de cromatografía de columnas heptano: etilacetato 3:1.

Se generó el 10b puro por medio de HPLC- C18 10% de MeOH: 90% de H<sub>2</sub>O → 100% MeOH

<sup>1</sup>H-NMR: δ 5.1 (1H, NH), 4.75 (2H, CH-C-CH<sub>2</sub>-O). 4.6 (1H, NH), 4.35 (1H, CH-NH), 3.1 (2H, CH<sub>2</sub>-NH) 2.5 (1H, CH-CCH<sub>2</sub>), 1.9-1.4 (6H, 3 x CH<sub>2</sub>), 1.5 (18H, 6 x CH<sub>3</sub>)

**Ejemplo 42: Preparación de 5-yodo-3',5'-di-O-TBDMS-2'-deoxicidina (compuesto 10c) C<sub>21</sub>H<sub>40</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>2</sub> Mw 581.64**

**[0550]**



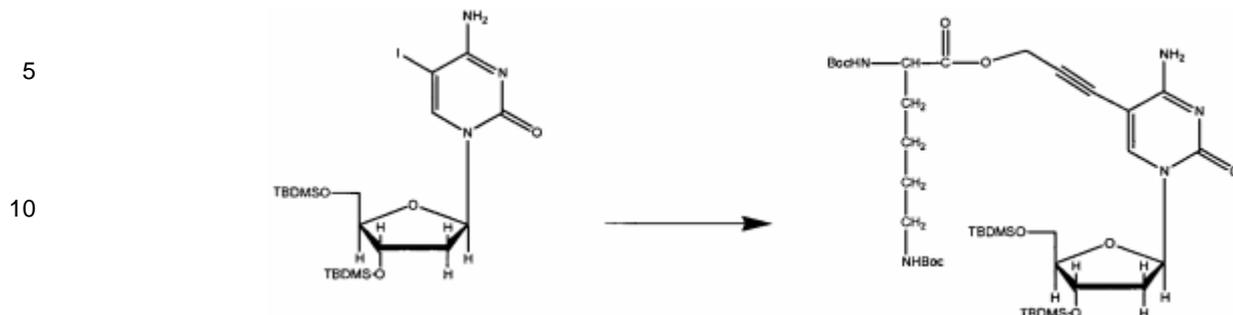
**[0551]** Se disolvió 5-yodo-2-deoxi-Citidina (Sigma I -7000, 0.353 g, 1 mmol) en DMF (4 ml), se agregó cloruro de sililo de t-Butil-dimetilo (TBDMS-Cl, 0.332 g, 2.2 mmol) y imidazol (0.204 g, 3 mmol). La solución fue agitada durante 15 horas a 50 °C seguido por una evaporación. Se agregó diclorometano (25 ml) y ácido cítrico (2M, 10 ml) a la mezcla seca. La fase acuosa fue extraída y recuperada con diclorometano (2 x 10 ml). Las fases orgánicas combinadas fueron lavadas con bicarbonato de sodio saturado (15 ml), secadas con sulfato de sodio y evaporadas. El compuesto 10 c (0.405 g) fue obtenido por medio de la cristalización de EtOH/Etilacetato.

<sup>1</sup>H-NMR: δ 8.1 (1H, H-6), 6.25 (1H, H-1'), 4.35 (1H, H-4'), 4.0 (1H, H-4'), 3.9 (1H, H-5'), 3.75 (1H, H-5'), 2.5 (1H, H-2'),

1.95 (1H, H-2'), 1.85 (2H, NH), 0.95 (9H, 3 x CH<sub>3</sub>), 0.9 (9H, 3 x CH<sub>3</sub>), 0.15 (6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 0.1 (6H, 2 x CH<sub>3</sub>).

**Preparación de 5-(éster de di-Boc-Lisina-propargilo)-3',5'-di-O-TBDMS-2'-deoxicidina (compuesto 10d) C<sub>40</sub>H<sub>71</sub>IN<sub>5</sub>O<sub>10</sub>Si<sub>2</sub>Mw 838.19**

[0552]

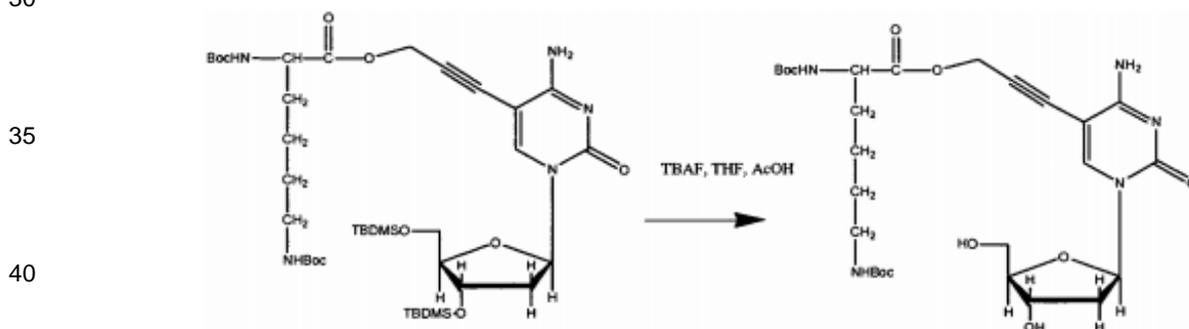


[0553] El compuesto 10c (0.116 gramos, 0.2 milimoles) fue disuelto en diclorometano (10 ml) el aire se reemplazó cuidadosamente con argón. Se agregó éster de di-Boc-Lisina-propargilo (compuesto 10b) (0.232, 0.6 mmol), trietilamina (0.083 ml, 0.6 mmol), di-cloro-bis-trifenilfosfina-paladio II (0.0074 g, 0.01 mmol) y yoduro de cobre (I) (0.0038 g, 0.02 mmol) en el orden especificado. La mezcla de la reacción fue agitada durante 15 horas a la temperatura del cuarto en una atmósfera inerte. La mezcla de la reacción fue evaporada, re-disuelta en MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1 1 ml y purificada utilizando un 45% de H<sub>2</sub>O:55% de MeCN → 100% de MeCN.

<sup>1</sup>H-NMR: δ 8.2 (1H, H-6), 6.25 (1H, H-1'), 5.15 (1H, NH), 4.9 (2H, C-CH<sub>2</sub>-O), 4.6 (1H, NH), 4.4 (1H, H-4'), 4.3 (1H, CH-NH), 4.0 (1H, H-4'), 3.9 (1H, H-5'), 3.75 (1H, H-5'), 2.5 (1H, H-2'), 3.1 (2H, CH<sub>2</sub>-NH), 1.95 (1H, H-2'), 1.9-1.4 (6H, 3 x CH<sub>2</sub>), 1.85 (2H, NH), 1.5 (18H, 6 x CH<sub>3</sub>), 0.95 (9H, 3 x CH<sub>3</sub>), 0.9 (9H, 3 x CH<sub>3</sub>), 0.15 (6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 0.1 (6H, 2 x CH<sub>3</sub>)

Ejemplo 44: Preparación de 5-(éster de di-Boc-Lisina-propargil)-2'-deoxicidina (compuesto 10e) C<sub>28</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub> Mw 609.67

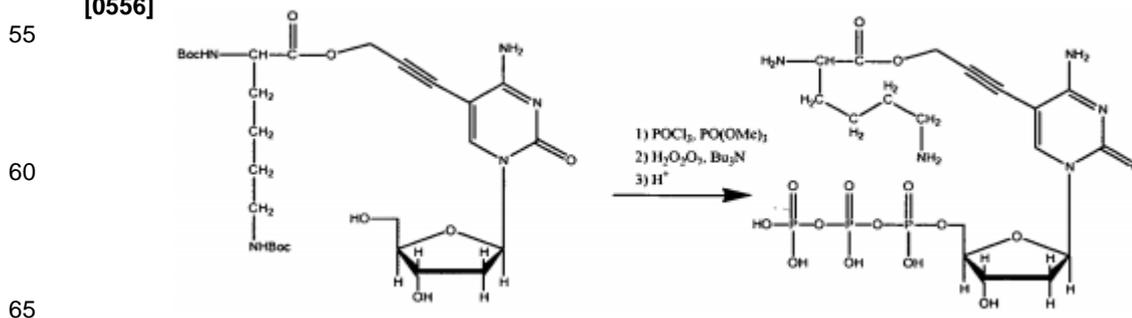
[0554]



[0555] El compuesto 10d (0.0246 gramos, 0.029 milimoles) se disolvió en THF (1 ml) y se agregó sucesivamente ácido acético (0.0165 mililitros, 0.288 milimoles) y tri-hidrato de fluoruro de amonio de tetra n-butilo (0.0454 gramos, 0.144 milimoles). La mezcla de la reacción fue agitada durante 18 horas a la temperatura del cuarto y después se evaporó. Se re-disolvió en diclorometano y se purificó en sílice (1 x 18 cm). Diclorometano/MeOH 8:2. Las fracciones que dieron una absorción ultravioleta en TLC fueron agrupadas y evaporadas dando (0.0128 gramos) en forma de un aceite incoloro.

Ejemplo 45: Preparación de 5-(éster de Lisina-propargilo)-5'-trifosfato-2'-deoxicidina C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>N<sub>5</sub>O<sub>15</sub>P<sub>3</sub> Mw 649.38

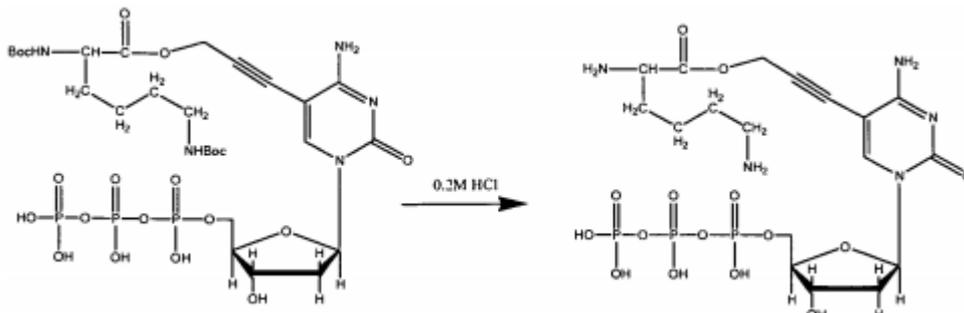
[0556]



[0557] El compuesto 10e (0.0128 gramos, 0.021 milimoles) se disolvió en trimetilfosfato (0.150 ml) y se enfrió a 0 °C. Se agregó lentamente fosforoxiclورو en trimetilfosfato (1 M, 0.0246 ml) para no elevar a la temperatura. La agitación continuó durante 2 horas a 0 °C y a la temperatura se le permitió elevarse a la temperatura ambiente. Se agregó simultáneamente pirofosfato en DMF (0.5 M, 0.1025 ml, 0.051 milimoles) y amina de tri-n-butilo en DMF (1 M, 0.0122 ml, 0.051 mmol). La agitación continuó durante 15 minutos a la temperatura del cuarto y se agregó TEAB (bicarbonato de amonio de trietilo - triethyl ammonium bicarbonate, 1M, pH = 7.3, 0.50 ml). La agitación continuó durante 3 horas y luego se evaporó.

#### Ejemplo 46: Preparación del compuesto X

[0558]

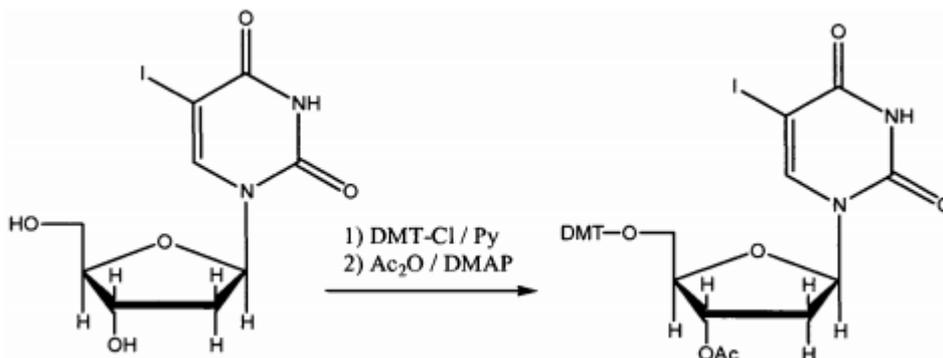


[0559] El material crudo fue tratado con ácido clorhídrico acuoso (0.2 M, 1 ml) durante 15 minutos a 30 °C. El compuesto X fue obtenido por medio de HPLC C18 10 mM TEAA (acetato de trietilamonio - triethylammonium acetate) en agua a 10 mM de TEAA con un 20% de agua en acetonitrilo. Fracciones apropiadas fueron desaladas utilizando filtraciones de gel (farmacia G-10, 0.7 ml)

#### Ejemplos 47 al 51: Preparación del bloque de construcción de mononucleótidos (XI)

Ejemplo 47: Preparación de 3'-O-acetil-5'-O-dimetoxitritil-5-yodo-2'-deoxiuridina (compuesto 11a). C<sub>32</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>. Mw 698.51 g/mol. (Análogo a "Oligonucleotide Synthesis - a practical approach" ("Síntesis de Oligonucleótidos - un método práctico") (1984) Gait, M.J. (Ed.), IRL Press, Oxford.)

[0560]

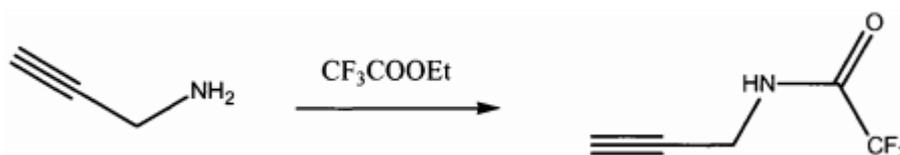


[0561] 5-yodo-2'-deoxiuridina (3.54 g, 10 mmol) fue secada por medio de co-evaporación con piridina (25 ml, 3 veces). Se agregó piridina (100 ml) y se evaporó pronto a un volumen reducido (80 ml). Se agregó cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (DMT-Cl, 3.38 g, 10 mmol) y la mezcla de la reacción fue agitada a la temperatura del cuarto. Después de 20 horas, se agregó DMT-Cl (0.68 g, 2 mmol) adicional y la mezcla de la reacción fue agitada durante otras 4 horas. El exceso de DHT-Cl fue neutralizado con metanol (5 ml, agitado durante 10 minutos) y la mezcla de la reacción fue evaporada hasta secarse. El aceite fue disuelto en diclorometano (100 ml) y extraído con NaHCO<sub>3</sub> (100 ml) acuoso saturado. La fase acuosa fue extraída y recuperada con diclorometano y las fracciones combinadas de diclorometano fueron secadas con MgSO<sub>4</sub> anhídrido, filtradas y evaporadas. El aceite crudo fue disuelto en diclorometano (75 ml) y triturado con pentano (250 ml). La re-trituración del aceite crudo al disolverse en acetato etílico (75 ml) y al agregar pentano (250 ml) dio una espuma roja después de la evaporación. La producción de la 5'-O-dimetoxitritil-5-yodo-2'-deoxiuridina cruda fue 5.84 gramos. La 5'-O-dimetoxitritil-5-yodo-2'-deoxiuridina cruda fue obtenida por medio de cromatografía en diclorometano en sílice (Merck Kieselgel 60, 230-400 mesh ASTM, art. 9385) eluyéndose con un gradiente de metanol (0-5% de metanol en diclorometano). La generación purificada de 5'-O-dimetoxitritil-5-yodo-2'-deoxiuridina fue 4.26 gramos (6.5 milimoles, 65%). La 5'-O-dimetoxitritil-5-yodo-2'-deoxiuridina (6.0 g, 9.1 mmol) fue secada por medio de co-evaporación con piridina (10 ml, 2 veces). Se agregó piridina (50 ml) y anhídrido acético (5 ml) y dimetilaminopiridina (DMAP, un monto catalítico). La mezcla de la

reacción fue agitada durante la noche a la temperatura del cuarto. El exceso de anhídrido acético fue neutralizado con metanol (10 ml, agitado durante 15 min.) y la mezcla de la reacción fue evaporada hasta secarse. El aceite fue disuelto en diclorometano (150 ml) y extraído con NaHCO<sub>3</sub> (50 ml) saturado acuoso. La fase acuosa fue extraída y recuperada con diclorometano y las fracciones combinadas de diclorometano fueron secadas con MgSO<sub>4</sub> anhidrido, filtradas y evaporadas. La 3'-O-acetil-5'-O-dimetoxitritil-5-yodo-2'-deoxiuridina purificada fue obtenida por medio de cromatografía de columnas en diclorometano/metanol (98/2, volumen/volumen) en sílice (Merck Kieselgel 60, 230-400 mesh ASTM, art.9385) eluyéndose con un gradiente de metanol (2-6% de metanol en diclorometano). La producción fue 5.75 gramos (8.2 milimoles). La re - cromatografía en diclorometano/pentano (80/20, volumen/volumen) eluyéndose con un gradiente de metanol (2-6') generó a la 3'-O-acetil-5'-O-dimetoxitritil-5-yodo-2'-deoxiuridina (4.18 g, 6.0 mmol, 60%) purificada deseada.

Ejemplo 48: Preparación de N-trifluoroacetil-3-amidopropino (compuesto 11 b). C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>F<sub>3</sub>NO. Mw. 151.09 g/mol. (Referencia: Cruickshank et al. (1988) Tetrahedron (tetraedro) Lett. 29. 5221-5224)

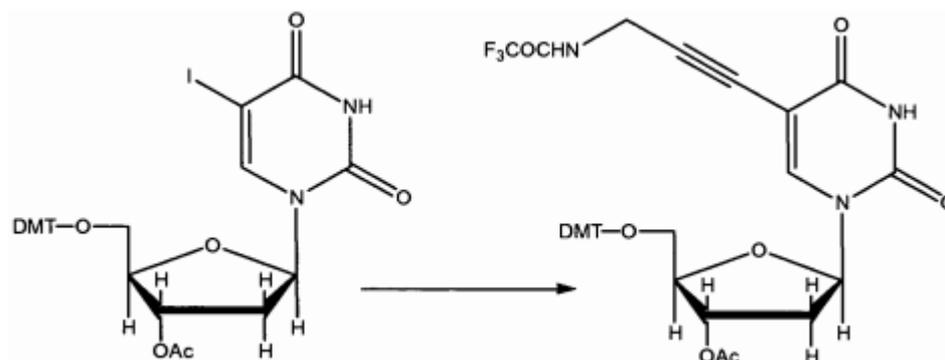
[0562]



[0563] La propargilamina (7.0 mililitros, 5.88 gramos, 0.11 moles) fue disuelta en 100 ml de metanol helado y trifluoroacetato etílico (18 ml, 19.2 g, 0.135 mol) fue agregado lentamente agitándose en hielo. El baño de hielo fue removido y a la mezcla de la reacción se le permitió calentarse a la temperatura del agua y agitarse lo cual continuó durante la noche. Después de 24 horas, el análisis de TLC (sílice, diclorometano/metanol, 9/1, volumen/volumen) mostró una conversión completa de la propargilamina (tal como se observó por la desaparición del color positivo-la reacción en la prueba de ninhidrina, 110 °C). La mezcla de la reacción fue evaporada, re-disuelta en diclorometano (100 ml) y extraída con carbonato de hidrógeno de sodio acuoso. La fase acuosa fue extraída y recuperada con diclorometano (25 ml) y las fases combinadas de di cloro metano fueron extraídas con agua (100 ml). La fase acuosa fue extraída y recuperada con diclorometano (25 ml) y las fases combinadas de diclorometano fueron secadas con sulfato de magnesio, filtradas y evaporadas a un aceite amarillo. El aceite fue purificado por medio de destilación recolectando al producto purificado a 38-39 °C / 1 mmHg. Producción 11.0 gramos (73 mmol, 66%).

Ejemplo 49: Preparación de 3'-O-acetil-5'-O-dimetoxitritil-5-(N-trifluoro-acetil-3-amido-propinil)-2'-deoxiuridina (compuesto 11c). C<sub>35</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>. Mw 625.67 g/mol.

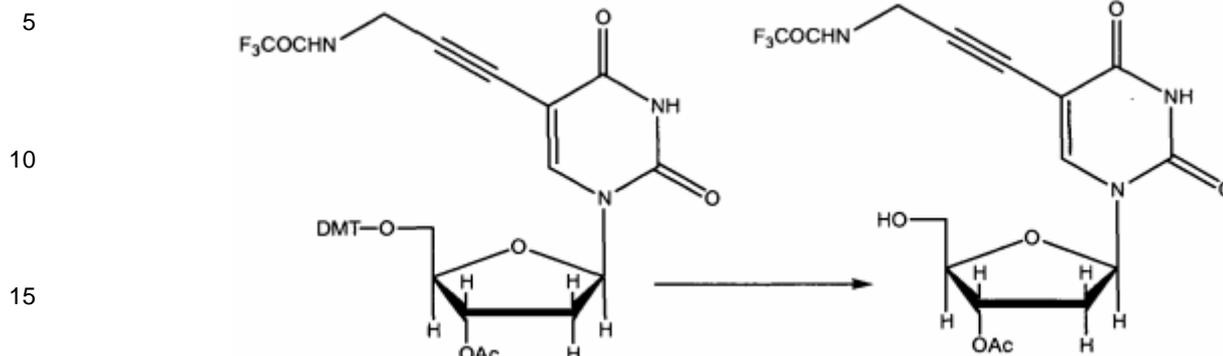
[0564]



[0565] 3'-O-Acetil-5'-O-dimetoxitritil-5-yodo-2'-deoxiuridina (4.15 g, 6.0 mmol) fue disuelta en acetato etílico (240 ml) y se agregaron N- trifluoroacetil-3-aminopropino (1.81 g, 12 mmol), trietilamina (3.09 g, 4.23 ml, 30.5 mmol), cloruro de bis(trifenilfosfina)-paladio(II) (0.091 g, 0.13 mmol) y yoduro de cobre (I) (0.091 g, 0.48 mmol) en el orden especificado. La mezcla de la reacción fue lavada con nitrógeno, cubierta y agitada a la temperatura ambiente. La reacción fue seguida por un análisis de TLC (sílice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MEOH, 95/5, v/v) y detenida después de 24 horas cuando todo el material de inicio fue consumido. La mezcla de la reacción fue extraída 2 veces con EDTA (5% v/v, 300 ml) acuoso y una vez con el tiosulfato de sodio (5% v/v, 300 ml). Las fases acuosas fueron extraídas y recuperadas con acetato etílico y las fracciones combinadas de acetato etílico fueron secadas (MgSO<sub>4</sub> anhidrido), filtradas y evaporadas. La cromatografía de columna en diclorometano/pentano (80/20, v/v) eluyéndose con un gradiente de metanol (0-5%) dio a la 3'-O-acetil-5'-O-dimetoxitritil-5-(N-trifluoroacetil-3-amido-propinil)-2'-deoxiuridina cruda (4.2 g) en forma de un aceite café. La re-cromatografía en etilacetato/pentano (50/50 a 60/40, volumen/volumen) dio al producto purificado deseado (1.99 gramos, 3.2 milimoles).

Ejemplo 50: Preparación de 3'-O-acetil-5-(N-trifluoroacetil-3-amidopropinil)-2'-deoxiuridina. C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>. Mw 419.31 g/mol.

[0566]



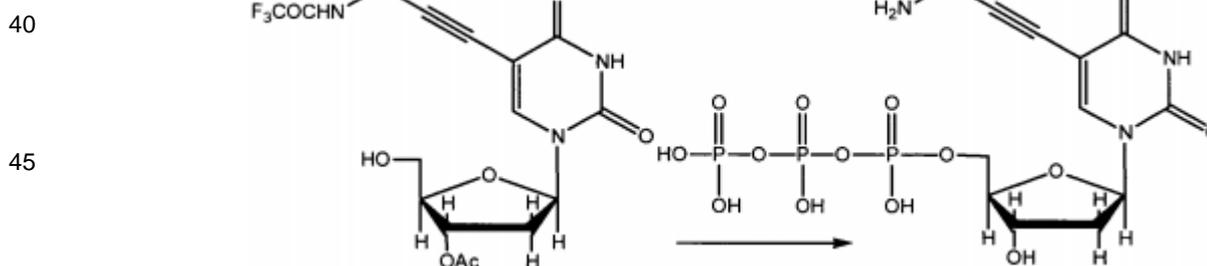
20 [0567] Se disolvió 3'-O-acetil-5'-O-dimetoxitritil-5-(N-trifluoroacetil-3-amidopropinil)-2'-deoxiuridina (1.99 g, 2.8 mmol) en diclorometano (133 ml) y se enfrió a 0 °C. Una solución de ácido tricloroacético en diclorometano (3%, masa/volumen) fue agregada lentamente a la mezcla de la reacción la cual fue agitada durante 15 minutos a 0 °C. El análisis de TLC (sílice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95/5 v/v) confirmó la destitución total y la reacción fue neutralizada por medio de la adición de 2-propanol (10 ml), donde la neutralización del DMT<sup>+</sup> fue observada por un cambio de color de naranja a incoloro. Se continuó agitando durante 2 minutos y mezcla de la reacción fue vertida en NaHCO<sub>3</sub> (100 ml) acuoso saturado y extraída 2 veces con diclorometano. La fase acuosa fue extraída y recuperada con diclorometano y las fracciones combinadas de diclorometano fueron secadas (MgSO<sub>4</sub> anhidrido), filtradas y evaporadas. La espuma fue disuelta en diclorometano (50 ml) y triturada con pentano (200 ml). La trituración fue repetida y la precipitación fue re-disuelta y evaporada, primero a partir del metanol y luego a partir del cloroformo para dar una espuma amarilla. La 3'-O-acetil-5-(N-trifluoroacetil-3-amidopropinil)-2'-deoxiuridina purificada fue obtenida por medio de cromatografía de columna de gel sílice en dicloroetano/metanol (gradiente: 95/5 a 89/11, volumen/volumen). La producción fue 0.37 gramos después de la re-cromatografía, eluyéndose con un gradiente en diclorometano/metanol (98/2 a 95/5, volumen/volumen).

25

30

35 Ejemplo 51: Preparación de 5-(3-aminopropil)-5'-trifosfato-2'-deoxiuridina, sal de trietilamonio (compuesto XI). C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>14</sub>P<sub>3</sub> + n·N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. Mw 824.78 g/mol para n = 3. (Ludwig, J. y Eckstein, F. (1989) J. Org. Chem. 54, 631-635)

[0568]



55 [0569] Se disolvió 3'-O-acetil-5-(N-trifluoroacetil-3-amidopropinil)-2'-deoxiuridina (42.5 mg, 0.10 mmol) en piridina anhidra (2 ml) y se evaporó. El aceite fue disuelto en piridina anhidra (100 µl) y dioxano anhidro (300 µl). Una solución de 2-cloro-4H-1,3,2-benzodioxafosforina-4-ona en dioxano (100 µl, 1M, 0.11 milimoles) fue agregada agitando y después de 30 segundos se observó una precipitación de hidrocloreto de piridinio. La mezcla de la reacción fue agitada durante 10 minutos a la temperatura del cuarto seguido por una adición simultánea de pirofosfato de bis(tri-n-butilamonio) en DMF (300 µl, 0.5 M) y tri-n-butilamina (100 µl). Se continuó agitando durante 10 minutos y el intermedio fue oxidado al agregar una solución de yodo (3 ml, 1% masa/volumen en piridina/agua (98/2, volumen/volumen)) hasta alcanzar el color permanente del yodo. La mezcla de la reacción fue dejada a reposar durante 15 minutos y luego se le quitó el color con tiosulfato de sodio (4 gotas, 5% de una solución acuosa, masa/volumen). La mezcla de la reacción fue transferida a un matraz de fondo redondo (50 ml) con agua y se evaporó hasta obtener un aceite amarillo. El aceite fue agitado en agua (10 ml) durante 30 minutos y se agregó una concentración de amonio acuoso (20 ml, 32%). Esta mezcla fue agitada durante una hora a la temperatura del cuarto y luego evaporada a un aceite del producto del trifosfato crudo. El material crudo fue purificado utilizando una columna DEAE Sephadex A25 (aproximadamente 100 ml) eluida con un gradiente lineal de hidrogenocarbonato de trietilamonio [TEAB - triethylammonium hydrogencarbonate] de desde 0.05 M a 1.0 M (pH de aproximadamente 7.5-8.0); flujo de 8 ml/fracción/15 minutos. Las fracciones positivas fueron identificadas por medio de RP18 HPLC

60

65

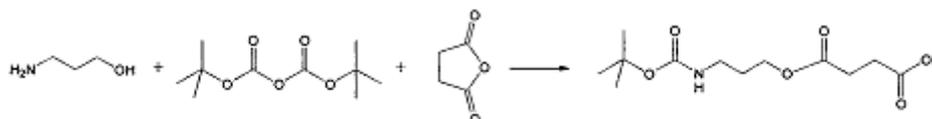
eluyéndose con un gradiente de desde 10 mM de TEAA (acetato de trietilamonio - triethylammonium acetate) en agua a 10 mM de TEAA con un 20% de agua en acetonitrilo. Las fracciones apropiadas fueron agotadas y evaporadas. Producción aproximadamente 90 mg.

## 5 Ejemplo 52 a 54: Preparación del bloque de construcción de mononucleótidos (XII)

### Ejemplo 52: Éster de mono-(3-*terc*-butoxicarbonilamino-propilo) de ácido succínico

#### [0570]

10



12a

15

[0571] Se agregaron trietilamina (5.0 mililitros, 36 mmol) y bicarbonato de di-*terc*-butilo (7.0 gramos, 32 mmol) a una solución de 3-aminopropanol (1.0 gramos, 26.6 milimoles) en metanol (10 ml). La solución fue agitada durante 2 horas a la temperatura del cuarto. El metanol fue evaporado y el residuo fue disuelto en agua (50 ml) y extraído con diclorometano (50 ml). La fase orgánica fue secada (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y concentrada al vacío. El material crudo fue disuelto en diclorometano (20 ml) y DMF (4 ml). Se agregaron trietilamina (5.0 mililitros, 36 mmol) y anhídrido succínico (3.0 g, 30 mmol) en forma de porciones a la solución (la reacción exotérmica). La mezcla de la reacción fue agitada durante 2 horas, luego concentrada y procesada por medio de RP-HPLC (eluyente: agua → metanol). Producción 6.0 gramos, 82%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 4.2 (2H, CH<sub>2</sub>), 3.2 (2H, CH<sub>2</sub>), 2.7 (4H, 2 x CH<sub>2</sub>), 1.8 (2H, CH<sub>2</sub>), 1.4 (9H, 3 x CH<sub>3</sub>).

20

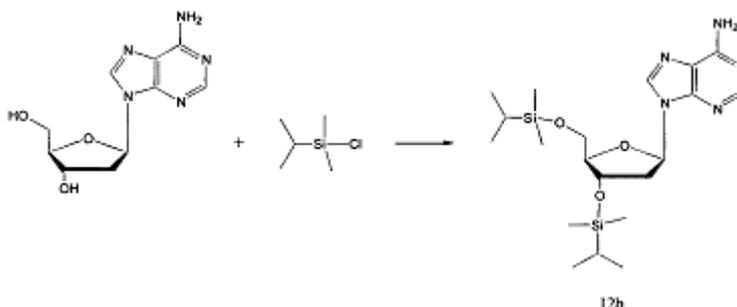
25

### 9-[4-(isopropil-dimetil-silaniloxi)-5-(isopropil-dimetil-silaniloximetil)-tetrahydro-furan-2-il]-9H-purin-6-ilamina (compuesto 12b)

#### [0572]

30

35



12b

40

[0573] Se agregaron imidazol (: 0 g, 29.4 milimoles) y cloruro de *terc*-butildimetilsililo (3.0 g, 19.9 milimoles) a una solución de monohidrato de deoxiadenosina (1.33, 4.94 milimoles) en DMF (10 mililitros). La solución fue agitada a 60 °C durante la noche. La mezcla fue concentrada en un sólido al vacío. Un proceso por medio de cromatografía de destellos género al compuesto transparente 12c en una producción de 2.1 gramos, 94%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 8.3 (1H, HC=), 8.1 (1H, HC=), 6.4 (1H, CH), 6.0 (2H, 2 x OH), 4.6 (1H, CH), 4.1 (1H, CH), 3.9 (1H, CH), 3.8 (1H, CH), 2.6 (1H, CH<sub>2</sub>), 2.4 (1H, CH<sub>2</sub>), 0.9 (18H, 6 x CH<sub>3</sub>), 0.0 (12H, 4 x CH<sub>3</sub>).

50

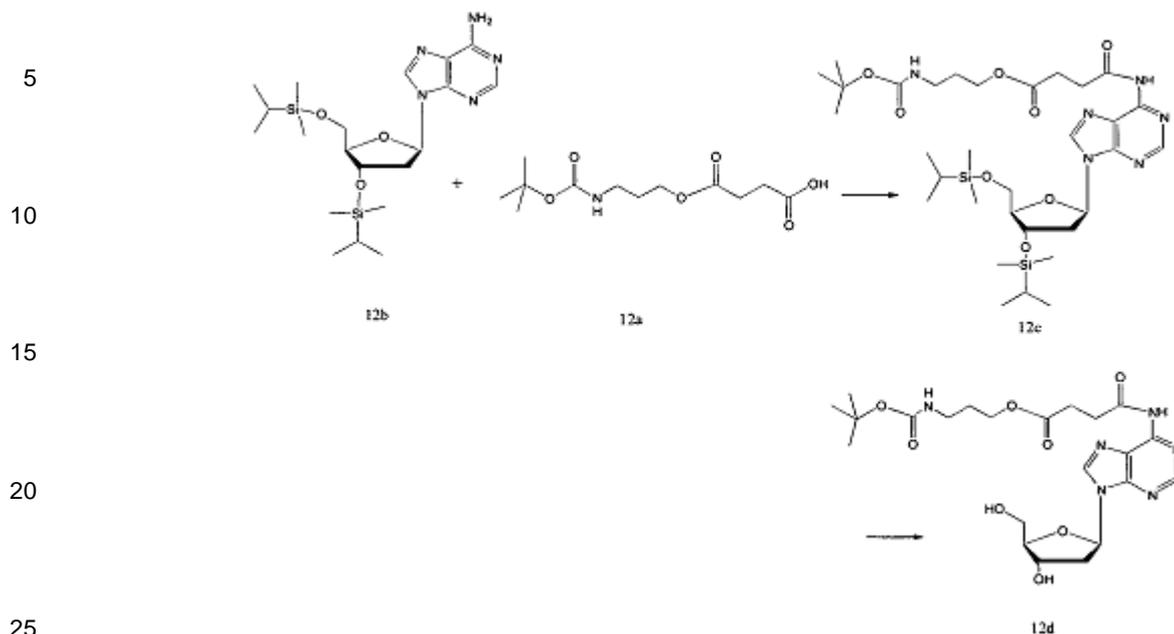
### Ejemplo 53: Éster de 3-*terc*-butoxicarbonilamino-propilo de ácido N-[9-(4-hidroxi-5-hidroximetil-tetrahydrofurano-2-il)-9H-purin-6-il]-succinámico.

55

60

65

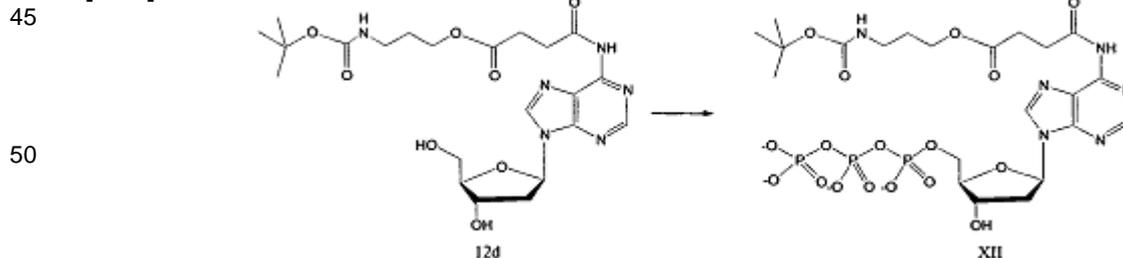
[0574]



[0575] Una solución de diclohexilcarbodiimida (366 mg, 1.78 mmol) en acetato etílico (15 mL) fue agregada a una solución enfriada con agua helada de 12a (488 mg, 1.78 milimoles) en THF (10 ml). Algunos cristales de 4-dimetilaminopiridina y 12b (850 mg, 1.78 milimoles) fueron agregados. La temperatura de la reacción se elevó lentamente a la temperatura del cuarto y la mezcla fue agitada durante la noche. Las sales precipitadas fueron filtradas. La fase orgánica fue lavada con NaHCO<sub>3</sub> (20 mL) saturado, secada (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y concentrada a un sólido. Aproximadamente 20 mg de 12c fueron aislados después de un lavado por medio de cromatografía y 510 mg del material inicial de 12b fueron recuperados. El 12c (20 mg) fue disuelto en THF (2 ml). Se agregaron trihidrato de tetrabutilamonio (100 mg) y ácido acético (0.2 mililitros). La mezcla fue agitada durante un día, luego concentrada al vacío y procesada por medio de la mastografía de columna. Producción 10 mg. Compuesto 12c. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 8.4 (1H, HC=), 8.2 (1H, HC=), 6.4 (1H, CH), 5.8 (2H, 2 x OH), 4.6 (1H, CH), 4.2 (2H, CH<sub>2</sub>), 4.1 (1H, CH), 3.8 (1H, CH), 3.7 (2H, CH<sub>2</sub>), 3.0 (4H, 2 x CH<sub>2</sub>), 2.7 (3H, 2 x CH<sub>2</sub>), 2.4 (1H, CH<sub>2</sub>), 1.8 (2H, CH<sub>2</sub>), 1.4 (9H, 3 x CH<sub>3</sub>), 0.9 (18H, 6 x CH<sub>3</sub>), 0.0 (12H, 4 x CH<sub>3</sub>). Información seleccionada de NMR para 12d: <sup>1</sup>H-NMR (MeOD-D<sub>3</sub>): δ 4.6 (1H, CH), 4.1 (2H, CH<sub>2</sub>), 3.8 (1H, CH), 3.7 (1H, CH), 3.6 (2H, CH<sub>2</sub>), 3.2 (2H, CH<sub>2</sub>), 3.0 (2H, CH<sub>2</sub>), 2.8 (3H, 2 x CH<sub>2</sub>), 2.5 (1H, CH<sub>2</sub>), 1.8 (2H, CH<sub>2</sub>), 1.4 (9H, 3 x CH<sub>3</sub>).

Ejemplo 54: Éster de 3-*tert*-butoxicarbonilamino-propilo de ácido N-[9-(4-hidroxi-5-hidroxiometil-tetrahidrofuran-2-il)-9H-purin-6-il]-succinámico

[0576]



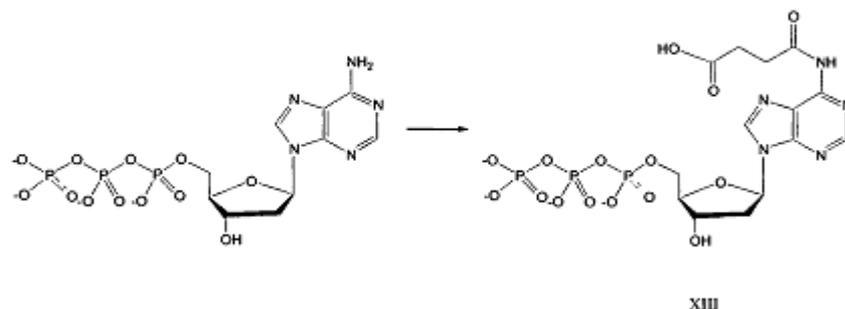
[0577] LH8075b (10 mg) fue convertido al trifosfato LH8075c correspondiente utilizando el procedimiento descrito para la síntesis del compuesto VII. El TLC indicó la conversión completa del compuesto 12d.

[0578] Inmediatamente antes de su incorporación, el grupo *tert*-butoxi puede haber sido hidrolizado para liberar al ácido carboxílico libre. Alternativamente, el grupo *tert*-butoxi puede haber sido separado después de la formación de la molécula modelada.

Ejemplo 55: Ácido N-[9-(4-hidroxi-5-(O-trifosfato-hidroxiometil)-tetrahidrofuran-2-il)-9H-purin-6-il]-succinámico (compuesto XIII)

65

[0579]

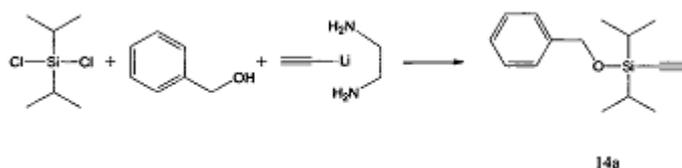


15 **[0580]** Se suspendió a dATP (5  $\mu$ mol) en DMF (4 x 1 mL) y luego se concentró a un sólido al vacío 4 veces. El sólido fue suspendido en DMF (1 mL). Se agregó anhídrido succínico (5 mg, 0.05 mmol) a  $-20$  °C. La mezcla fue agitada durante 3 horas, y luego concentrada a un sólido y purificada por medio de RP-HPLC (eluyente: 0.1 por ciento de HCOOH en agua  $\rightarrow$  10% de metanol, 0.1 por ciento de HCOOH en agua). El material purificado fue disuelto en amonio acuoso (25%, 1 ml) y agitado durante 3 horas. La mezcla fue concentrada al vacío y procesada por medio de RP-HPLC (eluyente: 0.1 por ciento de HCOOH en agua  $\rightarrow$  10% de metanol, 0.1 por ciento de HCOOH en agua). Una comparación con el material inicial indicó que el producto se eluyó 40s después de la columna que el material inicio.

#### Ejemplo 56 y 57: Preparación de bloques de construcción de mononucleótidos (XIV)

25 Ejemplo 56: Benciloxi-etinil-diisopropilo-silano (compuesto 14a)

[0581]



35 Una solución de alcohol bencilico (0.1 mililitros, 1.0 mmol) en THF (0.5 mililitros) fue agregada en forma de gotas a una solución enfriada ( $-78$  °C) de diisopropiletilamina (1 mL), diclorodiisopropilsilano (0.3 mL, 1.62 mmol) en THF (4 mL). La solución fue agitada durante 3 horas ( $-78 \rightarrow -20$  °C). La mezcla fue enfriada a  $-78$  °C y se agregó un complejo de litioacetilida-etilendiamina (250 mg, 2.71 mmol). La mezcla de la región fue agitada durante 5 horas ( $-78 \rightarrow 20$  °C). Se agregó agua (4 ml). La mezcla fue extraída con diclorometano (20 ml). La fase orgánica fue secada ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y concentrada. El compuesto 14a (100 mg, 41%) fue obtenido después de cromatografía de destellos.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.4 (5H, 5 x HC=), 5.0 (2H, CH<sub>2</sub>), 2.6 (1H, CH), 1.0 (14H, 2 x CH, 2 x CH<sub>3</sub>).

40 Ejemplo 57: 5-[[Diisopropil-(2-metileno-pent-3-eniloxi)-silanil]-etinil]-1-(4-hidroxi-5-(O-trifosfatohidroximetil)-tetrahidrofuran-2-il)-1H-pirimidina-2,4-diona (compuesto XIV)

45

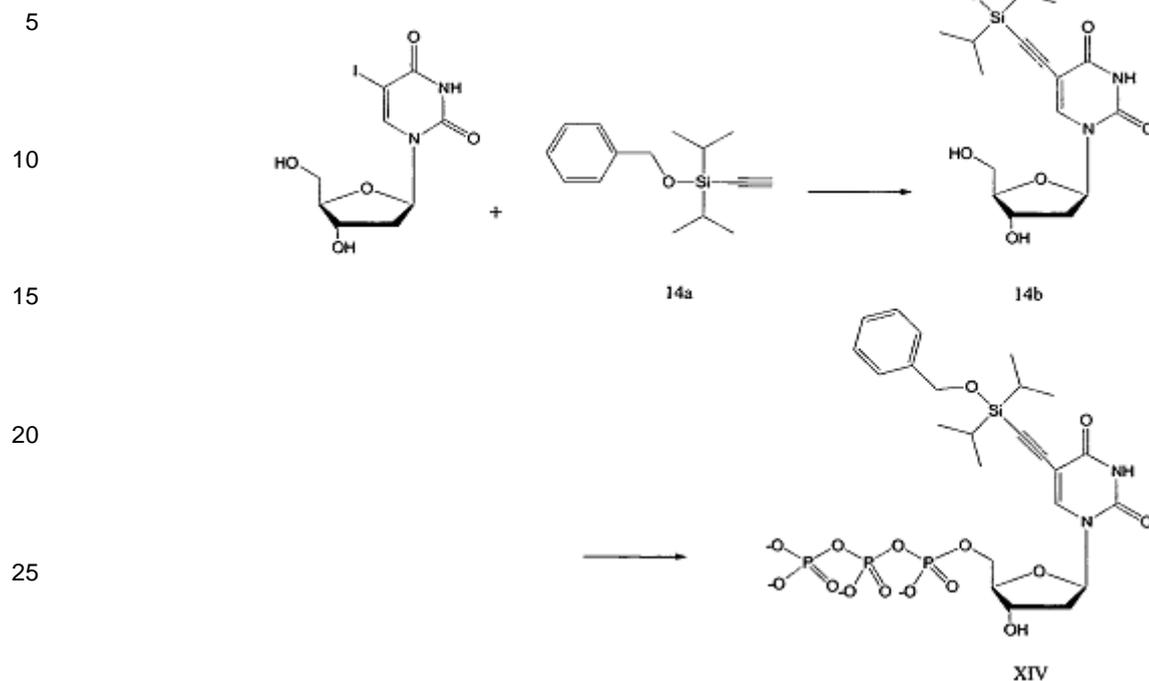
50

55

60

65

[0582]

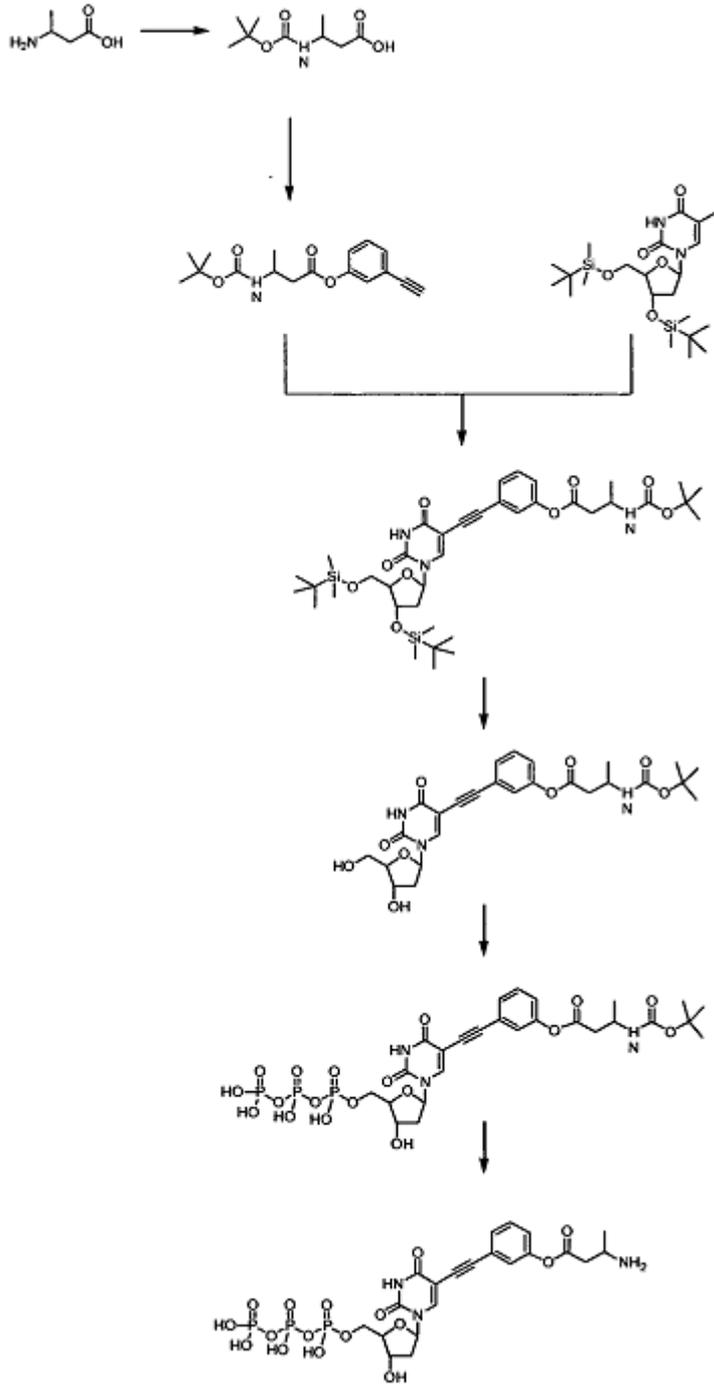


[0583] Se disolvieron 5-yodo-dUTP (200 mg, 0.56 mmol), diisopropiletilamina (0.1 mL) y 14a (100 mg, 0.41 mmol) en DMF (2 ml). Se hizo burbujas con argón a través de la solución durante 5 minutos. Se agregaron Tetrakispladio (57 mg, 0.49 mmol) y CuI (19 mg, 0.1 mmol) y la mezcla fue agitada durante 5 horas a 50 °C. El solvente fue evaporado y sacado, y el 14b fue purificado por medio de cromatografía de destellos. Un espectro NMR reveló que el jarabe consistía de un 66%. El jarabe fue (40 mg) convertido al trifosfato correspondiente (compuesto XIV) utilizando el procedimiento descrito en la síntesis del compuesto VII. El TLC indicó una conversión completa del 14b. Información seleccionada de NMR para LH8061a: <sup>1</sup>H-NMR (MeOD-D3): δ: 8.3 (1H, HC=), 7.3 (5h, HC=), 6.2 (1H, CH), 5.0 (2H, CH<sub>2</sub>), 4.3 (1H, CH), 3.8-3.2 (3H, CH<sub>2</sub>, CH), 2.3 (1H, CH<sub>2</sub>), 2.2 (1H, CH<sub>2</sub>), 1.0 (14H, 2 x CH, 4 x CH<sub>3</sub>).

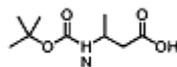
#### Ejemplo 58 a 63: Preparación del bloque de construcción de mono nucleótidos (XV)

[0584] El bloque de construcción XV podría ser preparado de acuerdo al esquema general que se muestra a continuación:

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50



55 Ejemplo 58: Preparación del compuesto 15a  
[0585]



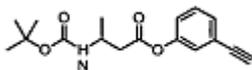
60 COMPUESTO 15a

[0586] A una solución de ácido 3-amino-butírico (2.06 g, 20 mmol) en NaHCO<sub>3</sub> (50% de sat. aq, 25 mL) se agregaron dicarbonato de di-terc-butilo (4.36 gramos, 20 mmol) y acetonitrilo (30 ml). La mezcla de la reacción fue agitada a la temperatura del cuarto durante 18 horas. Dicarbonato de di-terc-butilo (4.36 gramos, 20 mmol) fue agregado y la mezcla de la reacción fue agitada a la temperatura del cuarto durante 18 horas. Se agregó EtOAc (100 mL) y el pH fue ajustado a 4-5 por medio de la adición de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. El producto fue extraído a EtOAc (3 x 100 mL),

secado (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y evaporado hasta secarse completamente al vacío para generar al producto crudo 4.6 gramos (113%).

Ejemplo 59: preparación del compuesto 15b

**[0587]**



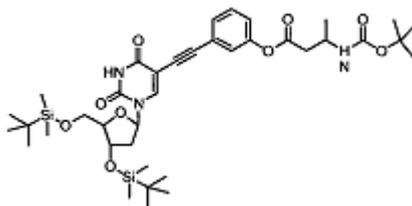
COMPUESTO 15b

**[0588]** El compuesto 28 (1.023 gramos, 5.0 milimoles), 3-etinil-fenol (Lancaster, 0.675 g, 12 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 300 mg, 2.5 mmol) fueron disueltos en EtOAc (10 mL). Se agregó Diciclohexilcarbodiimida (DCC, 2.06 g, 10 mmol) a la solución y después de 16 horas de agitación a la temperatura del cuarto, la mezcla la reacción fue filtrada y evaporada hasta secarse al vacío. El producto crudo fue purificado por medio de cromatografía de columnas sílice eluyéndose con un gradiente de EtOAc:Heptano (1:3)-(1:2)(v/v). Generación del producto 720 mg, 73%

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.36-7.09 (4H, m, Ph), 4.89 (1H, bs, NH), 4.22 (1H, bm, CH), 3.10 (1H, s), 2.77 (2H, d), 1.40 (3H, t), 1.32 (3H, d).

Ejemplo 60: Preparación del compuesto 15c

**[0589]**



COMPUESTO 15c

**[0590]** Una solución de éter de 3',5'-Di-terc-butildimetilsililo de 5-yodo-2'-deoxiuridina (730 mg, 1.25 mmol), trietilamina (250 mg, 2.5 mmol) y el compuesto (15b) (456 mg, 1.5 mmol) en DMF anhídrido (3 ml) fue agitada a la temperatura del cuarto. Se pasó N<sub>2</sub> a través de la solución durante 20 minutos.

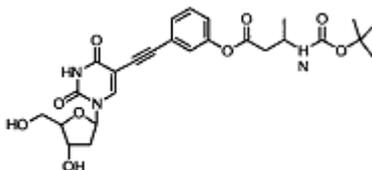
Se agregaron tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (109 mg, 0.094 mmol) y yoduro de cobre (I) (36 mg, 0.188 mmol) y la mezcla de la reacción fue agitada a la temperatura del cuarto durante 3 d.

La mezcla de la reacción fue evaporada y purificada por medio de cromatografía de columnas sílice eluyéndose con un gradiente de EtOAc:Heptano (1:3)-(1:2)(v/v). Generación del producto 807 mg, 85%.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.38 (1H, s), 8.08 (1H, s, 6-H), 7.39-7.1 (4H, m, Ph), 6.33 (1H, dd, 1'-H), 4.9 (1H, bs), 4.45 (1H, dt), 4.80 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 4.2 (1H, m), 4.02 (1H, m, 4'-H), 3.95 (1H, dd, 5'-H), 3.79 (1H, dd, 5''-H), 2.78 (2H, d), 2.36 (1H, m, 2'-H), 2.07 (1H, m, 2''-H), 1.46 (9H, s, <sup>t</sup>Bu), 0.93 (9H, s, <sup>t</sup>Bu), 0.91 (9H, s, <sup>t</sup>Bu), 0.15 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.13 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.11 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.09 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

Ejemplo 61: preparación del compuesto 15d

**[0591]**



COMPUESTO 15d

**[0592]** Una solución del compuesto (15c) (807 mg, 1.06 milimoles), ácido acético glacial (1.0 gramos, 16 mmol) y trihidrato de fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF – tetrabutylammonium fluoride trihydrate) (2.36 gramos, 7.5 milimoles) en 20 ml de THF seco fue agitada a la temperatura del cuarto durante 3 d.

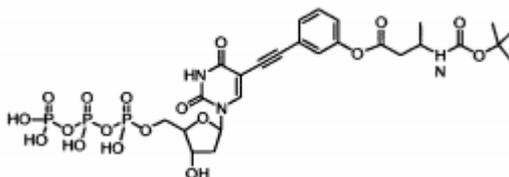
La mezcla de la reacción fue evaporada y purificada por medio de cromatografía de columna sílice eluyéndose con (DCM):(MeOH) (9:1) (v/v). Generación del producto 408 mg, 72%.

**[0593]** <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 8.46 (1H, s, 6-H), 7.39 (2H, m, Ph), 7.28 (1H, m, Ph), 7.12 (1H, m, Ph), 6.75 (1H, bd), 6.27 (1H, dd, 1'-H), 4.44 (1H, dt, 4'-H), 3.96 (1H, t, 3'-H), 3.86 (1H, dd, 5'-H), 3.77 (1H, dd, 5''-H), 2.72 (2H, d), 2.35-2.27 (2H, m, 2', 2''-H), 1.46 (9H, s, <sup>t</sup>Bu), 1.27 (3H, d).

5 **Ejemplo 62: Preparación del compuesto 15e**

[0594]

10

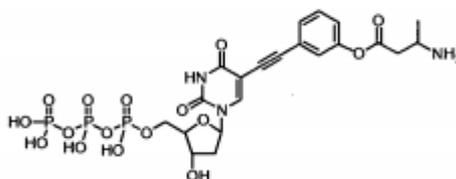


15

COMPUESTO 15e

20 **[0595]** El compuesto (15d) (138.5 miligramos, 260  $\mu\text{mol}$ ) fue disuelto en 500  $\mu\text{l}$  de trimetilfosfato seco. Después de enfriarse a 0 °C una solución de oxicloruro de fósforo ( $\text{POCl}_3$ ) en trimetilfosfato seco fue agregada (400  $\mu\text{l}$  de solución madre (120 mg/mililitros), 310  $\mu\text{mol}$ ). La mezcla de la reacción fue agitada a 0 °C durante 2 horas. Subsiguientemente una solución de tributilamonio pirofosfato (200 mg, 420  $\mu\text{mol}$  en 1.00 mililitros de DMF seco) y tributilamona (123 mg, 670  $\mu\text{mol}$  en 500  $\mu\text{l}$  de DMF seco) fue agregada a 0 °C. La reacción fue agitada a la temperatura del cuarto durante 3 minutos y luego fue detenida por medio de la adición de 1 ml de 1.0 M de trietilamonio hidrogenocarbonato.

25

Ejemplo 63: Preparación del compuesto XV30 **[0596]**

35

COMPUESTO XV

40 Remoción del grupo de protección N-Boc

**[0597]** Después de la fosforilación, 50  $\mu\text{l}$  de la mezcla de la reacción de fosforilación es ajustada a un pH = 1 utilizando HCl incubada a la temperatura del cuarto durante 30 minutos. La mezcla es ajustada a un pH 5.5 utilizando NaOH y Na-acetato (pH 5.5) equimolares antes de una purificación con TLC.

45 Purificación de derivados de nucleótidos utilizando cromatografía de capa delgada (TLC - thin-layer chromatography)

**[0598]** De la mezcla cruda, se colocaron 20 muestras de 2  $\mu\text{l}$  en un TLC de Gel de Kiesel 60 F254 (Merck). Solventes orgánicos y nucleósidos no fosforilados fueron separados de los derivados de nucleósidos utilizando un 100% de metanol como una solución ejecutora. Subsiguientemente, la placa de TLC es secada al aire y el derivado del nucleótido es identificado por medio de sombras ultravioleta. El Kiesel que contenía al derivado del nucleótido fue aislado y extraído 2 veces utilizando 10 mM de Na-acetato (pH = 5.5) como solvente. El gel de Kiesel fue removido por medio de centrifugación y el sobrenadante fue secado al vacío. El derivado de los nucleótidos fue re-suspendido en 50-100  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  a una concentración final de 1-3 mM. La concentración de cada derivado de nucleótido fue evaluada por medio de una absorción ultravioleta antes de utilizarse en reacciones de extensión de polimerasas.

55

Ejemplo 64: Incorporación de polimerasas de diferentes derivados de nucleótidos

**[0599]** Cebadores de extensiones diferentes fueron etiquetados 5' con  $^{32}\text{P}$  utilizando quinasas de polinucleótidos T4 usando el protocolo estándar (Promega, cat# 4103). Estos cebadores de extensión fueron reconocidos para un cebador tipo plantilla utilizando 0.1 y 3 pmol respectivamente en un amortiguador de extensión (20 mM de HEPES, 40 mM de KCl, 8 mM de  $\text{MgCl}_2$ , pH 7.4, 10 mM de DTT) al calentarse a 80 °C durante 2 minutos y luego enfriándose lentamente a alrededor de 20 °C. El nucleótido de tipo silvestre o los derivados de nucleótidos fueron agregados entonces (alrededor de 100  $\mu\text{M}$ ) e incorporados utilizando 5 unidades de transcriptasas reversas AMV (Promega, parte# 9PIM510) a 30 °C durante una hora. Las muestras fueron mezcladas con un colorante de formamida y ejecutadas en una electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea. El gel fue desarrollado utilizando auto radiografías (Kodak, BioMax film). La incorporación puede ser identificada por el cambio de movilidad diferentes para

60

65

los derivados de nucleótidos en comparación al nucleótido de tipo silvestre. La figura 49 muestra la incorporación de varios derivados de nucleótidos. En la línea 1-5 el cebador de extensión 5'-GCT ACT GGC ATC GGT-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1) fue utilizado junto con el cebador plantilla 5'-GCT GTC TGC AAG TGA TAA CCG ATG CCA GTA GC-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2), en la línea 6-11 el cebador de extensión 5'-GCT ACT GGC ATC GGT-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 3) fue utilizado junto con el cebador plantilla 5'-GCT GTC TGC AAG TGA TGA CCG ATG CCA GTA GC-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 4) y en la línea 12-15 el cebador de extensión 5'-GCT ACT GGC ATC GGT-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 5) fue utilizado junto con el cebador plantilla 5'-GCT GTC TGC AAG TGA CGT AAC CGA TGC CAG TAG C-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 6). La línea 1, dATP; la línea 2, el compuesto XI; la línea 3, el compuesto IX; la línea 4, el compuesto I; la línea 5, el compuesto II; la línea 6, no tenía nucleótidos; la línea 7, dCTP; la línea 8, el compuesto VII; la línea 9, el compuesto X; la línea 10, el compuesto IV; la línea 11, el compuesto III; la línea 12, sin nucleótidos; la línea 13, dTTP; la línea 14, dTTP y dATP; la línea 15, dTTP y el compuesto X. Estos resultados ilustran la posibilidad de incorporar una variedad de derivados de nucleótidos de dATP, dTTP y dCTP utilizando diferentes enlazadores y entidades funcionales. Otras polimerasas tales como Taq, M-MLV y VIH también han sido probadas con resultados positivos.

Ejemplo 65: Incorporación de polimerasas hidrólisis de derivados de nucleótidos que contienen a enlazadores separables de ésteres

**[0600]** Un cebador de extensión (5'-GCT ACT GGC ATC GGT-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1)) fue etiquetada con 5' con <sup>32</sup>P utilizando la quinasa de polinucleótidos T4 usando el protocolo estándar (Promega, cat# 4103). Este cebador de extensión fue recosido con un cebador tipo plantilla (5'-TAA GAC CGA TGC CAG TAG C-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 7)) utilizando 0.1 y 3 pmol respectivamente en un amortiguador de extensión (20 mM de Hepes, 40 mM de KCl, 8 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4, 10 mM de DTT) al calentarse a 80 °C durante 2 minutos y luego enfriarse lentamente a alrededor de 20 °C. El nucleótido de tipo silvestre o los derivados de nucleótidos fueron agregados entonces (100 μM) e incorporados utilizando 5 unidades de transcriptasa reversa de AMV (Promega, parte# 9PIM510) a 30 °C durante una hora. Muestras hidrolizadas fueron tratadas con 0.1 M de NaOH a 50 °C durante 15 minutos y luego tituladas con HCl y NaOAc (pH 6.5) equimolar y purificadas por medio de filtración de gel de micro centrifugación (BioRad). Las muestras fueron mezcladas con un colorante de formamida y expuestas a una electroforesis de gel con un 10% de poli(acrilamida de urea). El gel fue desarrollado utilizando auto radiografía (Kodak, BioMax film). La incorporación puede ser identificada por medio de los cambios de movilidad diferentes para los derivados de nucleótidos en comparación con el nucleótido de tipo silvestre. La figura 50 muestra la incorporación de varios derivados de nucleótidos. La línea 1, el compuesto III y el compuesto II; la línea 2, el compuesto III y 2 compuestos II; la línea 3, la hidrólisis del compuesto III y del compuesto II; la línea 4, la hidrólisis del compuesto III y 2 compuestos II. Los resultados muestran que estos derivados de nucleótidos pueden ser incorporados por medio de las polimerasas en este orden específico. También muestra que uno o ambos de los derivados de nucleótidos de los compuestos II incorporados con un enlazador de ésteres pueden ser hidrolizados específicamente en la plantilla de ADN y el derivado de nucleótidos del compuesto III incorporado sin ningún enlazador de ésteres está intacto. Esto ilustra la posibilidad de incorporar a diferentes derivados de nucleótidos en los casos en los cuales un derivado de nucleótido puede funcionar como el punto de adherencia (enlazadores no separables) y al mismo tiempo liberar (enlazador separable) otros derivados de nucleótidos incorporados de la plantilla de ADN para crear una molécula de muestra. Adicionalmente, esta información experimental muestra que los derivados de nucleótidos con enlazadores que contienen a ésteres separables pueden ser insertados por la polimerasa sin ninguna reacción con aminas en el lugar activo de la polimerasa o hidrolizarse durante el proceso de incorporación.

Ejemplo 66: Incorporación de polimerasas y enlace transversal de derivados de nucleótidos

**[0601]** Un cebador de extensión (5'-GCT ACT GGC ATC GGT-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1)) fue marcada 5' con <sup>32</sup>P utilizando quinasa de polinucleótidos T4 utilizando el protocolo estándar (Promega, cat# 4103). Este cebador de extensión fue recosido con un cebador tipo plantilla (5'-TAG ACC GAT GCC AGT AGC (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 8)) utilizando 0.1 y 3 pmol respectivamente en el amortiguador de extensión (20 mM de Hepes, 40 mM de KCl, 8 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4, 10 mM de DTT) al calentarse a 80 °C durante 2 minutos y luego enfriarse lentamente a alrededor de 20 °C. Los derivados de nucleótidos fueron agregados entonces (alrededor de 100 μM) e incorporados utilizando 5 unidades de transcriptasa reversa de AMV (Promega, parte# 9PIM510) a 30 °C durante una hora. Los oligonucleótidos fueron purificados entonces utilizando filtración de gel de micro centrifugación (BioRad). El enlace transversal fue realizado utilizando 10 mM de BS3 [Bis(sulfonilsuccinimida)suberato] (Pierce, cat# 21580) durante alrededor de una hora a 30 °C. Las muestras fueron mezcladas entonces con un colorante de formamida y ejecutadas en una electroforesis en gel con un 10% de poli(acrilamida de urea). El gel fue desarrollado utilizando auto radiografía (Kodak, BioMax film). La figura 51A y 51B muestra la incorporación de varios enlaces trasversales (CL - cross-linking) de varios derivados de nucleótidos. La figura 51A: línea 1, el compuesto III y el compuesto II; la línea 2, el compuesto III y el compuesto II enlazados transversalmente. Figura 51B: la línea 1, el compuesto III y el compuesto I; la línea 2, el compuesto III y el compuesto I enlazados transversalmente. Los resultados muestran que estos derivados de nucleótidos pueden ser incorporados por la polimerasa en este orden específico. También muestra que el compuesto III, el compuesto II y el compuesto I son modificados por el reactivo de enlace transversal BS3 (cambio de la movilidad) y por lo tanto

permite un enlace transversal (CL - cross-linking) entre los grupos reactivos en los derivados de nucleótidos del compuesto III-compuesto II y el compuesto III-compuesto I mediados por la plantilla de ADN. En una forma importante, los grupos de amidas de los derivados de nucleótidos en la ranura mayor son accesibles selectivamente para modificaciones que promueven los enlaces trasversales entre diferentes derivados de nucleótidos incorporados en la plantilla del ADN.

#### **Ejemplo 67: Incorporación de polimerasas de varios derivados de nucleótidos**

[0602] Un cebador de extensión (5'-TCC GCT ACT GGC ATC GGT-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:9)) fue marcado 5' con <sup>32</sup>P utilizando quinasas de polinucleótidos T4 usando el protocolo estándar (Promega, cat# 4103). Este cebador de extensión fue recosido con un cebador tipo plantilla (5'-TGA ACC GAT GCC AGT AGC-5' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:10)) utilizando 0.1 y 3 pmol respectivamente en el amortiguador de extensión (20 mM de Hepes, 40 de mM KCl, 8 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4, 10 mM de DTT) al calentarse a 80 °C durante 2 minutos y enfriarse entonces lentamente a alrededor de 20 °C. Este cebador tipo plantilla fue etiquetado 3'Biotina-C6 para evitar una extensión. Los derivados de nucleótidos fueron agregados entonces (alrededor de 100 μM) e incorporados utilizando 5 unidades de transcriptasa reversa de AMV (Promega, parte# 9PIM510) a 30 °C durante una hora. Las muestras fueron mezcladas con un colorante de formamida y ejecutadas en una electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea. El gel fue desarrollado utilizando auto radiografía (Kodak, BioMax film). La figura 52 muestra la incorporación de varios derivados de nucleótidos. La línea 1, dTTP, dCTP y dATP de tipo silvestre; la línea 2, el COMPUESTO XI; la línea 3 EL COMPUESTO XI y el compuesto III; la línea 4, el COMPUESTO XI, el compuesto III y dATP; la línea 5, EL COMPUESTO XI, el compuesto III y el compuesto XIII. Los resultados muestran que es posible incorporar a por lo menos 3 derivados de nucleótidos diferentes después de otro utilizando una polimerasa. Consecuentemente, la polimerasa permite a varios derivados de nucleótidos simultáneamente en el lugar activo sin una reducción significativa de la actividad catalítica.

#### Ejemplo 68: Incorporación de polimerasas de varios derivados de nucleótidos

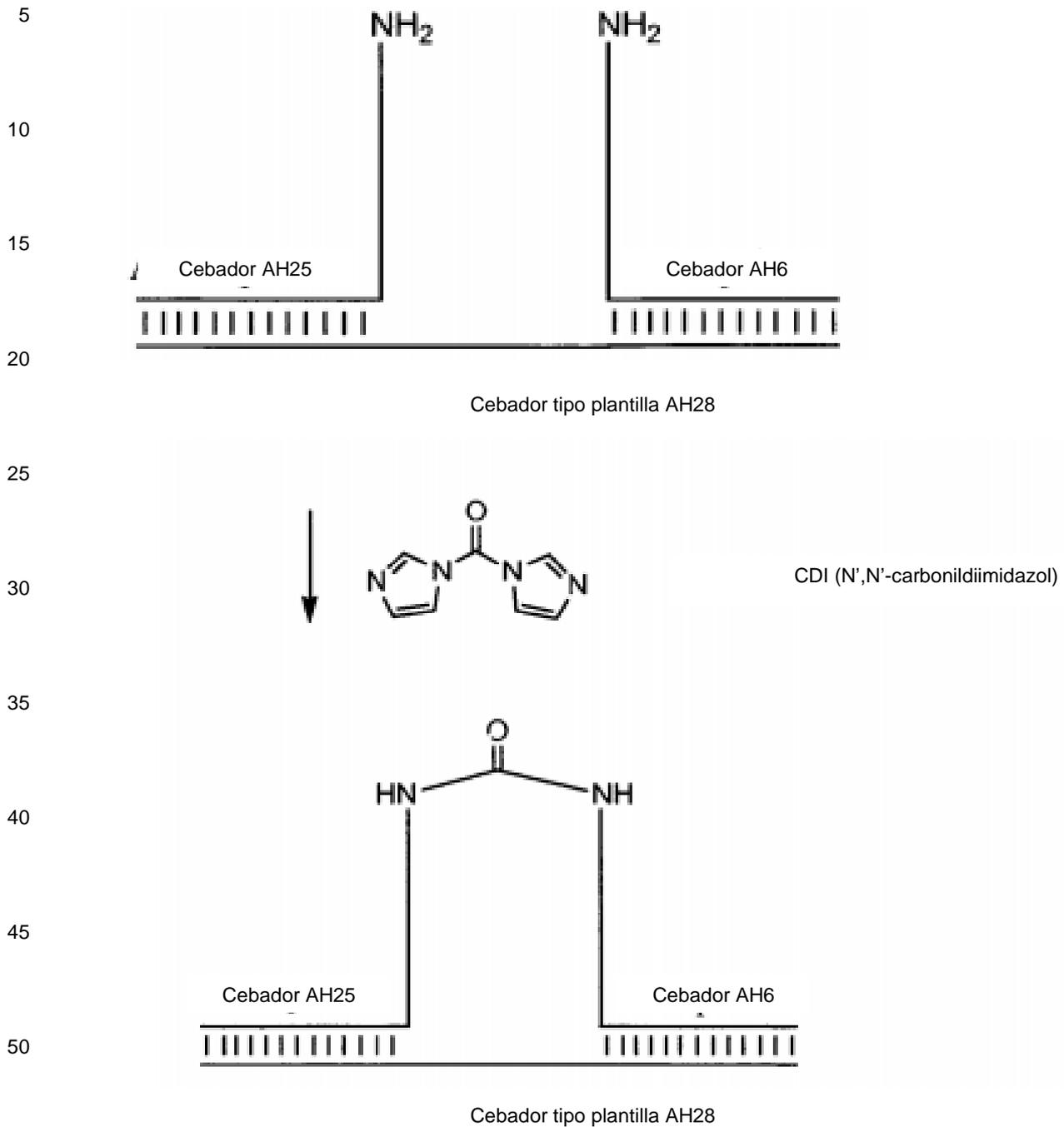
[0603] Un cebador de extensión (5'-TCC GCT ACT GGC ATC GGT-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:9)) fue marcado 5' con <sup>32</sup>P utilizando quinasas de polinucleótidos T4 utilizando el protocolo estándar (Promega, cat# 4103). Este cebador de extensión fue recosido con un cebador tipo plantilla (5'-TGA ACC GAT GCC AGT AGC-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:10)) utilizando 0.1 y 3 pmol respectivamente en el amortiguador de extensión (20 mM de Hepes, 40 mM de KCl, 8 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4, 10 mM de DTT) al calentarse a 80 °C durante 2 minutos y luego enfriarse lentamente a alrededor de 20 °C. Este cebador tipo plantilla fue etiquetado 3'Biotina-C6 para evitar su extensión. Los derivados de nucleótidos fueron agregados entonces (alrededor de 100 μM) e incorporados utilizando 5 unidades de transcriptasas reversas de AMV (Promega, parte# 9PIM510) a 30 °C durante una hora. Las muestras fueron mezcladas con un colorante de formamida y ejecutadas en una electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea. El gel fue desarrollado utilizando auto radiografía (Kodak, BioMax film). La figura 53 muestra la incorporación de varios derivados de nucleótidos comparados a los nucleótidos de tipo silvestre. Línea 1, dCTP, dTTP y dATP de tipo silvestre; línea 2, el compuesto II, el compuesto III y el compuesto XIII. Los resultados muestran que es posible incorporar a por lo menos 3 derivados diferentes de nucleótidos sucesivamente utilizando una polimerasa. Consecuentemente, la polimerasa permite a varios derivados de nucleótidos simultáneamente en el lugar activo sin una reducción significativa de la actividad catalítica.

#### **Ejemplo 69 al 74: Preparación de polimerasas mediada por moléculas modeladas**

#### Ejemplo 69: Enlace transversal de grupos aminos codificados por medio de la formación de enlaces de ureas

[0604] Un cebador (5'-TCC GCT ACT GGT ATC GGX-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:11)) donde X denota a deoxi-timidina-C6-NH<sub>2</sub>, (Glen research, cat #10-1039-90) fue marcado 5' con <sup>32</sup>P utilizando quinasas de polinucleótidos utilizando el protocolo estándar (Promega, cat# 4103) y purificándose por medio de filtración de gel de micro centrifugación. El cebador (0.1 pmol) y 2pmol de un 2º cebador (5'XCA CTT GCA GAC AGC-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:12)) fueron recosidos en conjunto con 1 pmol del cebador tipo plantilla (5'-GCT GTC TGC AAG TGA CCG ATG CCA GTA GC-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:13)) en un amortiguador de hibridación (20 mM de Hepes, 200 mM de NaCl, pH 7.5) al calentarse a 80 °C durante 2 minutos y luego enfriarse lentamente a alrededor de 20 °C. Subsiguientemente, 10 mM de N',N'- CarbonilDiimidazol (SigmaAldrich) se agregaron y las muestras se incubaron a 30 °C durante 2 horas. Las muestras fueron mezcladas con colorante de formamida y ejecutadas en una electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea. El gel fue desarrollado utilizando auto radiografía (Kodak, BioMax film). Una descripción esquemática de este experimento se muestra a continuación.

**Enlaces transversales por medio de la formación de enlaces de ureas**



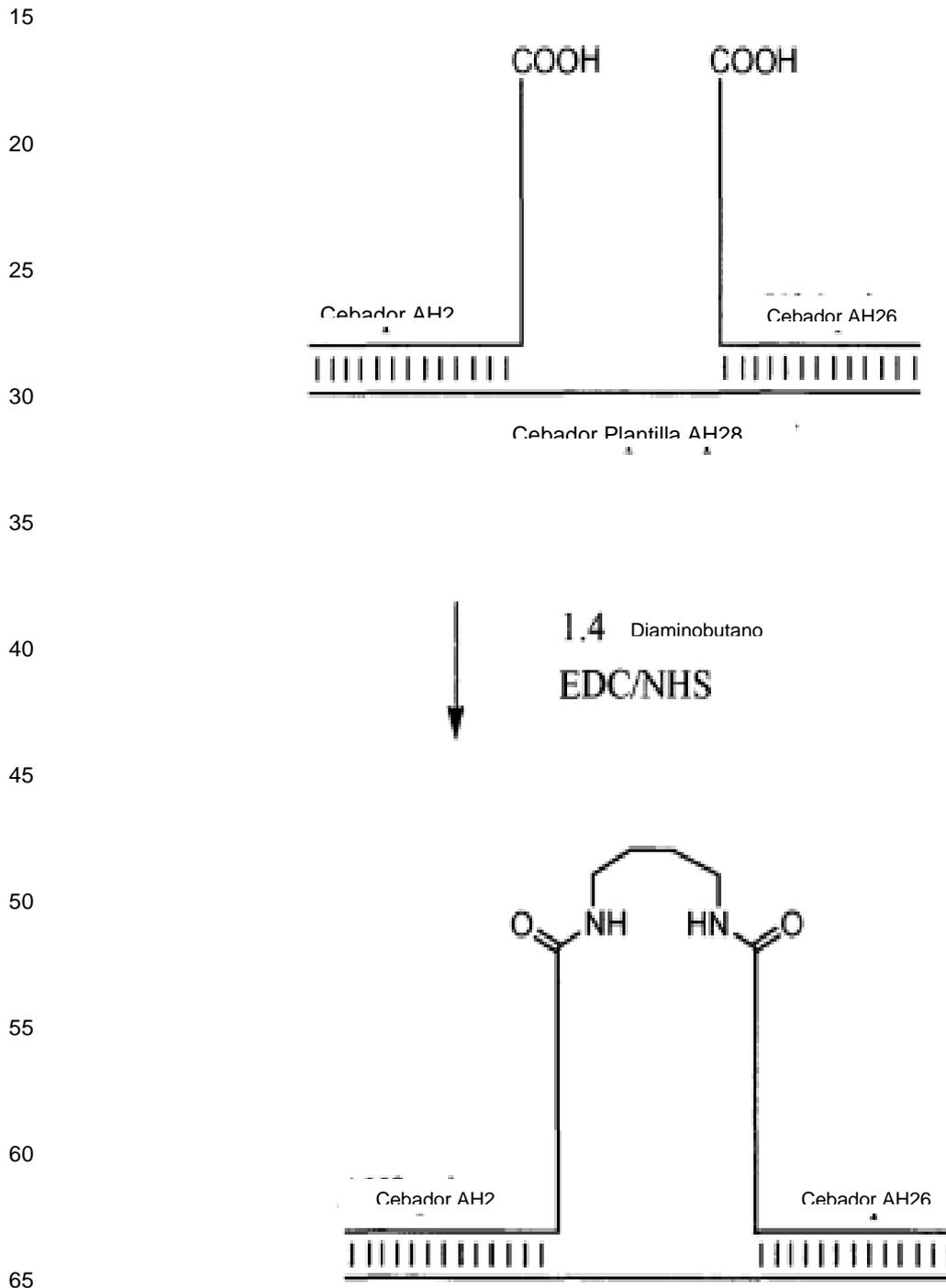
55 **[0605]** Los resultados muestran que los grupos NH<sub>2</sub> adyacentes pueden formar un enlace covalente de urea por medio de la reacción con CDI. No se observaron reacciones en la ausencia de una secuencia tipo plantilla lo que muestra que la reacción depende de la proximidad cercana de los grupos NH<sub>2</sub> guiadas por la secuencia plantilla. La formación de enlaces de ureas también fue observada cuando el 0.5 por ciento de formaldehído fue utilizado como un reactivo de enlace transversal (no se muestran los datos).

60 Ejemplo 70: Formación de enlaces de amidas por medio de una reacción de "relleno" utilizando un enlazador di-amino.

65 **[0606]** En este experimento los ácidos carboxílicos codificados por ADN son enlazados transversalmente por un 1,4 diaminobutano. Un cebador (5'-TCC GCT ACT GGT ATC GGY-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:14)) donde Y denota a deoxi-timidina-C2-COOH (Glen research, cat #10-1035-90), fue marcado como 5' con <sup>32</sup>P

5 utilizando quinasas de polinucleótidos T4 usando el protocolo estándar (Promega, cat# 4103) y purificado por medio de filtración de geles de micro centrifugación. El cebador (0.1 pmol) y 2 pmol del 2º cebador (5'YCA CTT GCA GAC AGC- 3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:15)) fueron recogidos conjuntamente con 1 pmol del cebador plantilla (5'-GCT GTC TGC AAG TGA CCG ATG CCA GTA GC-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:13)) en un amortiguador de hibridación (20 mM de Hepes, 200 mM de NaCl, pH 7.5) al calentarse a 80 °C durante 2 minutos y luego enfriarse lentamente a alrededor de 20 °C. Subsiguientemente, 100 mM de EDC (Sigma-Aldrich), 10 mM de N-hidroxisuccinimida (NHS, Sigma-Aldrich) y 10 mM de 1,4 diaminobutano (Merck) fueron agregados y las muestras fueron incubadas a 30 °C durante 2 horas. Las muestras fueron mezcladas con un colorante de formamida y ejecutadas en una electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea. El gel fue desarrollado utilizando auto radiografía (Kodak, BioMax film). Una descripción esquemática de este experimento se muestra continuación:

**Enlaces transversales por medio de una reacción de "relleno"**



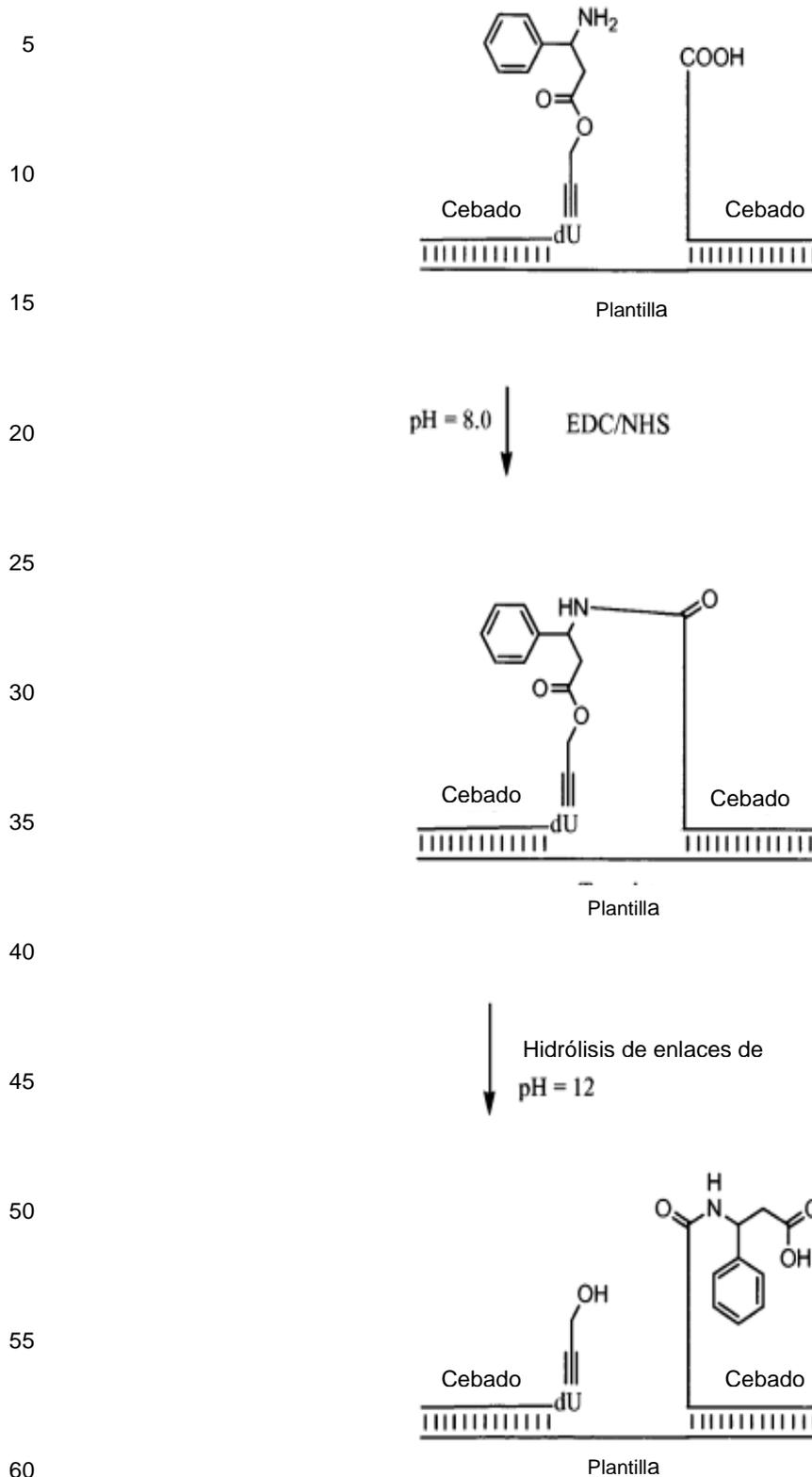
Cebador plantilla AH28

**[0607]** Los resultados muestran que los grupos COOH codificados pueden ser acoplados covalentemente por un enlazador bifuncional en el momento de la formación de los enlaces de amidas. No se observó ninguna reacción en la ausencia de una secuencia plantilla lo que muestra que la reacción es regida por la proximidad de los grupos COOH suministrados por la secuencia plantilla. Resultados similares fueron obtenidos utilizando otros enlazadores diaminos tales como el 1.6 diaminohexano, la esperimina y la espermidina (no se muestran los datos).

Ejemplo 71: Incorporación de polimerasas de derivados de nucleótidos y enlaces transversales a puntos de anclaje modelados.

**[0608]** Un cebador de extensión (5'-GCT ACT GGC ATC GGT-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:1)) fue marcado 5' con <sup>32</sup>P utilizando quinasas de polinucleótidos T4 usando el protocolo estándar (Promega, cat# 4103). Este cebador de extensión fue recosido con un cebador plantilla (5'-GCT GTC TGC AAG TGA TAA CCG ATG CCA GTA GC-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:3)) utilizando 0.1 y 3 pmol respectivamente en el amortiguador de extensión (20 mM de Hepes, 40 mM de KCl, 8 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4, 10 mM de DTT) al calentarse a 80 °C durante 2 minutos y luego enfriarse lentamente a alrededor de 20 °C. Los derivados de nucleótidos fueron agregados entonces (alrededor de 100 μM) e incorporados utilizando 5 unidades de transcriptasa reversa de AMV (Promega, parte# 9PIM510) a 30 °C durante una hora. Los complejos de oligonucleótidos fueron purificados entonces utilizando una filtración de gel de micro centrifugación (BioRad). Un 2° enlazador (5-YCA CTT GCA GAC AGC-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:15)) donde Y denota el grupo reactivo deoxitimidina-C2-COOH en el punto de anclaje, fue recosido al complejo de extensión. La composición de amortiguación fue ajustada 20 mM de HEPES-KOH, 200 mM de NaCl, pH=7,5. Los enlaces transversales fueron realizados utilizando 100 mM de EDC y 10 mM de N-hidroxisuccinimida durante alrededor de 2 horas a 30 °C. Muestras relevantes fueron sujetas a hidrólisis alcalina (0.1 M de NaOH, 50 °C durante 15 minutos). Las muestras fueron mezcladas con colorante de formamida y ejecutadas en un gel desnaturalizante con un 10% de poliacrilamida de urea. Este gel fue desarrollado usando auto radiografía (Kodak, BioMax film). Se muestra un bosquejo esquemático de este experimento a continuación:

**Enlaces por medio de acoplamiento directo y translocación de un  $\beta$ - aminoácido**



[0609] Los resultados muestran que un grupo reactivo de un derivado de nucleótido incorporado por medio de una polimerasa puede ser enlazado transversalmente a un grupo reactivo que es un punto de anclaje por medio de una reacción de "relleno" que forma enlaces de amidas. Además, el enlazador de ésteres del derivado de nucleótidos es separado específicamente lo que permite la transferencia de una entidad funcional modelada a una 2ª entidad

modelada (punto de anclaje).

Ejemplo 72: Incorporación de polimerasas de derivados de nucleótidos y enlaces transversales a un punto de anclaje modelado por medio de una reacción de "relleno".

5 **[0610]** Un cebador de extensión (5'-GCT ACT GGC ATC GGT-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:1))  
 fue marcada 5' con <sup>32</sup>P utilizando quinasas de polinucleótidos T4 usando el protocolo estándar (Promega, cat#  
 4103). Este cebador de extensión fue recocido con un cebador plantilla (5'-GCT GTC TGC AAG TGA TAA CCG ATG  
 10 CCA GTA GC-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:3)) utilizando 0.1 y 3 pmol respectivamente en el  
 amortiguador de extensión (20 mM de Hepes, 40 mM de KCl, 8 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4, 10 mM de DTT) al calentarse  
 a 80 °C durante 2 minutos y luego enfriarse lentamente a alrededor de 20 °C. El compuesto II (derivado de  
 nucleótido) fue agregado entonces (alrededor de 100 μM) e incorporados utilizando 5 unidades de transcriptasas  
 15 purificadas entonces utilizando filtración de gel de micro centrifugado (BioRad). Un 2º cebador (5-XCA CTT GCA  
 GAC AGC-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:12)), donde X denota al grupo reactivo deoxitimidina-C6-  
 NH<sub>2</sub> del punto de anclaje, fue recosido al complejo de extensión. Se realizaron enlaces utilizando 10 mM de BS3  
 [Bis(sulfonilsuccinimida)suberato] (Pierce, cat# 21580) durante alrededor de 2 horas a 30 °C. Muestras relevantes  
 20 fueron sujetas a hidrólisis alcalina (0.1 M de NaOH, 50 °C durante 15 minutos). Las muestras fueron mezcladas con  
 un colorante de formamida y ejecutadas en un gel de desnaturalización con un 10% de poliacrilamida de urea. El gel  
 fue desarrollado utilizando auto radiografía (Kodak, BioMax film). Un bosquejo esquemático de este experimento se  
 muestra a continuación:

25

30

35

40

45

50

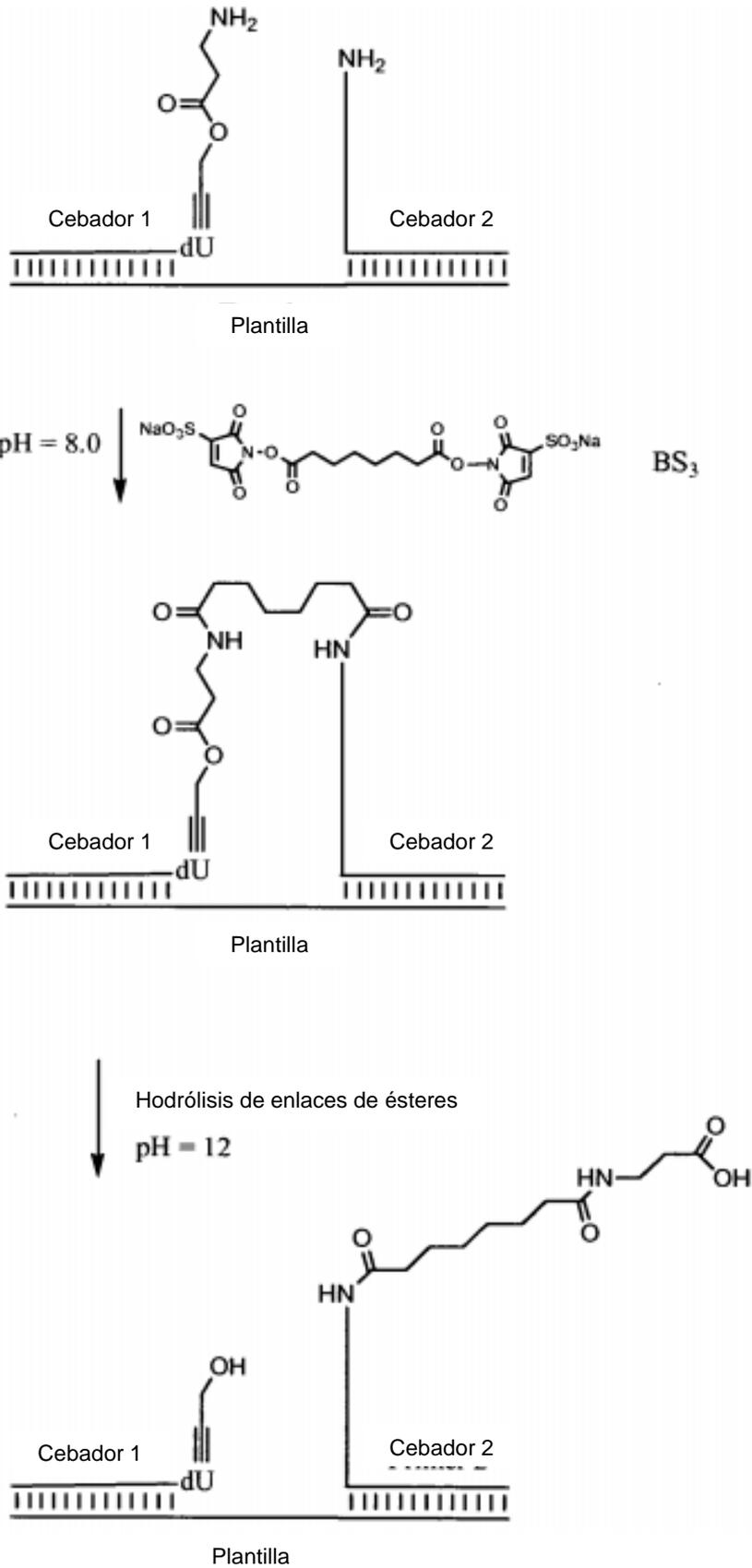
55

60

65

Enlaces por medio de "relleno" y translocación de  $\beta$ - aminoácidos

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65



5 [0611] Una copia del gel se muestra la figura 54. Línea uno: sin nucleótidos, línea 2: dTTP, línea 3: el compuesto I, línea 4: dTTP seguido por hidrólisis alcalina, línea 5: compuesto I seguido por hidrólisis alcalina, línea 6: dTTP seguido por enlaces transversales de BS3, línea 7: el compuesto I seguido por enlaces transversales de BS3, línea 8: dTTP seguido por enlaces transversales de BS3 hidrólisis alcalina, y la línea 9: el compuesto I seguido por enlaces transversales de BS3 e hidrólisis alcalina. Los resultados muestran que un grupo reactivo de un derivado de nucleótidos incorporado por una polimerasa puede estar enlazado transversalmente a un grupo reactivo con un punto de anclaje por medio de una reacción de "relleno" que forma enlaces de amidas. Además, el enlazador de ésteres del derivado de nucleótidos es separado específicamente lo que permite la transferencia de una entidad funcional modelada a una 2ª entidad modelada (punto de anclaje).

10 Ejemplo 73: Incorporación de polimerasas de 2 derivados de nucleótidos y los enlaces transversales entre 3 entidades codificadas.

15 [0612] Un cebador de extensión (5'-GCT ACT GGC ATC GGT-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:16)) fue marcada 5' utilizando quinasas de polinucleótidos T4 usando el protocolo estándar (Promega, cat# 4103). Este cebador de extensión fue recosido con un cebador plantilla (5'-GCT GTC TGC AAG TGA GTA CCG ATG CCA GTA GC-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:17)) utilizando 0.1 y 3 pmol respectivamente en el amortiguador de extensión (20 mM de Hepes, 40 mM de KCl, 8 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4, 10 mM de DTT) al calentarse a 80 °C durante 2 minutos y luego enfriarse lentamente a alrededor de 20 °C. Los derivados de nucleótidos V y X fueron agregados entonces (alrededor de 100 μM) e incorporados utilizando 5 unidades de transcriptasas reversas de AMV (Promega, parte# 9PIM510) a 30 °C durante una hora. Los complejos de oligonucleótidos fueron purificados entonces utilizando filtración de gel de micro centrifugación (BioRad). Un 2º cebador (5-YCA CTT GCA GAC AGC-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:15)) donde Y denota al grupo reactivo deoxitimidina-C2-COOH del punto de anclaje, fue recosido al complejo de extensión. La composición de amortiguamiento fue ajustada a 20 mM de HEPES-KOH, 200 mM de NaCl, pH = 7.5 antes de la adición de 100 mM de EDC y 10 mM de N-hidroxisuccinimida. Estos resultados en los enlaces transversales de los grupos NH<sub>2</sub> de MG91 y el grupo COOH de V y el COOH del 2º cebador. Muestras adecuadas fueron sujetas a hidrólisis alcalina (0.1 M de NaOH, 50 °C, 15 minutos). Un colorante de formamida fue agregado a las muestras antes de cargarse en un gel con un 10% de poliacrilamida de urea. El gel fue desarrollado utilizando auto radiografía (Kodak, BioMax film). Una representación esquemática de este experimento se muestra a continuación:

35

40

45

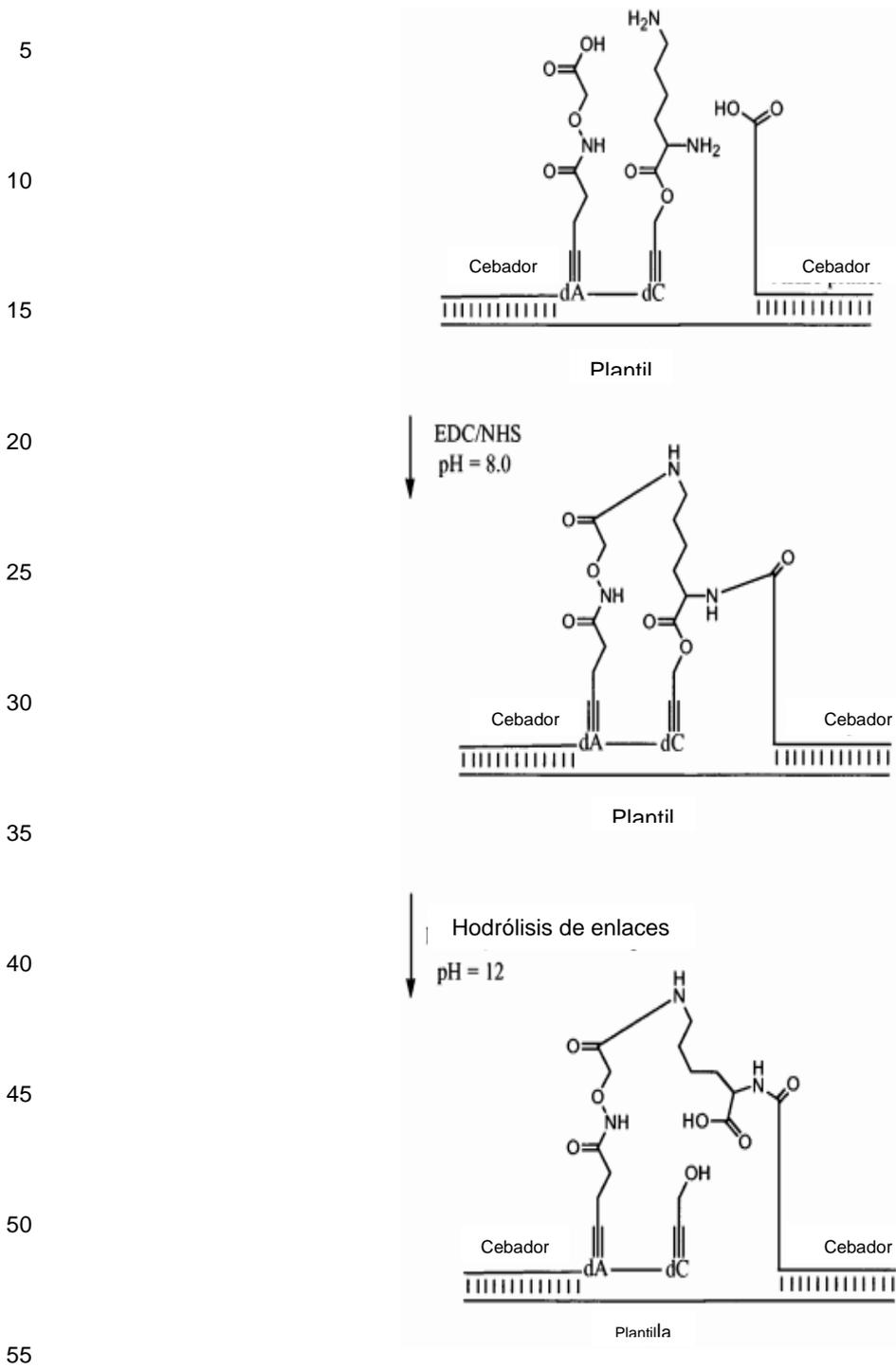
50

55

60

65

**Enlaces de 3 entidades funcionales codificadas**



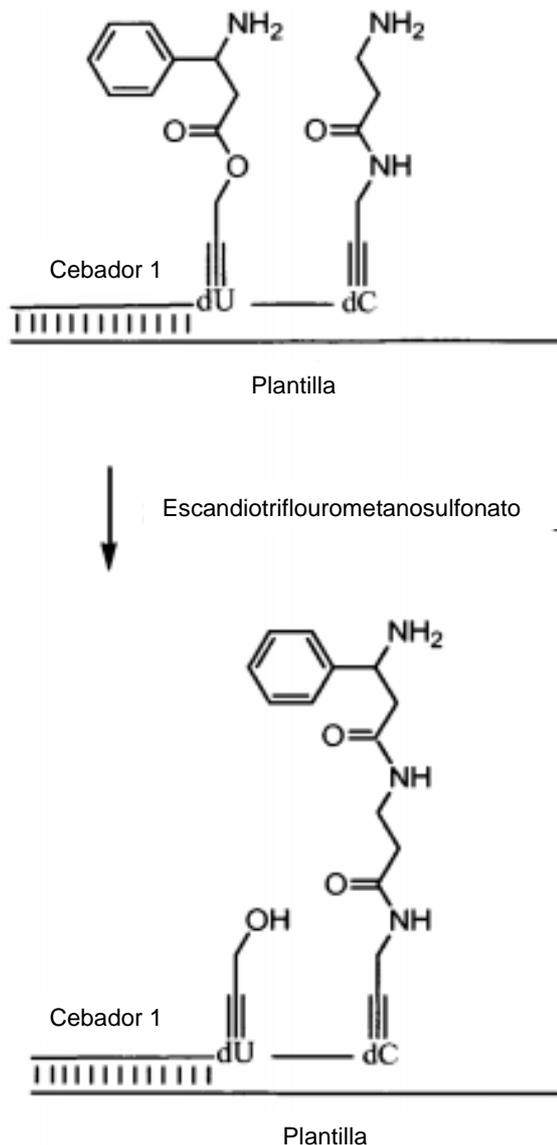
[0613] Este resultado muestra que 3 entidades funcionales codificadas pueden ser enlazadas transversalmente. Además, un enlazador específico puede ser separado selectivamente.

60 Ejemplo 74: Incorporación de polimerasas en la translocación (“compresión”) de β-aminoácidos.

[0614] Un cebador de extensión (5'-GCT ACT GGC ATC GGT-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:16)) fue marcado 5' con <sup>32</sup>P utilizando quinasas de polinucleótidos de T4 utilizando el protocolo estándar (Promega, cat# 4103). Este cebador de extensión fue recosido con un cebador plantilla (5'-TAG ACC GAT GCC AGT AGC (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:8)) usando 0.1 y 3 pmol respectivamente en el amortiguador de extensión (20 mM Hepes, 40 mM KCl, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4, 10 mM DTT) al calentarse a 80 °C durante 2 minutos y

luego enfriarse lentamente a alrededor de 20 °C. Los derivados de nucleótidos II y III fueron agregados entonces (alrededor de 100 μM) e incorporados utilizando 5 unidades de transcriptasas reversas de AMV (Promega, parte# 9PIM510) a 30 °C durante una hora. Los oligonucleótidos fueron purificados entonces utilizando filtración de gel de micro centrifugación (BioRad) seguido por una liofilización. El complejo de oligonucleótidos fue disuelto en piridina y se agregó Escan-diotriflourometanosulfonato (catalizador) en piridina a una concentración final de 10 mM y la mezcla de la reacción fue incubada a 50 °C durante una hora. Muestras relevantes fueron sujetas a hidrólisis alcalina utilizando 0.1 M de NaOH a 50 °C durante 15 minutos. El colorante de formamida fue agregado a las muestras antes de cargarse en un gel con un 10% de poliacrilamida de urea. El gel fue desarrollado utilizando auto radiografía (Kodak, BioMax film). Una representación esquemática se muestra a continuación:

**Compresión y translocación de un β-aminoácido**



**[0615]** Los resultados muestran que un grupo reactivo de una entidad funcional puede reaccionar con un grupo reactivo de otra entidad funcional formando un enlace de amidas. La reacción resulta en una translocación de una entidad funcional a una 2ª entidad funcional con una separación simultánea del enlazador que conecta a la primera entidad funcional y al derivado de nucleótidos que codifican a dicha entidad funcional. En esta configuración experimental un di-péptido que comprende a 2 β- aminoácidos es producido. Por lo tanto, la incorporación de una plantilla de ADN de varios (3 o más) derivados de nucleótidos que comprende a β-aminoácidos en forma de entidades funcionales permitiría varios eventos de translocación que producen a ácidos de β-péptidos que comprenden a 3 o más β-aminoácidos. En este ejemplo, la reacción entre los grupos reactivos de entidades funcionales ocurre en un entorno no acuoso. En un aspecto preferido, la reacción entre los grupos reactivos de entidades funcionales ocurre directamente en el momento de la incorporación de un derivado de nucleótidos que comprende a dicha entidad funcional por medio de una reacción de "compresión". Esto puede lograrse al incrementar la reactividad de los enlaces de ésteres al introducir a varias entidades químicas tales como los

tioésteres, ésteres fenólicos, ésteres tiofenólicos, ésteres fenólicos o tiofenólicos o ésteres de N-hidroxisuccinimidas di-, tri-, o tetra-fluoro activados.

Ejemplo 75: Descripción estructural del experimento A en sílice de una molécula presentada en una plantilla creada utilizando la incorporación de polimerasas de derivados de nucleótidos.

**[0616]** Un aspecto de este invento utiliza una polimerasa adecuada para una incorporación específica de derivados de nucleótidos en una plantilla de ADN. Esta incorporación se logra utilizando una plantilla que contiene elementos codificadores. La plantilla es utilizada por la polimerasa para incorporar a los derivados de nucleótidos en un orden específico basándose en estos elementos codificadores (figura 55). Este proceso es específico debido a los grupos de reconocimiento en los derivados de nucleótidos.

**[0617]** Los diferentes nucleótidos son modificados en posiciones específicas (por ejemplo, la figura 9) para permitir la incorporación de las polimerasas y al mismo tiempo exponer a las entidades funcionales enlazadas en o fuera de la ranura principal de la hebra de ADN expuesta al solvente tal como se muestra en la figura 55A. La incorporación consecutiva de los derivados de nucleótidos por la polimerasa permitirá que surjan varias reacciones entre las entidades funcionales enlazadas. Las reacciones son determinadas por el tipo de grupos reactivos integrados en cada entidad funcional (ejemplos mostrados en las figuras 11-21). Adicionalmente, la plantilla de ADN organizará a las entidades funcionales en una geometría específica que depende de la estructura helicoidal de la plantilla de ADN. Esta geometría puede, por ejemplo, ser controlada por diferentes tipos de enlazadores que unen a la entidad funcional y al elemento complementario. Por lo tanto, el enlazador es diseñado para preferir la reacción entre los grupos reactivos en derivados de nucleótidos. El diseño del enlazador será diferente dependiendo en qué tipo y como los grupos reactivos están organizados en las entidades funcionales. El enlazador también puede ser diseñado para guiar la reacción entre los grupos reactivos en una dirección específica. Varios grupos reactivos también pueden ser utilizados para dirigir la reacción entre los grupos reactivos. La proximidad cercana y geometría optimizada de los derivados de nucleótidos mejorará drásticamente a la tasa de reacción entre los grupos reactivos y las diferentes entidades funcionales. La tasa de reacción entre los grupos reactivos es rápida debido a la alta concentración local de los derivados de nucleótidos incorporados en la molécula de la plantilla de ADN en comparación a lo que resultaría si se les permitiera esparcirse libremente en la solución.

**[0618]** La figura 55A muestra un ejemplo en el cual los derivados de nucleótidos, el compuesto II, el compuesto X y el compuesto V, son incorporados por una polimerasa después de haberse incorporado entre sí en la misma plantilla de ADN. La síntesis de estos derivados de nucleótidos fue descrita en detalle anteriormente. Los datos experimentales que muestran a la incorporación de transcriptasas reversas de AMV de estos derivados de nucleótidos pueden verse en el ejemplo 64. Estos derivados de nucleótidos incorporados son organizados estructuralmente, por el enlazador que conecta al elemento complementario y a la entidad funcional, para promover la reacción entre los grupos reactivos en cada uno de los derivados de nucleótidos. La distancia entre la amina en el compuesto II y la amina del COMPUESTO X en la cadena de lado largo se calcula que es entre 3.1 Å y 17.5 Å y la distancia entre la amina en el compuesto II y la amina en el COMPUESTO X en la cadena lateral corta se calcula que es entre 3.0 Å y 14.6 Å dependiendo de la orientación precisa del enlazador y de la entidad funcional en la plantilla de ADN. La distancia entre el carbono carbonilo en el derivado de nucleótidos, el compuesto V, y amina que tiene una cadena lateral larga en el derivado de nucleótido, COMPUESTO X, es entre 4.2 Å y 19.8 Å y la distancia a la amina del COMPUESTO X de la cadena lateral corta se calcula que está entre 3.7 Å y 16.5 Å lo cual también depende de la orientación precisa. La proximidad cercana de los derivados de nucleótidos, el compuesto II, EL COMPUESTO X y 1973 en la plantilla de ADN promoverá un enlace químico de los grupos reactivos en estos derivados de nucleótidos.

**[0619]** Estos 3 derivados de nucleótidos pueden ser enlazados entre sí a través de sus grupos reactivos utilizando varios reactivos químicos. Un reactivo posible que puede usarse es el [Bis(sulfonilsuccinimida)suberato] (Pierce, cat# 21580). Comúnmente una concentración de alrededor de 0.25-10 mM es utilizada para este análogo. Este reactivo enlazará transversalmente a 2 aminas entre los derivados de nucleótidos, el compuesto II y el COMPUESTO X. Este reactivo en particular insertará un separador de 8 carbonos entre los grupos reactivos y es capaz de conectar a una distancia de 11.2 Å en una configuración extendida. Por lo tanto, el enlazador de BS3 es capaz de enlazar las aminas del compuesto II y cualquiera de las aminas del compuesto X. Existen otros reactivos que podrían ser utilizados (más largos o más cortos) para obtener casi cualquier tipo de separadores entre los grupos aminos reactivos. El ácido carboxílico en el compuesto V de derivados de nucleótidos y una de las aminas en el COMPUESTO X de derivados de nucleótidos pueden enlazarse juntas utilizando a, por ejemplo, carbodiimida de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropilo) (EDC) y N-Hidroxisuccinimida (NHS). Esta reacción hará una conexión directa entre los grupos reactivos en el COMPUESTO X y en el compuesto V de derivados de nucleótidos. Estas 2 reacciones resultan en una nueva molécula compuesta de estos derivados de nucleótidos los cuales están adheridos covalentemente entre sí a través de reactivos de acoplamiento (figura 55B). Esta molécula específica modelada por una plantilla de ADN es producida utilizando química de acoplamiento de relleno (BS3) y de acoplamiento directo (EDC/NHS) ejemplos de enlaces transversales entre derivados de nucleótidos incorporados son mostrados anteriormente. Otros tipos de métodos de acoplamiento que podrían ser utilizados son la compresión por medio de translocación o por medio de apertura anular. Estas estrategias de acoplamiento necesitan otros tipos de diseño de enlazadores tal como se describe en este invento.

5 [0620] En esta etapa, todas las entidades funcionales todavía están adheridas a la plantilla de ADN a través de un enlazador que junta a la entidad funcional y al elemento complementario. El elemento este integrado en el enlazador del compuesto II y del compuesto X de derivados de nucleótidos puede hidrolizarse específicamente (refiérase al ejemplo 65 para detalles experimentales) para liberar a las entidades funcionales de estos 2 derivados de nucleótidos de la plantilla de ADN. La reacción de hidrólisis resulta en una nueva molécula que está adherida solamente a la plantilla de ADN a través del enlazador de los derivados de nucleótidos del compuesto V (figura 55C). Esta molécula puede extenderse afuera de la plantilla de ADN hacia adentro de la solución y volverse accesible (presentada) para su interacción con otras moléculas en la solución.

10 [0621] Esta molécula modelada, como parte una biblioteca de muchas moléculas modeladas diferentes, puede ser usada finalmente en un procedimiento de selección para identificar a moléculas que enlazan a varios objetivos. Una descripción detallada del procedimiento de selección puede encontrarse en otras secciones de este documento.

#### 15 Ejemplo (modelo) 76: Síntesis de PNA-base enlazada

20 [0622] Polímeros de PNA son enlazados a elementos complementarios por medio de partículas separables de bencil- o benciloxicarbonilo enlazadas a la parte base de cada monómero de PNA. Un ácido carboxílico es utilizado como punto de anclaje para el complejo de oligonucleótidos. Cada bloque de construcción es recosido a una plantilla de oligonucleótidos (no se muestra)

#### 25 **Paso A: Polimerización**

30 [0623] A una solución amortiguada acuosa (10uL, 1M de NaCl, 100-500 mM de amortiguador pH 6-10, preferiblemente 7-9) de complejos de oligonucleótidos (0.1-100 uM, preferiblemente 0.5-10 uM) se le agrega un reactivo de acoplamiento de péptidos (0.1 mM - 100 mM, preferiblemente 1-10 mM) que se ejemplifica por, pero no se limitan a EDC, DCC, DIC, HATU, HBTU, PyBoP, PyBroP o tetrafluoroborato de *N*-metil-2-cloropiridinio y un modificador de acoplamiento de (0.1 mM-1 uM, preferiblemente 1-10 mM) ejemplificado por, pero sin limitarse a, NHS, sulfo-NHS, HOBt, HOAt, o DhbtOH en un solvente adecuado (1 µl), por ejemplo, agua, metanol, etanol, dimetildormamida, dimetilsulfóxido, etilenglicol, acetonitrilo o una mezcla de estos. Las reacciones se ejecutan a una temperatura entre -20 °C y 60 °C. Los tiempos de reacción están entre una hora y una semana, preferiblemente entre una hora-24 horas.

35 El procedimiento que se acaba de describir ejemplifica a la polimerización en una escala de 11 µl, pero cualquier otro volumen de reacción entre 1.1 µl y 1.1 l puede ser utilizado.

#### 40 **Paso B: Separación y desprotección del enlazador**

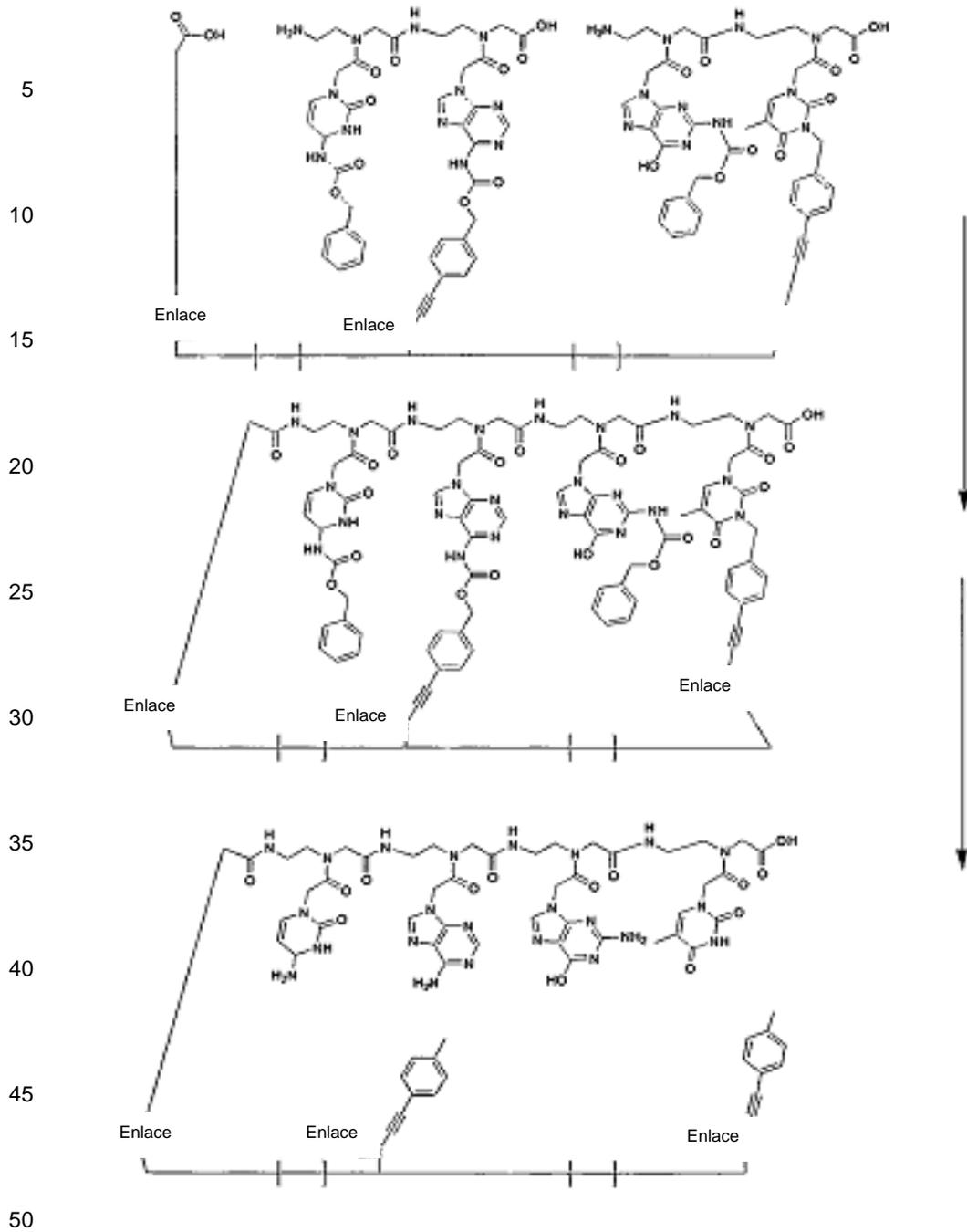
45 [0624] Los grupos protectores de Cbz- y Bencilos pueden ser removidos por medio de una variedad de métodos, [Greene;1999; ] debido a su moderación, la reducción catalítica a menudo es el método escogido. Combinar a un catalizador de hidrogenación insoluble, por ejemplo, Pd/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Pd/CaCO<sub>3</sub>, Pd/C, PtO<sub>2</sub>, o a unos solubles, por ejemplo, el catalizador de Wilkinsons y una fuente de hidrógeno ejemplificada, pero sin limitarse a H<sub>2</sub>, formiato de amonio, ácido fórmico, 1,4-ciclohexadieno, y ciclohexeno en un solvente adecuado como agua, metanol, etanol, dimetil-formamida, dimetilsulfóxido, etilenglicol, acetonitrilo, ácido acético o una mezcla de estos con los complejos de oligonucleótidos remueve a los grupos protectores de Cbz- y Bencilos.

50

55

60

65

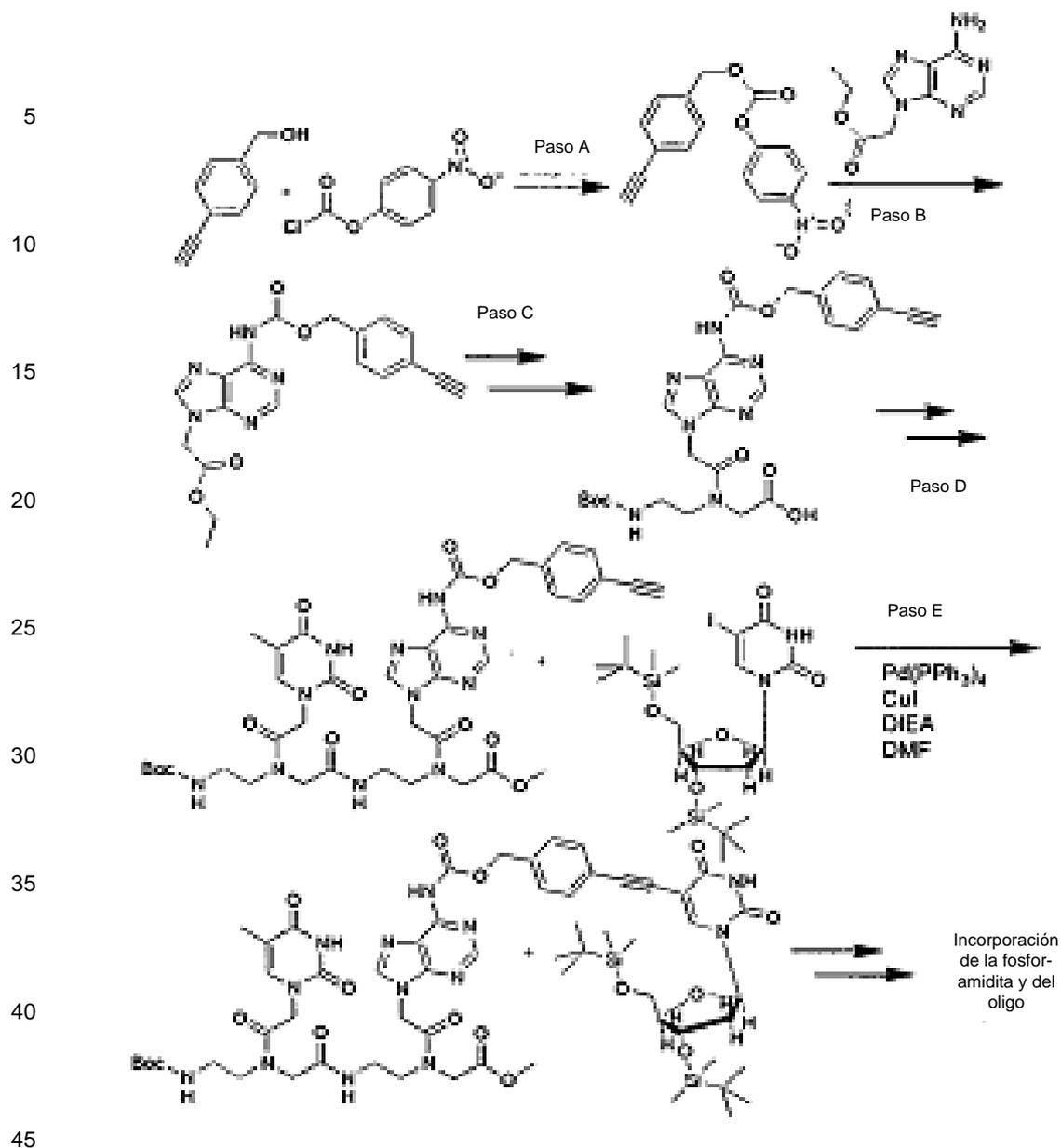


—|—|— Designa una secuencia de 10-20 nucleótidos. El enlace es un oligonucleótido (por ejemplo, un 40' mer) modificado en una terminal permitiendo la adherencia de una base de una unidad PNA.

55 Esquema para la síntesis de los bloques de construcción:

60

65

**Paso A, B:**

[0625] A una solución de DCM (20 ml) de 4-nitrofenolcloroformiato (5 mmol) enfriados en un baño de hielo/agua se le agrega (4-etinilfenil)metanol (5 mmol) disuelto en DCM (20 ml) en forma de gotas. Después de una hora, el baño de hielo es removido. La reacción es monitoreada por medio de TLC. Cuando se completa, el éster etílico de ácido (6-aminopurin-9-il)-acético (5 mmol) en piridina (20 ml) son agregados y se dejan para que reaccionen durante 16 horas a la temperatura del cuarto. Los volátiles son removidos al vacío y el residuo es purificado por medio de cromatografía.

**Paso C, D:**

[0626] Los pasos C [Hyrup;1996; Bioorganic & medicinal chemistry (Química bioorgánica y medicinal); 5-23] y D [Schmidt;1997; Nucleic Acids Research (Investigación de Ácidos Nucleicos); 4792-4796, Böhler;1995; Nature (Naturaleza); ] son bien conocidos de la literatura.

**Paso E**

[0627] Una solución de DMF (2 ml) del nucleósido sustituido por yodo protegido (0.34 milimoles), el alquino (0.69 milimoles, 2 eq), DIEA (0.25 mL) es purgada con Ar durante 5 minutos. Se agrega paladio de trifetilfosfina de tetrakis (0.03 milimoles, 0.1 eq) y  $\text{CuI}$  (0.07 milimoles, 0.2 eq) y la mezcla es calentada a 50 °C y mantenida de esa forma durante 20 horas. La evaporación de los volátiles después de una cromatografía genera al nucleósido modificado deseado el cual es convertido a su amidita de fósforo e incorporada a un oligonucleótido.

Ejemplo (modelo) 77: Síntesis de PNA - enlazada por nitrógeno

[0628] Los monómeros de PNA son enlazados a sus elementos complementarios por medio de partículas de bencilo enlazadas a la parte base de cada monómero de PNA. Una amina es utilizada como punto de anclaje al complejo de oligonucleótidos. Cada bloque de construcción es recosido a una plantilla de oligonucleótidos (no se muestra).

5

10

15

20

25

30

35

40

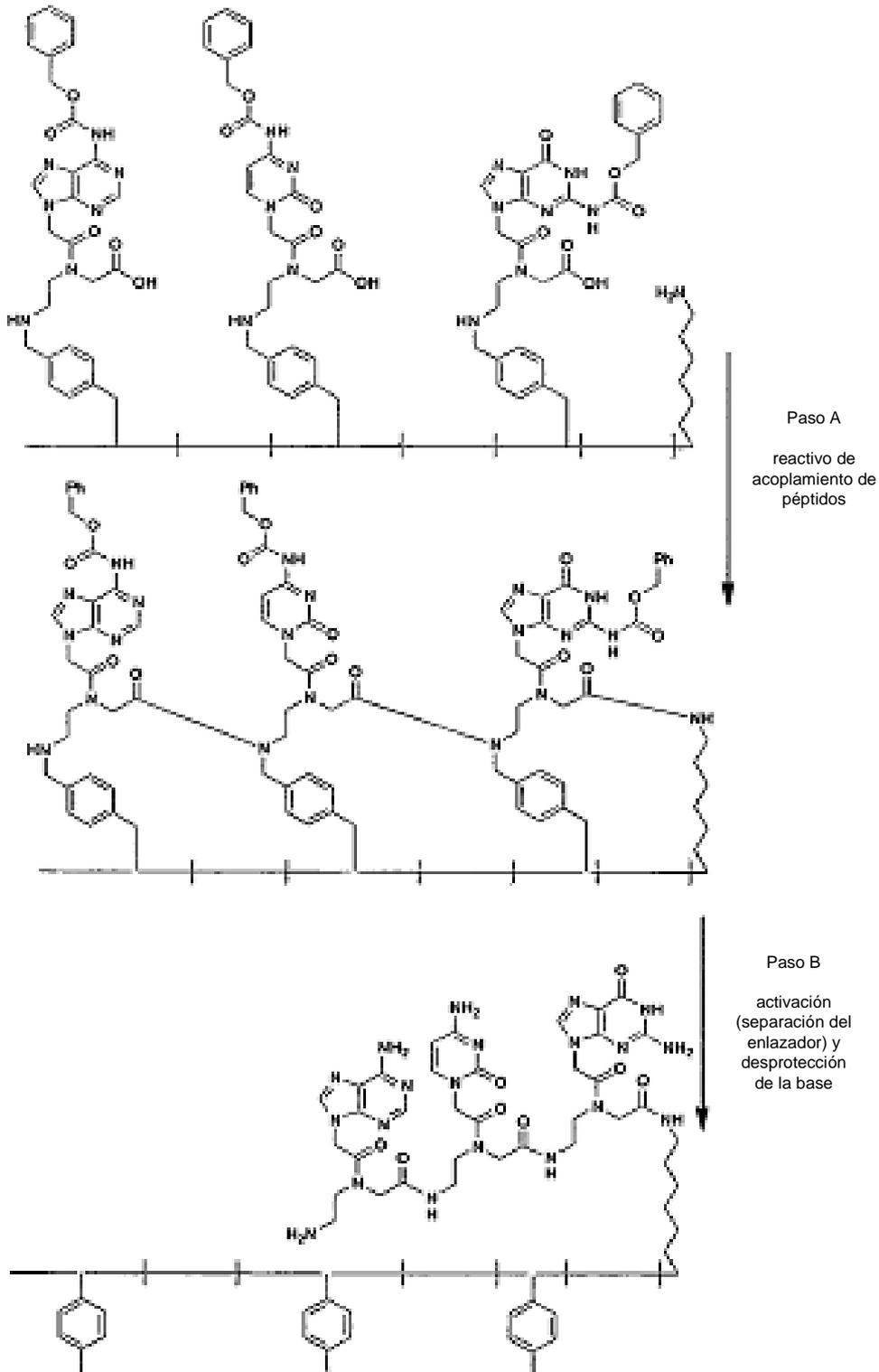
45

50

55

60

65





Designa un enlace de valencia entre los nucleótidos modificados.

**Paso A: polimerización**

5 **[0629]** A una solución amortiguada acuosa (10uL, 1 M de NaCl, 100-500 mM de amortiguador pH 6-10, preferiblemente 7-9) de complejos de oligonucleótidos (0.1-100 uM, preferiblemente 0.5-10 uM) se le agrega un reactivo de acoplamiento de péptidos (0.1 mM - 100 mM, preferiblemente 1-10mM) ejemplificado por, pero sin limitarse a, EDC, DCC, DIC, HATU, HBTU, PyBoP, PyBroP o tetrafluoroborato de *N*-metil-2-cloropiridinio y un modificador de acoplamiento de péptidos (0.1 mM-1 uM, preferiblemente 1-10 mM) ejemplificado por, pero sin limitarse a, NHS, sulfo-NHS, HOBt, HOAt, o DhbtOH en un solvente adecuado (1 µl) por ejemplo, agua, metanol, 10 etanol, metilformamida, dimetilsulfóxido, etilenglicol, acetonitrilo o una de estas mezclas. Las reacciones son ejecutadas a temperaturas entre -20 °C y 60 °C. Los tiempos de reacción están entre una hora y una semana, preferiblemente entre 1 hora y 24 horas.

15 El procedimiento que se acaba de describir ejemplifica la polimerización de una escala de 11 µl, pero cualquier otro volumen de reacción entre una. 1 µl y uno. 1 l podría utilizarse.

**Paso B:**

20 **[0630]** Los grupos protectores de Cbz-y de bencilos podrían ser removidos con una variedad de métodos, [Greene y Wuts;1999;] debido a su moderación, la reducción catalítica es a menudo el método escogido. Combinar a un catalizador de hidrogenación insoluble, por ejemplo, a Pd/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Pd/CaCO<sub>3</sub> Pd/C, PtO<sub>2</sub>, o a unos solubles, por ejemplo, el catalizador de Wilkinsons y una fuente de hidrógeno ejemplificada, pero sin limitarse a H<sub>2</sub>, formiato de amonio, ácido fórmico, 1,4-ciclohexadieno, y ciclohexeno en un solvente adecuado tal como el agua, metanol, etanol, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etilenglicol, acetonitrilo, ácido acético o una mezcla de estos con los complejos de oligo nucleótidos remueve a los grupos protectores de Cbz- y de bencilos.

25 Ejemplo 78 (modelo): Polisacáridos

**Esquema general para la síntesis de polisacáridos**

30

35

40

45

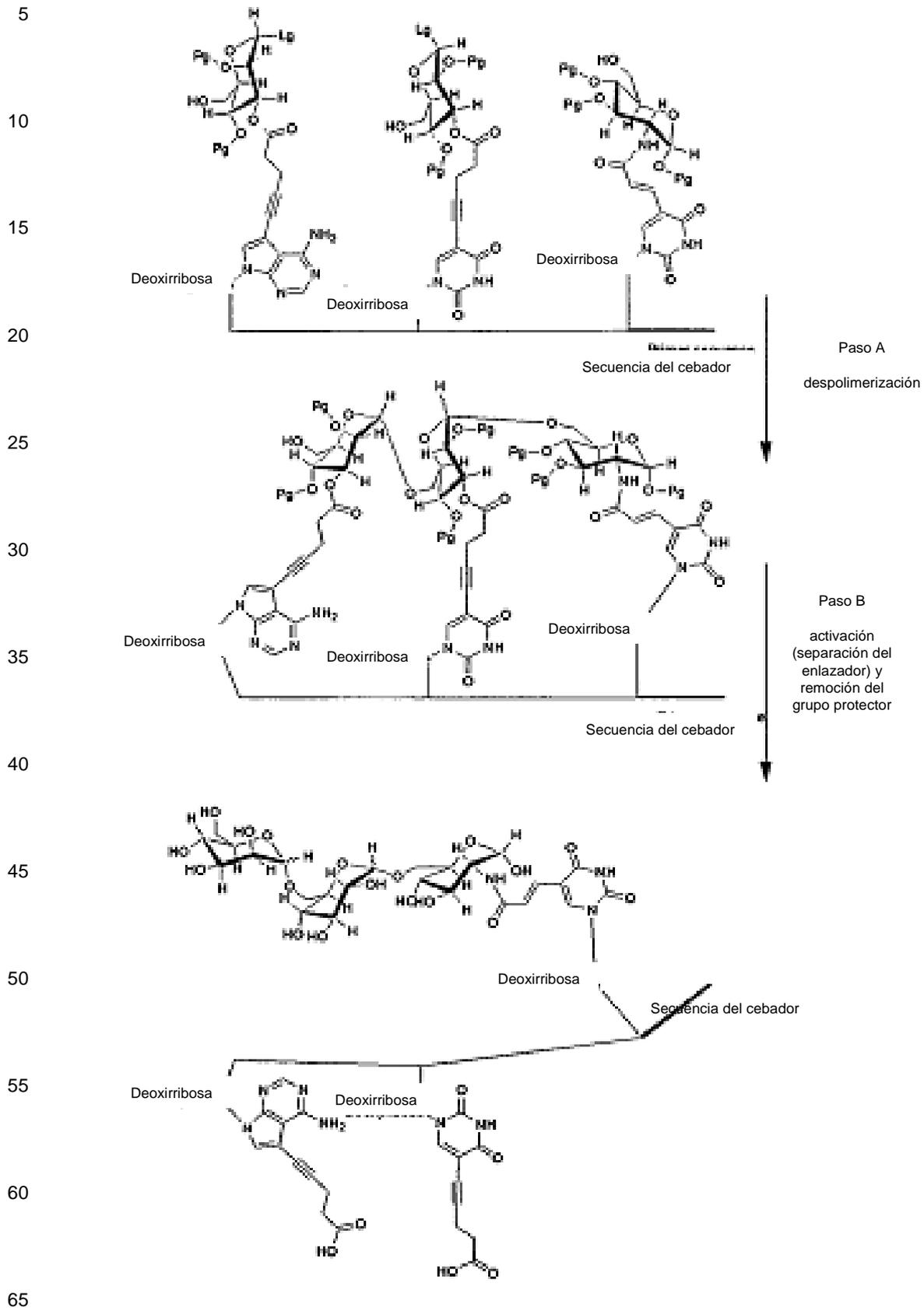
50

55

60

65

[0631]



**Paso A**

[0632] Una secuencia cebadora modificada con un ácido carboxílico (por ejemplo, Glen Research Carboxi-dT cat. No. 10-1035-) que ha sido adherida a un 2-amino-azúcar es recosida a una plantilla (no se muestra) y extendida con nucleótidos modificados que portan a unidades de hexosa. Pg (grupo protector - protection group) es un grupo protector [Seeberger;2000; Chem. Rev.; 4349-4393, Seeberger;2001; ] ejemplificado, pero sin limitarse a, Ac, Bz, Lev, Piv, silanos (SiR3 donde R es un alquilo inferior), Lg es un grupo típico que abandona de la química de los carbohidratos ejemplificado, pero sin limitarse a, halógenos, tricloroacetamidas, mercaptanos, fenoles, ésteres de fosfato y fosfatos de nucleósidos de azúcar o fosfatos de azúcar para una síntesis enzimática de carbohidratos [Wong;1994; Tetrahedron Organic Chemistry Series (Series de Química Orgánica de Tetraedro); ]. Los polisacáridos también pueden ser sintetizados utilizando a glicales.

**Paso B: Activación de enlaces**

[0633] Los enlaces de ésteres son separados con hidróxido acuoso a un pH de 9-12 a la temperatura del cuarto, 16 horas en un solvente adecuado tal como el agua, el metanol, el etanol, la dimetilformamida, el dimetilsulfóxido, el etilenglicol, el acetonitrilo o una mezcla de estos.

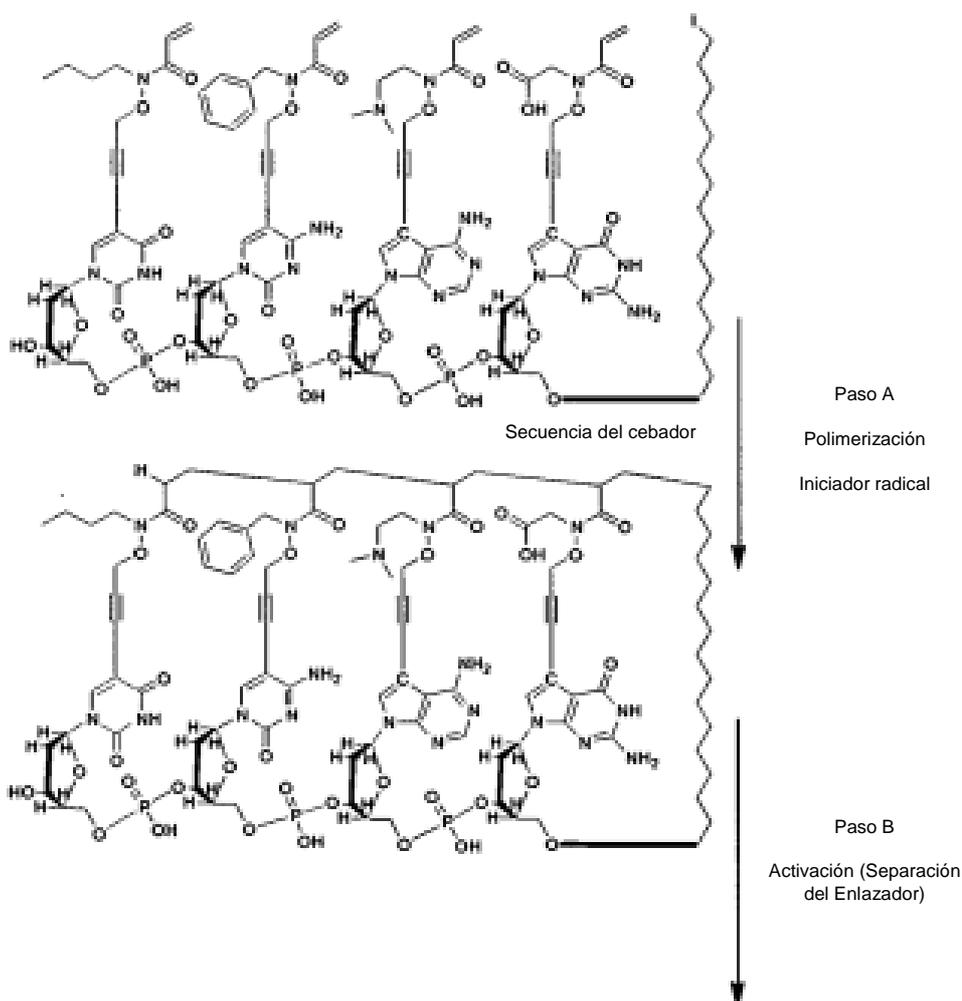
[0634] Los carbohidratos tienen algunas funcionalidades OH- permitiendo la adherencia del elemento complementario. Este ejemplo muestra a un trímero pero cualquier combinación de bloques de construcción puede ser utilizada.

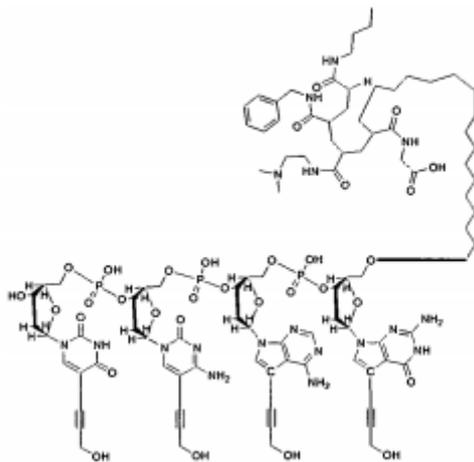
Adherir unidades de carbohidratos a una plantilla podría reducir la tendencia de estas unidades para plegarse en estructuras secundarias facilitando, por lo tanto, la síntesis de los polisacáridos.

Ejemplo (modelo) 79: Acrilamida

**Esquema general para la síntesis de una poliacrilamida:**

[0635]





[0636] Una secuencia cebadora modificada terminalmente que porta a un átomo de yodo es recosida a una plantilla de oligonucleótidos (no se muestra) y extendida con nucleótidos modificados que portan a unidades de acrilamidas N-sustituidas.

#### Paso A: polimerización

[0637] Las acrilamidas son polimerizadas en una reacción radical sucesiva que empieza por medio de la abstracción del átomo de yodo por un iniciador radical que forma un átomo carbono que se basa en el radical.

A una solución amortiguada acuosa (10 $\mu$ L, 1 M de NaCl, 100-500 mM de amortiguador pH 6-10, preferiblemente 7-9) de complejos de oligonucleótidos (0.1-100  $\mu$ M, preferiblemente 0.5-10  $\mu$ M) que porta a unidades acrilamidas N-sustituidas se le agrega un iniciador radical (0.1mM-100mM, preferiblemente 1-10 mM) ejemplificado pero sin limitarse a peroximonosulfato, AIBN, di-terc-butilperóxido, terc-butilperóxido, peróxido de hidrógeno o acetato de plomo en un solvente adecuado (1  $\mu$ l), por ejemplo, agua, metanol, etanol, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etilenglicol, acetonitrilo, o una de sus mezclas, aplicando opcionalmente luz ultravioleta, ultrasonidos o microondas. Las reacciones son ejecutadas a temperaturas entre -20 °C y 100 °C, preferiblemente entre 0 °C y 60 °C. Los tiempos de reacción son de entre una hora y una semana, preferiblemente 1 hora-24 horas.

El procedimiento anterior ejemplifica la polimerización en una escala de 11  $\mu$ l, pero cualquier otro volumen de reacción entre 1.1 microlitros y 1.1 l podría ser utilizado.

#### Paso B: Activación

[0638] El enlace N-O es susceptible a separarse por medio de reducción utilizando catalizadores de hidrogenación y un hidrógeno adecuado o en la presencia de ciertas sales metálicas.

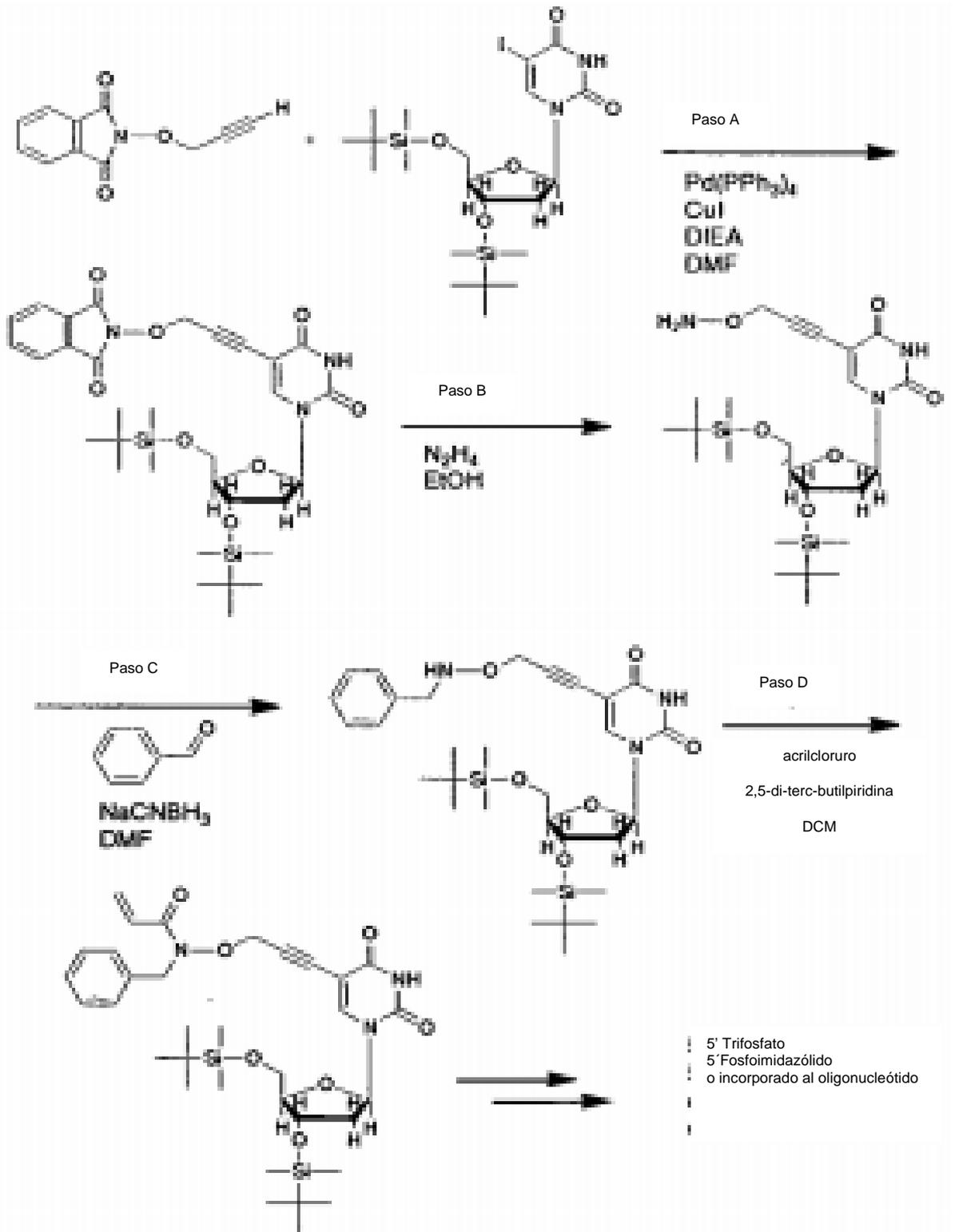
[0639] A una solución amortiguada acuosa (10 $\mu$ L, 1 M de NaCl, 100-500 mM de amortiguador pH 4-10, preferiblemente 4-7) de complejos de oligonucleótidos (0.1-100  $\mu$ M, preferiblemente 0.5-10  $\mu$ M) se le agrega reductores (0.1mM-100mM, preferiblemente 1-10 mM) ejemplificados, pero sin limitarse a, yoduro de samario (II), cloruro o manganeso (III) de estaño (II) en un solvente adecuado (1  $\mu$ l), por ejemplo, agua, metanol, etanol, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etilenglicol, acetonitrilo, o una de estas mezclas. Las reacciones son ejecutadas a temperaturas entre -20 °C y 100 °C, preferiblemente entre 0 °C y 60 °C. Los tiempos de reacción son entre una hora y una semana, preferiblemente una hora-24 horas.

El procedimiento que se acaba de describir ejemplifica la polimerización en una escala de 11  $\mu$ l, pero cualquier otro volumen de reacción entre 1.1  $\mu$ l y 1.1 l podría ser utilizado.

#### Síntesis de bloques de construcción:

[0640]

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65



**Paso a:**

[0641] Se purga una solución de DMF (20 ml) del nucleósido sustituido de yodo protegido (3.4 milimoles), el alquino (6.9 milimoles, 2eq, Aldrich P51338), DIEA (2.5 mL) con Ar durante 5 minutos. Se agrega paladio de trifenilfosfina de tretakis (0.3 milimoles, 0.1 eq) y Cul (0.7 milimoles, 0.2 eq) es agregado y la mezcla es calentada a 50 °C y mantenida así durante 20 horas. Al enfriarse, se agrega a la mezcla 700 ml de dietiléter. La fase orgánica es lavada con cloruro de amonio (sat, aq, 250 ml) y agua (250 ml), se evaporan a los volátiles seguido por una extirpación con tolueno (400 ml) genera al nucleósido modificado deseado que es purificado por medio de cromatografía de columnas (gel sílice, eluyente de acetato de heptano/etílico).

**Paso B:**

[0642] Al nucleósido modificado obtenido en el paso a (2 mmol) en etanol (30 ml) se agrega un hidrato de hidracina (400 mg, 8 mmol, 4 eq.) y la mezcla es agitada a 20 °C. La reacción es monitoreada por medio de TLC. Al completarse los volátiles son removidos al vacío y el residuo es purificado por medio de cromatografía.

**Paso C:**

[0643] A la amida obtenida en el paso B (0.5 milimoles) se le agrega DMF (10 ml), benzaldehído (0.6 milimoles, 1.2 eq), ácido acético (100 µl, 1%) y cianoborohidruro de sodio (0.6 milimoles). Reacciona a 20 °C, durante 16 horas y es neutralizada con NaHCO<sub>3</sub> (aq, 10mL, 5%) y extraída con acetato etílico (3x100 mL). La fase orgánica combinada es lavada con NH<sub>4</sub>Cl (sat, aq, 50 mL) y agua (50 mililitros) y secada sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Cuando se evapora el acetato etílico, el residuo puede ser purificado por medio de cromatografía.

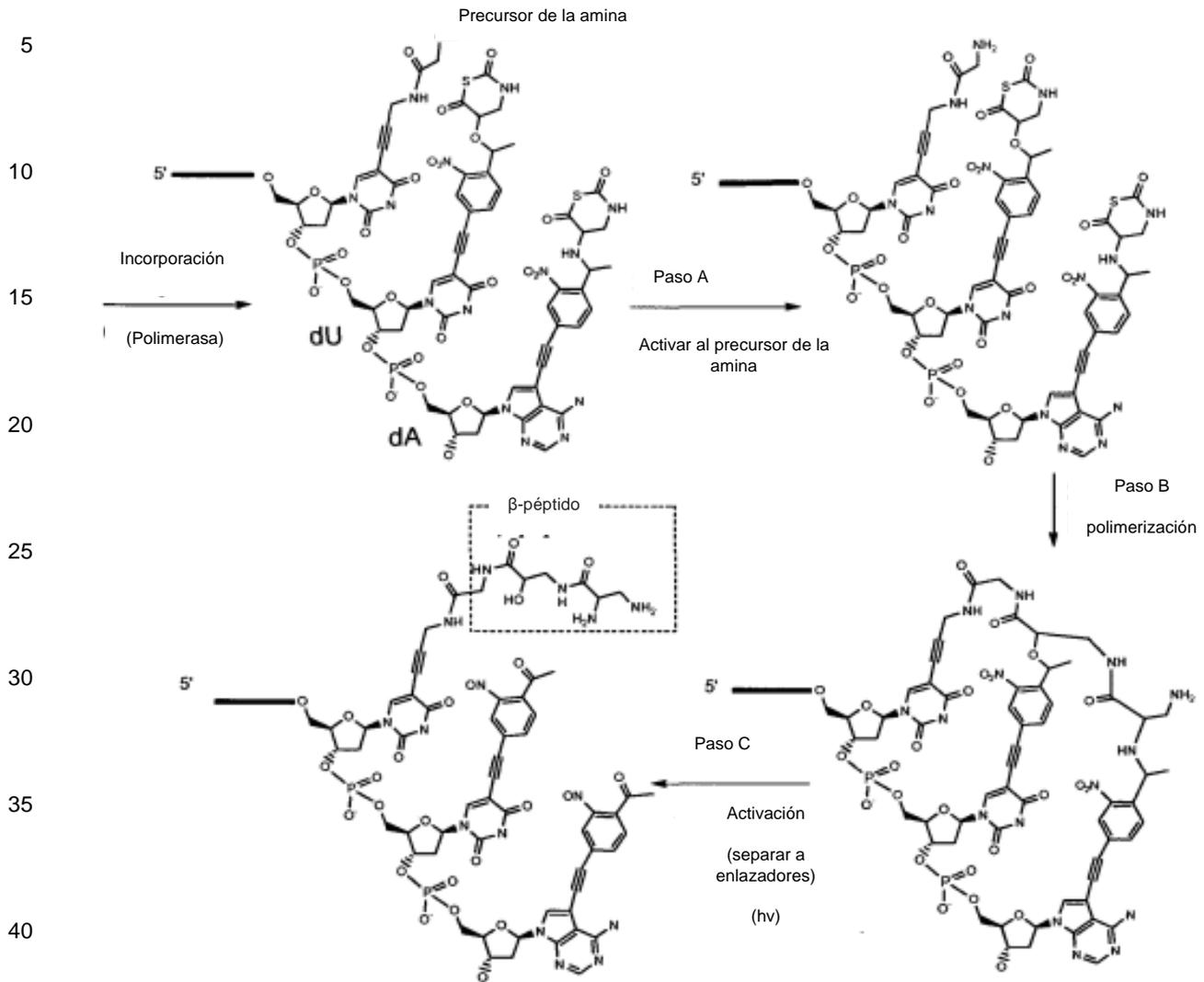
**Paso D:**

[0644] El producto obtenido en el paso C (0.1 mmol) es disuelto en diclorometano en la presencia de 2,6-di-tertbutilpiridina (0.4 mmol) y enfriado a 0 °C para agregarse acrilcloruro (0.15 milimoles) en diclorometano (2 ml) en forma de gotas. Después de una hora de reacción a 0 °C a la temperatura se le permite elevarse a 20 °C y la reacción es neutralizada después de una hora con NaHCO<sub>3</sub> (aq, 3 mL, 5%). Las fases son separadas y la fase orgánica es reducida al vacío. El residuo es absorbido en acetato etílico y lavado con HCl(aq) (0.1 M, 3 mL), NaHCO<sub>3</sub> (aq, 3 mL, 5%) y agua (3 ml). Al evaporarse el acetato etílico, el producto es extirpado con tolueno (2x20 mL), purificado por cromatografía y convertido al tipo de bloque de construcción deseado, por ejemplo, un 5'-trifosfato.

Ejemplo (modelo) 80: Síntesis de β-péptidos

**Esquema general para la síntesis de β-péptidos:**

[0645]



45 **Paso A**

[0646] El precursor de aminas podría ser una amina que porte a un grupo protector [Greene and Wuts;1999; ], por ejemplo, pero sin limitarse a, carbamato de bencilo, carbamato de parametoxibencilo, carbamato de 2-trimetilsiletilo, carbamato de 2,2,2-tricloroetilo. Estos grupos protectores son removidos por medio de hidrogenólisis, un tratamiento moderadamente ácido, tratamiento de fluoruro y un tratamiento con polvo de Zn respectivamente. Alternativamente, el precursor de aminas podría ser un grupo nitro o una azida. Ambos son convertidos a aminas por medio de una reducción. La posterior es reducida bajo condiciones moderadas utilizando fosfinas.

55 **Paso B**

[0647] La amina libre generada en el paso A ataca a la unidad de NTA cercana para iniciar el proceso.

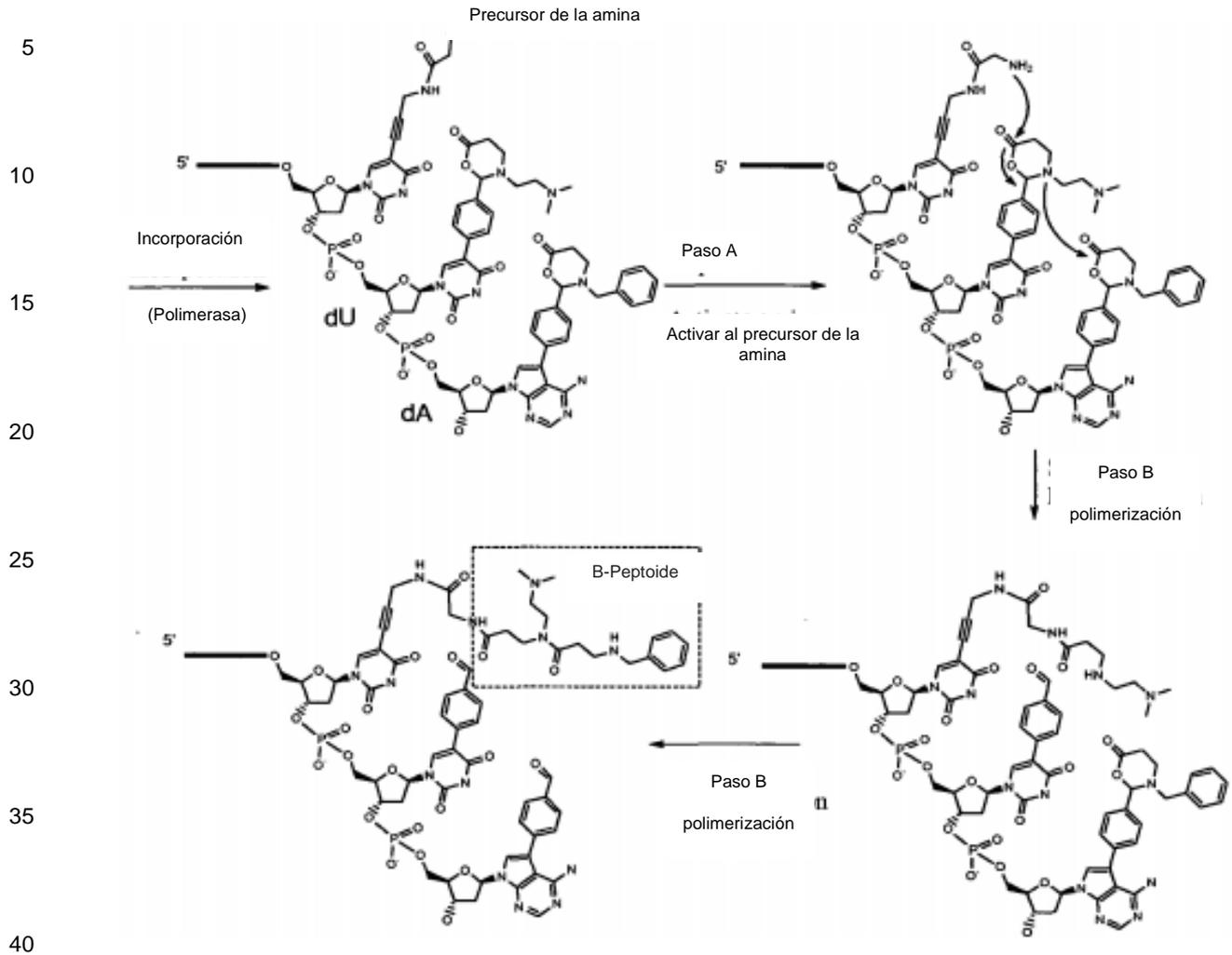
**Paso C**

60 [0648] La separación del enlazador es ejecutada utilizando radiación ultravioleta (250-500 nm) en una solución amortiguada de complejos de oligonucleótidos (pH 5-10) para liberar parcialmente a un péptido beta. Ejemplo (modelo) 81: síntesis de  $\beta$ -peptoides

**Esquema general para la síntesis de  $\beta$ -peptoides**

65

[0649]



**Paso A**

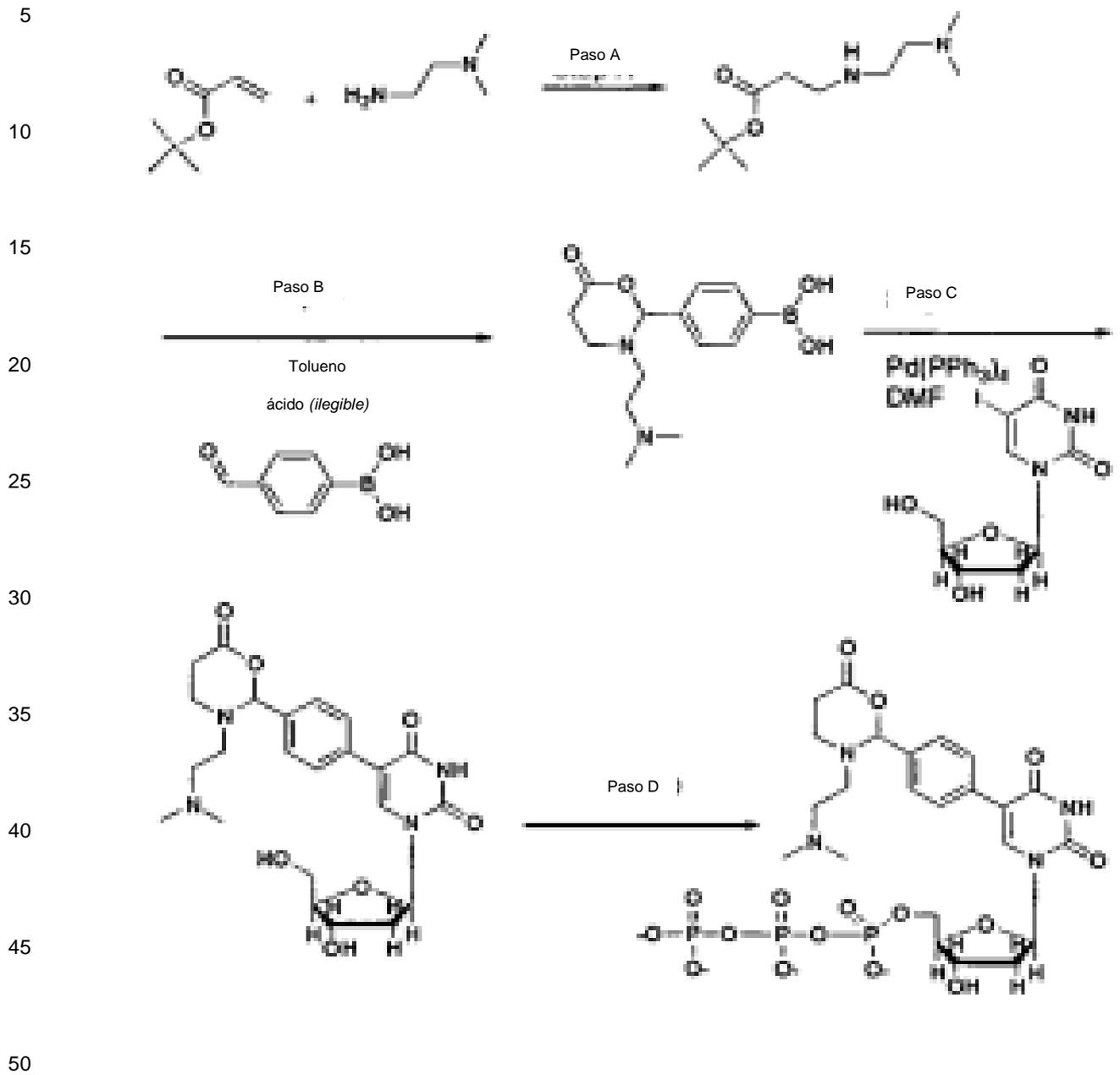
[0650] El precursor de aminas puede ser una amina que porta a un grupo protector [Greene y Wuts;1999] , por ejemplo, pero sin limitarse a, carbamato de bencilo, carbamato de parametoxibencilo, carbamato de 2-trimetilsiletilo, carbamato de 2,2,2-tricloroetilo. Estos grupos protectores son removidos por medio de hidrogenólisis, un tratamiento ácido moderado, un tratamiento de flúor y un tratamiento con polvo de Zn respectivamente. Alternamente, el precursor de aminas puede ser un grupo nitro o una azida. Ambos son convertidos a aminas por medio de reducciones. El segundo también es reducido bajo condiciones moderadas utilizando fosfinas.

**Paso B**

[0651] La amina libre generada en el paso A ataca a la unidad [1,3]Oxazinan-6-ona cercana que forma inicialmente un aminal inestable debido a la apertura anular. Esto colapsa a un aldehído que libera a una amina secundaria la cual ahora es capaz de continuar el proceso que resulta en este caso en un  $\beta$ -peptide.

**Síntesis del bloque de construcción**

[0652]



Ejemplo (modelo) 82: Síntesis de poliamidas

55 [0653] Los bloques monoméricos de construcción que se alternan de tipo X-X y Y-Y son incorporados (el principio mostrado en la figura 16) seguido por un paso de polimerización que resulta en la formación de enlaces entre X y Y en monómeros cercanos.

**Síntesis del bloque de construcción**

60

65

[0654]

5

10

15

20

25

30

35

40

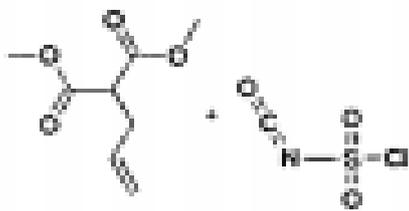
45

50

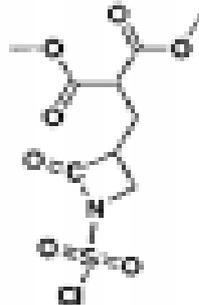
55

60

65



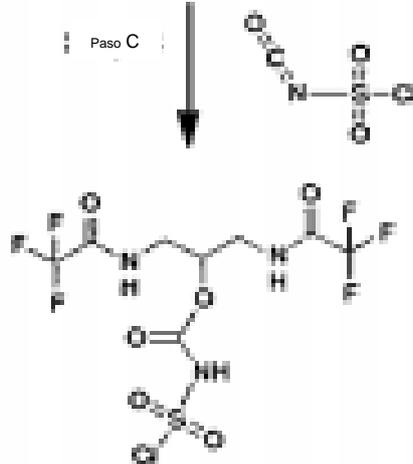
Paso A



Paso B



Paso C



**Paso A: cicloadición 2 + 2**

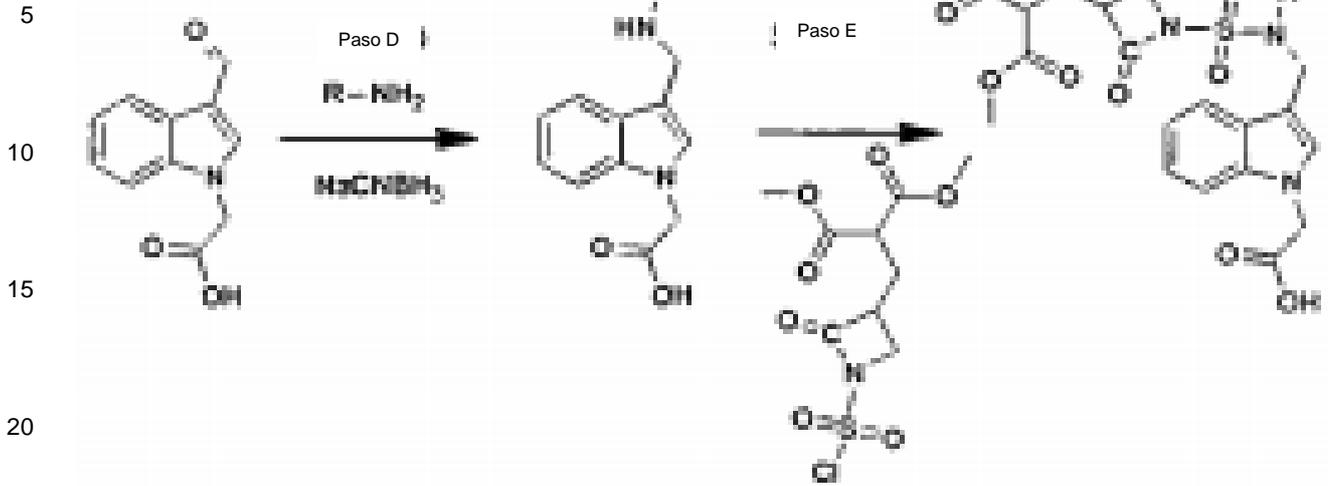
[0655] Se mezclan el éster de dimetilo de ácido 2-alil-malónico (1 mmol) y el isocianato de clorosulfonilo (1 mmol) en THF a 20 °C y se deja que reaccionen durante 7 días. El producto crudo es utilizado sin purificación.

**Paso B: Protección de la di-amina**

[0656] Se mezcla a 1,3-diamino-propan-2-ol (1 mmol) y a anhídrido trifluoroacético (2 mmol) en dietileter a 0 °C y se lo deja que reaccione a esta temperatura durante 4 horas. La mezcla de la reacción es extraída con 1 M de HCl, NaHCO<sub>3</sub> (aq) y agua. El producto es obtenido por medio de la evaporación de la fase orgánica.

**Paso C: Formación del carbamato**

[0657] La 2,2,2-trifluoro-N-[2-hidroxi-3-(2,2,2-trifluoro-acetilamino)-propil]-acetamida (1.5 mmol) obtenida en el paso B es disuelta en THF junto con el isocianato de clorosulfonilo (1.5 mmol) y se deja a que reaccionen a 20 °C durante 6 horas. El producto crudo es utilizado sin purificaciones.

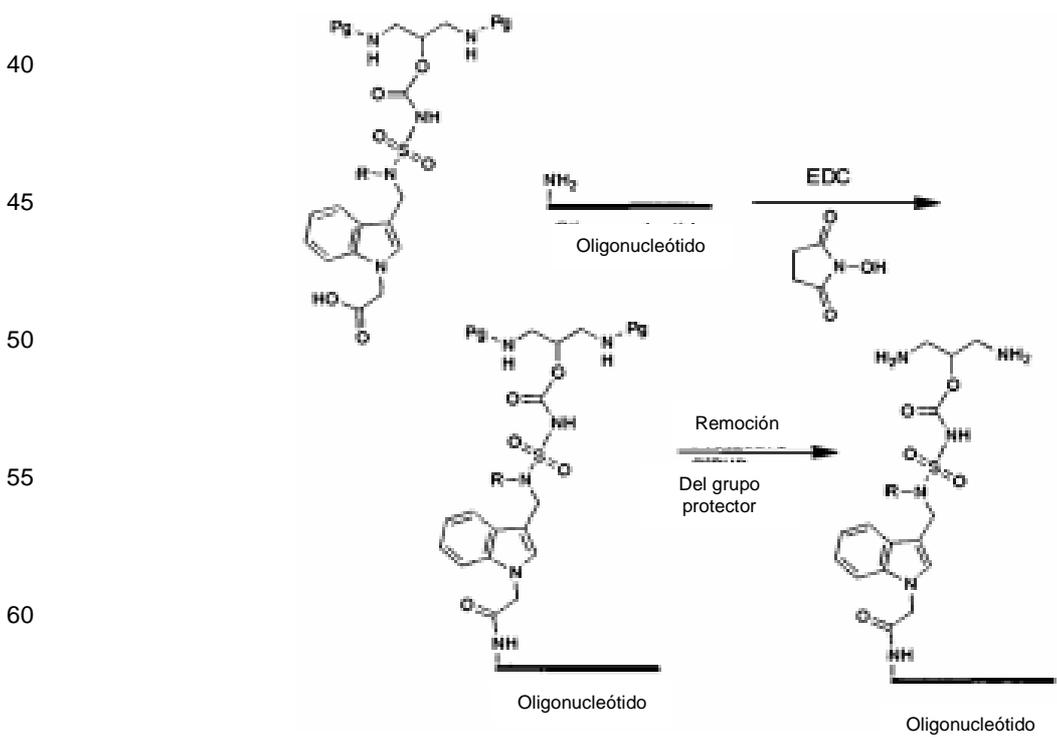


25 **Paso D: Aminación reductiva**

[0658] El aldehído (5 mmol) es disuelto en un MeOH mínimo y se le agrega una amina (6 mmol), cianoborohidruro de sodio (6 mmol) y ácido acético. Al agitar a los volátiles durante la noche y removerlos el producto es purificado por medio de cristalización o cromatografía.

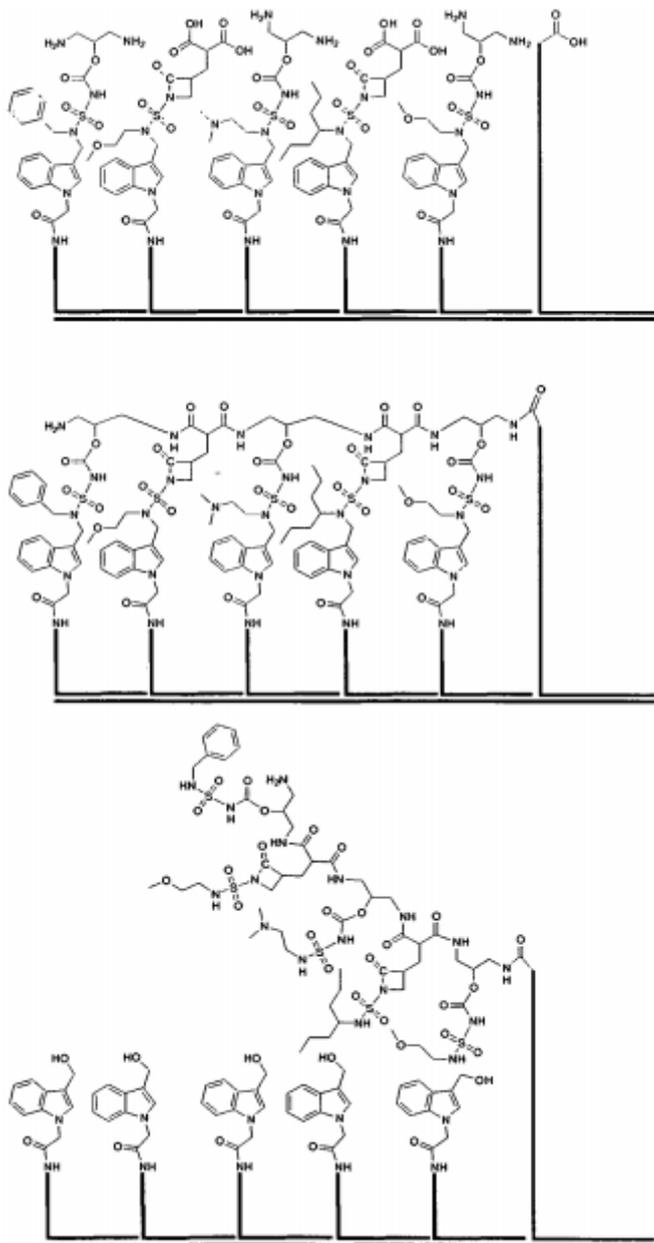
30 **Paso E: Formación de sulfonamidas**

[0659] El producto crudo del paso A o del paso C en THF es agregado a la amina obtenida en el paso D en una mezcla de agua/THF en la presencia de la base y se deja a que reaccionen a 20 °C durante 4 horas. Entonces la mezcla es expuesta a reflujos durante la noche. Al enfriarse, el solvente es removido y el residuo es purificado por cromatografía.



**Preparación del bloque de construcción oligo**

**[0660]** Las diaminas y los diácidos protegidos son adheridos a los oligonucleótidos modificados que portan una funcionalidad amino primaria utilizando EDC y NHS en un amortiguador acuoso (pH 5-8, preferiblemente 6-7). Los grupos protectores (ésteres de metilo y acetamidas de trifluoro) son removidas en un amortiguador acuoso (pH 10-12). Alternamente, los grupos protectores permanecen en los bloques de construcción y son removidos después de recoserse a la plantilla de oligonucleótidos

**Preparación de bibliotecas****[0661]****Polimerización:**

**[0662]** A una solución amortiguada acuosa (100 $\mu$ L, 1M de NaCl, 100-500 mM de amortiguador pH 6-10, preferiblemente 7-9) de complejos de oligonucleótidos (0.1-100  $\mu$ M, preferiblemente 0.5-10  $\mu$ M) que portan a diaminas y a ácidos di-carboxílicos se le agrega un reactivo acoplador de péptidos (0.1 mM-100 mM, preferiblemente 1-10 mM), por ejemplo, pero sin limitarse a, EDC, DCC, DIC, HATU, HBTU, PyBoP, PyBroP o tetrafluoroborato de N-metil-2-cloropiridinio y un modificador de acoplamiento de péptidos (0.1 mM- 100 mM, preferiblemente 1-10 mM), por ejemplo, pero sin limitarse a NHS, sulfo-NHS, HOBt, HOAt, DhbtOH en un solvente adecuado (1  $\mu$ l), por ejemplo,

agua, metanol, etanol, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etilenglicol, acetonitrilo o una de sus mezclas. Las reacciones se ejecutan a temperaturas entre -20 °C y 60 °C. Los tiempos de reacción son de entre una hora y una semana, preferiblemente 1 hora-24 horas. El procedimiento que se acaba de explicar ejemplifica la polimerización en una escala de 11 µl, pero cualquier otro volumen de reacción entre 1.1 µl y 1.1 l puede ser utilizada.

5

**Activación (separación de enlazadores):**

[0663] Los enlazadores son separados por medio de un tratamiento con ácido pH 0-5.0-40 °C durante 10 minutos-10 horas.

10

**Referencias**

**[0664]**

- 15 (1) Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. Protective Groups in Organic Synthesis (Grupos Protectores en la Síntesis Orgánica); 3ª ed.; John Wiley & Sons: Nueva York,1999.
- (2) Hyrup, B.; Nielsen, P. E. Bioorganic & medicinal chemistry (Química bio - orgánica y Medicinal) 1996, 4, 5-23.
- (3) Schmidt, J. G.; Christensen, L.; Nielsen, P. E.; Orgel, L. E. Nucleic Acids Research (Investigación de Ácidos Nucleicos) 1997, 25, 4792-4796.
- (4) Böhrler, C.; Nielsen, P. E.; Orgel, L. E. Nature (Naturaleza) 1995, 376.
- 20 (5) Seeberger, P. H.; Haase, W. C. Chem. Rev. 2000, 100, 4349-4393.
- (6) Solid Support Oligosaccharide Synthesis and Combinatorial Carbohydrate Libraries (Síntesis de Oligosacáridos en Soportes Sólidos y Bibliotecas Combinatorias de Carbohidratos); Seeberger, P. H., Ed.;Wiley-Interscience: Nueva York, 2001.
- (7) Wong, C.-H.; Whitesides, G. M. Enzymes in Synthetic Organic Chemistry (Enzimas en la Química Orgánica Sintética); Pergamon: Oxford, 1994.

25

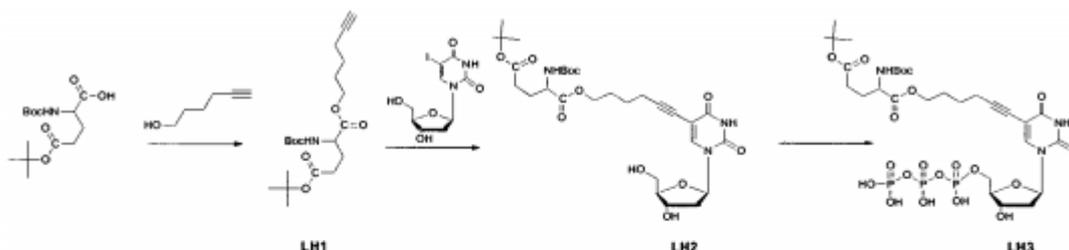
Ejemplo (modelo) 83. Aislamiento de un ligando de α-péptido a una S-transferasa de glutatión (GST - Glutathione S-transferase) a partir de una biblioteca de α-péptidos modelados.

**A) síntesis de derivados de nucleótidos**

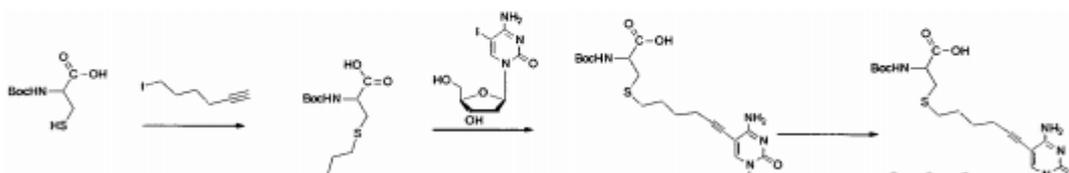
30

[0665] La estrategia sintética para 3 derivados de nucleótidos se muestra en el esquema a continuación con una descripción detallada de la síntesis. Ejemplos de otros derivados de nucleótidos de α-aminocácidos sintetizados pueden encontrarse en la literatura (por ejemplo, Ito et al. (1980) J. Amer. Chem. Soc. 102: 7535-7541; Norris et al. (1996) J. Amer. Chem. Soc. 118: 5769-5803; Celewicz et al (1998) Pol. J. Chem. 72: 725-734).

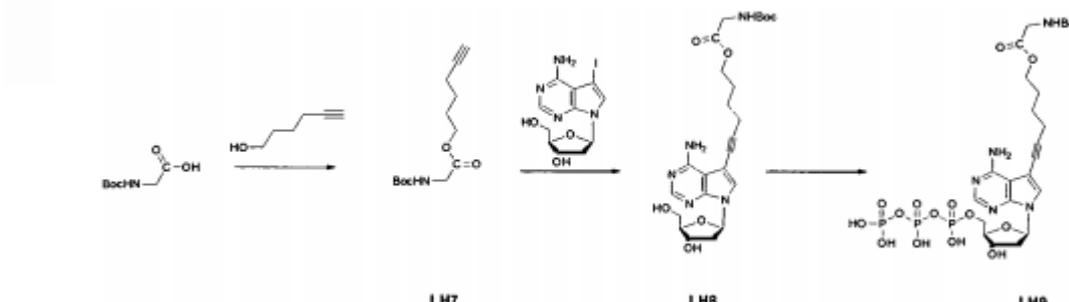
35



40



50



55

60

65

5 [0666] **Síntesis de LH1, LH7:** Se agrega EDC (3.2 milimoles) a una solución enfriada con agua y hielo de ya sea glutamato de *N*-(*terc*-butoxicarbonil)-*tert*-butoxi (3.0 mmol) o *N*-(*terc*-butoxicarbonil)-glicina (3.0 mmol) en diclorometano (10 mL). Una solución de piridina de 4-dimetilamino (0.3 milimoles) y 5-hexinol (4.6 milimoles) en diclorometano (1 ml) es agregada. La mezcla de la reacción es agitada durante una hora a 0 °C, luego a la temperatura del cuarto durante la noche. El solvente fue evaporado y el residuo fue absorbido en éter dietílico. La mezcla espesa es lavada con HCl (0.1 M, 25 mL), NaHCO<sub>3</sub> saturado (25 ml) y salmuera (25 ml), y entonces concentrada a aceite. El producto es purificado por medio de cromatografía de destellos.

10 [0667] **Síntesis de LH4:** Se agrega 6-yodohexino (6 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6 mmol) a una solución de *N*-(*terc*-butoxicarbonil)-cisteína (3 mmol) en metanol (5 mL) y DMF (5 mL). La mezcla de la reacción es agitada durante un día a 40 °C, concentrada entonces y procesada por cromatografía de columna.

15 [0668] **Síntesis de LH2, LH5 y LH8:** Se agregan Tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0.6 mmol) y CuI (0.2 mmol) a una solución desgasificada de nucleósidos de yodo (1 mmol), el alquino (2 mmol) y amina de etildiisopropilo (2 mmol) en DMF o etanol (4 ml). La mezcla de la reacción es agitada bajo una atmósfera de argón. La reacción es seguida por TLC. La reacción es agitada a 50 °C si es que ninguna reacción ocurrió a la temperatura del cuarto. La mezcla de la reacción es concentrada a jarabe y procesada por medio de RP-HPLC (eluyente: agua → metanol). El nucleósido correspondiente de yodo protegido de sililo de *terc*-butildimetilo es utilizado en vez del nucleósido desprotegido cuando el grupo primario hidroxilo es acilado en el transcurso de la reacción. El éter de sililo es separado después del acoplamiento de Sonogashira al tratar al compuesto con fluoruro de amonio de tetrabutilo (4 eq.) En una solución de etanol y ácido acético (8 eq.) durante un día seguido por la concentración y el procesamiento por medio de RP-HPLC (eluyente: agua → metanol).

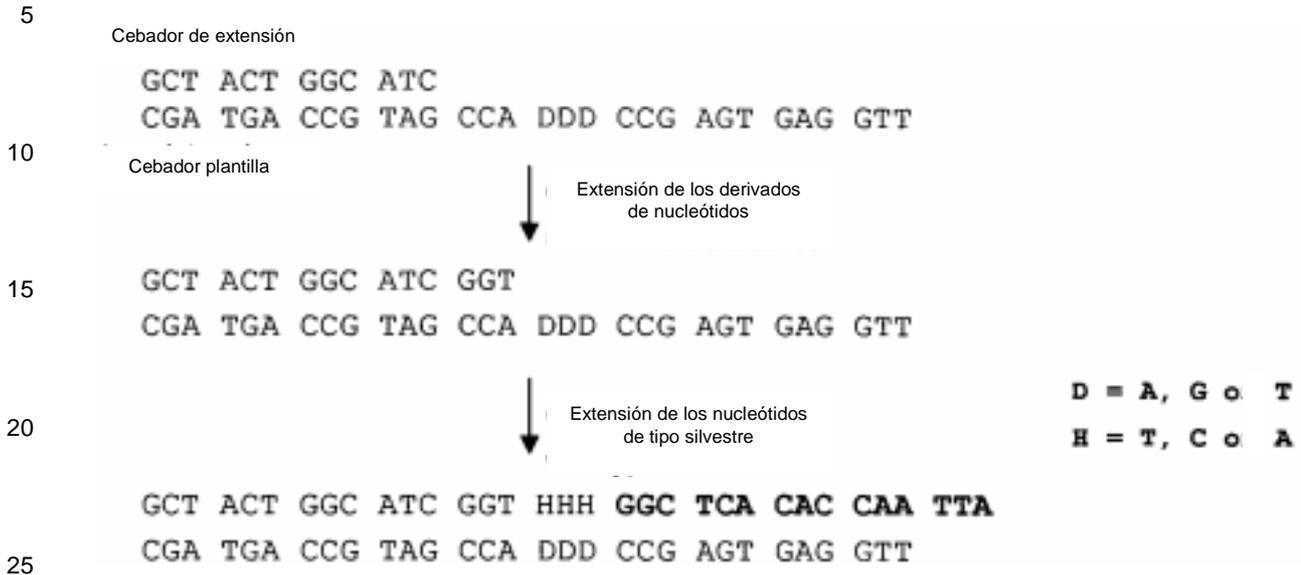
25 [0669] **La síntesis de LH3, LH6 y LH9:** Se agrega fosfooxiclورو (0.11 milimoles) a una solución enfriada en agua-hielo del nucleósido (0.1 mmol) el fosfato de trimetilo (1 ml). La mezcla de la reacción es agitada bajo una atmósfera de argón a 0 °C durante una hora. Una solución de pirofosfato de bis-*n*-tributilamonio (0.2 milimoles) en DMF (1 ml) y *n*-tributilamina (0.3 milimoles) es agregada entonces. La mezcla de la reacción es agitada durante 10 minutos y luego se agrega agua (1 ml). La mezcla es neutralizada con trietilamina y agitada a la temperatura del cuarto durante 6 horas, luego concentrada al vacío y procesada por medio de un RP HPLC de intercambio iónico de parejas (eluyente 100 mM de acetato de trietilamonio → 100 mM de acetato de trietilamonio en un 80% de acetonitrilo). La remoción de las sales amortiguadoras del nucleósido es ejecutada al agregar agua (100 µl) a la mezcla y luego concentrar a la solución espesa a 0.1 mmHg varias veces seguidas finalmente por una filtración de geles (eluyente: agua).

### 35 B) Diseño de bibliotecas y la incorporación de derivados de nucleótidos

40 [0670] Una biblioteca modelada puede ser producida por medio de una extensión de un cebador recosido a un cebador plantilla. El cebador plantilla codifica a la biblioteca y puede ser preparado utilizando procedimientos estándar, por ejemplo, por medio de síntesis de órganos con fosforamidita. Para generar varios tipos de bibliotecas de oligonucleótidos, una persona puede, por ejemplo, utilizar redundancias, mezclar a fosforamiditas o usar dopaje en la síntesis de los oligonucleótidos. Estas bibliotecas de oligonucleótidos pueden ser compradas de un proveedor que elabore oligonucleótidos definidos por los clientes (por ejemplo, Technology A/S, Dinamarca o TAG Copenhagen A/S, Dinamarca).

45 [0671] Aquí, un cebador de extensión (5'-GCT ACT GGC ATC GGT-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:16)) es utilizado junto con un cebador plantilla (5'-GTA ATT GGA GTG AGC CDD DAC CGA TGC CAG TAG C-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:18)) donde D (subrayado, utilizando la definición de ambigüedad de la Unión Internacional de Bioquímica) es, ya sea, A, G o T. El cebador de extensión es complementario al cebador plantilla tal como se muestra más adelante. Durante la extensión el cebador es extendido más allá de la secuencia DDD, conllevando a la inserción de derivados de nucleótidos T-, C- o A- en esa posición, de acuerdo a la secuencia de las partidas individuales. En el momento de la polimerización del α-amino y de los precursores adheridos a los nucleótidos, y la separación del enlazador que conecta al amino y al nucleótido, se crea una biblioteca con una diversidad teórica de por lo menos 3<sup>3</sup> = 27 péptidos diferentes.

**Diseño de bibliotecas**  
**[0672]**



[0673] El cebador de extensión es recocido con el cebador plantilla, utilizando 3 pmol de cada cebador en un amortiguador de extensión (20 mM de Hepes, 40 mM de KCl, 8 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4, 10 mM de DTT), al calentarse a 80 °C durante 2 minutos y luego enfriarse lentamente a alrededor de 20 °C. Los derivados de nucleótidos son agregados entonces a una concentración de alrededor de 200 μM cada uno, e incorporados utilizando 5 unidades de transcriptasas reversas de AMV (Promega, parte# 9PIM510) a 30 °C durante una hora. Derivados no incorporados de nucleótidos son removidos utilizando una columna de centrifugación (BioRad). Extensiones adicionales pueden ser realizadas al agregar dNTP de tipo silvestre utilizando las mismas condiciones descritas para los derivados de nucleótidos. Alternamente, un oligonucleótido que se recose a la secuencia corriente abajo de la secuencia DDD es agregada antes de la extensión. El producto de doble hebra es purificado y transferido a otro amortiguador (100 mM de amortiguador de Na-fosfato, pH 8.0) utilizando una columna de centrifugación (BioRad).

**C) Polimerización y separación de los enlazadores**

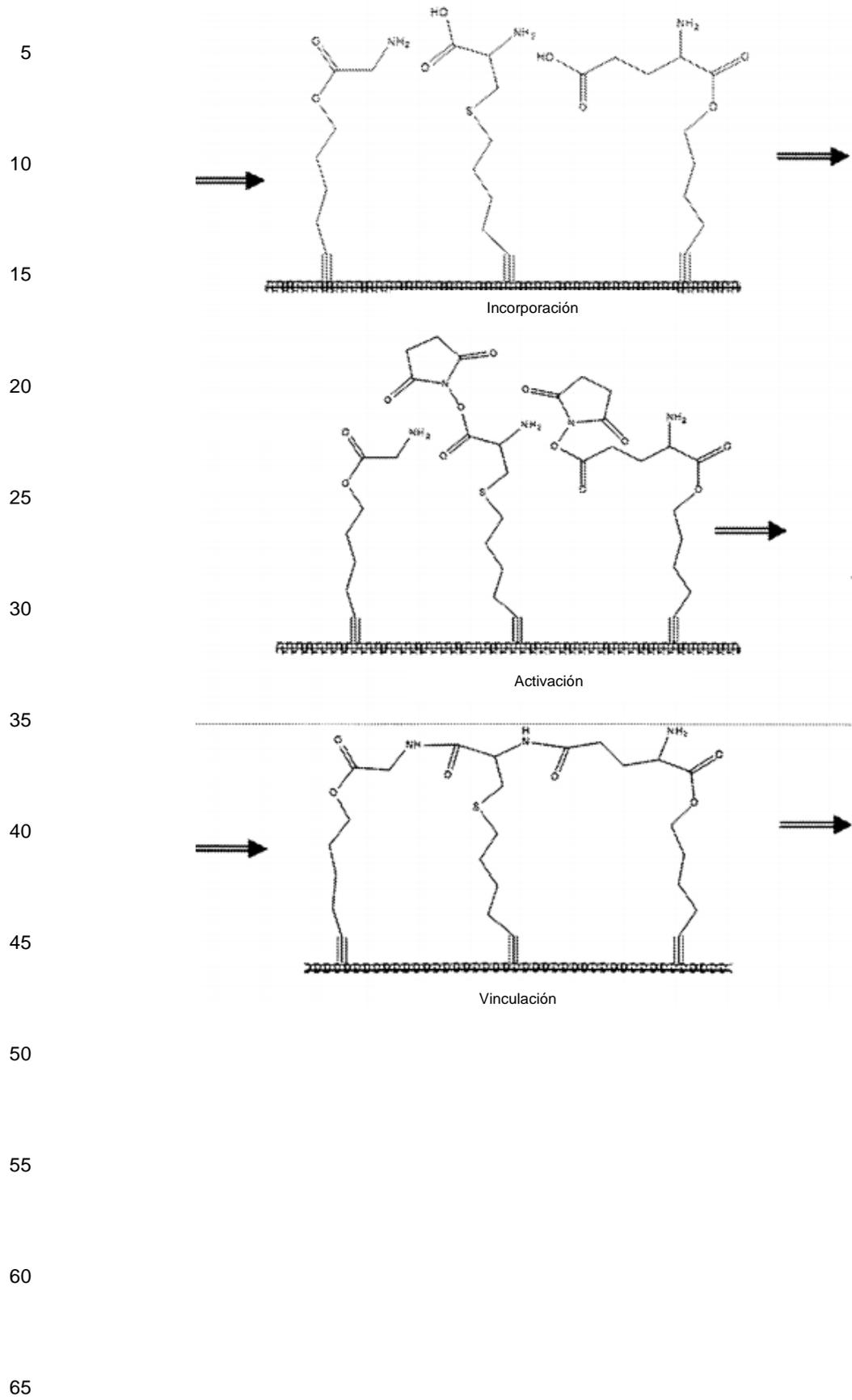
[0674] Los grupos reactivos de los derivados incorporados de nucleótidos son enlazados juntos utilizando carbodiimida de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilo) (EDC - 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide) y N-Hidroxisuccinimida (NHS). Este es un procedimiento rutinario para el acoplamiento de aminas y de grupos de carboxilos. Ejemplos de condiciones de acoplamiento son descritas en la literatura (por ejemplo, el botiquín de acoplamiento de NHS, IAsys, código # NHS-2005).

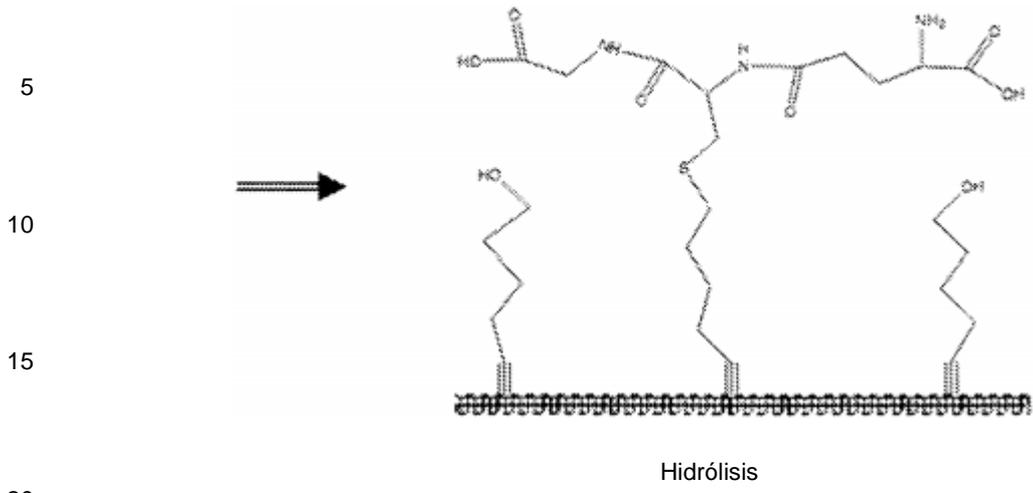
EDC y NHS son agregados al producto de extensión de doble hebra purificado a concentraciones finales apropiadas de alrededor de 100 mM y 10 mM respectivamente. Esta reacción es incubada a 30 °C durante 2-16 horas. Excesos de los reactivos enlazadores son removidos utilizando una columna de centrifugación. La hidrólisis de enlazadores que pueden hidrolizarse se logra al incubar la muestra a un pH 11 (por ejemplo, 0.2 M de NaOH) durante 15 minutos a 50 °C.

**D) Selección**

[0675] Una de las posibles moléculas modeladas en esta biblioteca particular, cuando se usan los derivados de nucleótidos LH3, LH6 y LH9, es el glutatión (Glu-Cys-Gly). La incorporación, y reacción entre los grupos reactivos y separación de los enlazadores para generar al glutatión en la plantilla de ADN se muestra en el esquema a continuación. Se sabe que el glutatión se enlaza específicamente y con una gran afinidad a la S-transferasa de Glutatión (GST - Glutathione S-transferase) y es comúnmente utilizada para la purificación de las proteínas de fusión de GST (Amersham Pharmacia Biotech). También se sabe que el glutatión puede ser inmovilizado por medio del átomo de azufre sin interferir con los enlaces al GST. Consecuentemente, es posible enriquecer al glutatión presentado por la plantilla entre otras moléculas presentadas en la biblioteca al realizar la selección con el GST como la molécula objetivo. El GST puede ser producido en una forma recombinante tal como es descrito en la literatura (por ejemplo, Jemth et al. (1997) Arch. Biochem. Biophys. 348: 247-54) o puede ser obtenida de varios proveedores (por ejemplo, Sigma, producto #, G5524) alternamente, un anticuerpo en contra del glutatión (por ejemplo, Abcam, nombre del producto ab64447 o Virogen, producto # 101-A) puede ser utilizado como la molécula objetivo.

Formación mediada por plantilla del glutatión





[0676] Una placa de micro titulación es cubierta con alrededor de 1 µg de estreptavidina en una amortiguador de TBS (50 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) durante la noche a 4 °C. Se remueve la solución de estreptavidina y se lavan los pozos por lo menos 6 veces con un amortiguador de TBS. Se bloquean los pozos con un 2% de BSA en un amortiguador de TBS (otros ejemplos de agentes bloqueadores que podrían ser utilizados son la caseína, gelatina, polivinilpirrolidona o leche descremada secada) durante alrededor de 30 minutos a 37 °C. Se lavó la placa con un amortiguador de TBS por lo menos 3 veces. Se agrega 0.1 microgramos de GST biotinado a los pozos y se incuban durante alrededor de 30 minutos a 20 °C. Se remueve el GST biotinado no enlazado al lavarse con amortiguador de TBS por lo menos 6 veces. La biotinación del GST es realizada utilizando sulfo-NHS-LC-biotina tal como es descrito en la literatura (por ejemplo, Ellis et al. (1998) Biochem. J. 335; 277-284). Moléculas libres de estreptavidina son bloqueadas con 1 mM de biotina durante 5 minutos y el exceso de biotina es removido por medio de lavados con un amortiguador de TBS por lo menos 6 veces. Entonces se agrega a la biblioteca de moléculas modeladas a los pozos y se permite que se hagan enlaces al GST inmovilizado al incubarse a 20 °C durante alrededor de una hora. Para remover a las moléculas modeladas que no fueron coordinadas por el GST inmovilizado, se lavan los pozos con un amortiguador de TBS por lo menos 6 veces. Se eluye a las moléculas modeladas enlazadas al GST al incubarse con 20 mM de glutatión reducido durante alrededor de 10-60 minutos y luego se transfieren a las muestras desde los pozos a nuevos tubos.

[0677] Las plantillas eluídas (seleccionadas) son amplificadas utilizando 2 cebadores de amplificación (hacia adelante, 5'Biotina-GCT ACT GGC ATC GGT-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:16); reversa, 5'-GTA ATT GGA GTG AGC-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 19)) con un protocolo PCR estándar (por ejemplo, 5 pmol de cada cebador, 0.2 mM de dNTP, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 2.5 unidades de polimerasas Taq térmicamente estables). El PCR es realizado con una desnaturalización inicial de 94 °C durante 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, un recesado a 50 °C durante 30 segundos, una extensión a 72 °C durante 30 segundos, y luego una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. La 5'biotina en el cebador hacia adelante es utilizada para remover la hebra sentido. Esto se realiza al incubarse al producto PCR con microesferas magnéticas cubiertas con estreptavidina (Dynabeads; Dynal Biotech, Noruega) y la plantilla de una sola hebra es purificada tal como se describe por el fabricante. La hebra purificada antisentido es utilizada finalmente como el cebador plantilla junto con el cebador de extensión tal como se describió anteriormente para generar una biblioteca enriquecida de moléculas modeladas para otra ronda de selección.

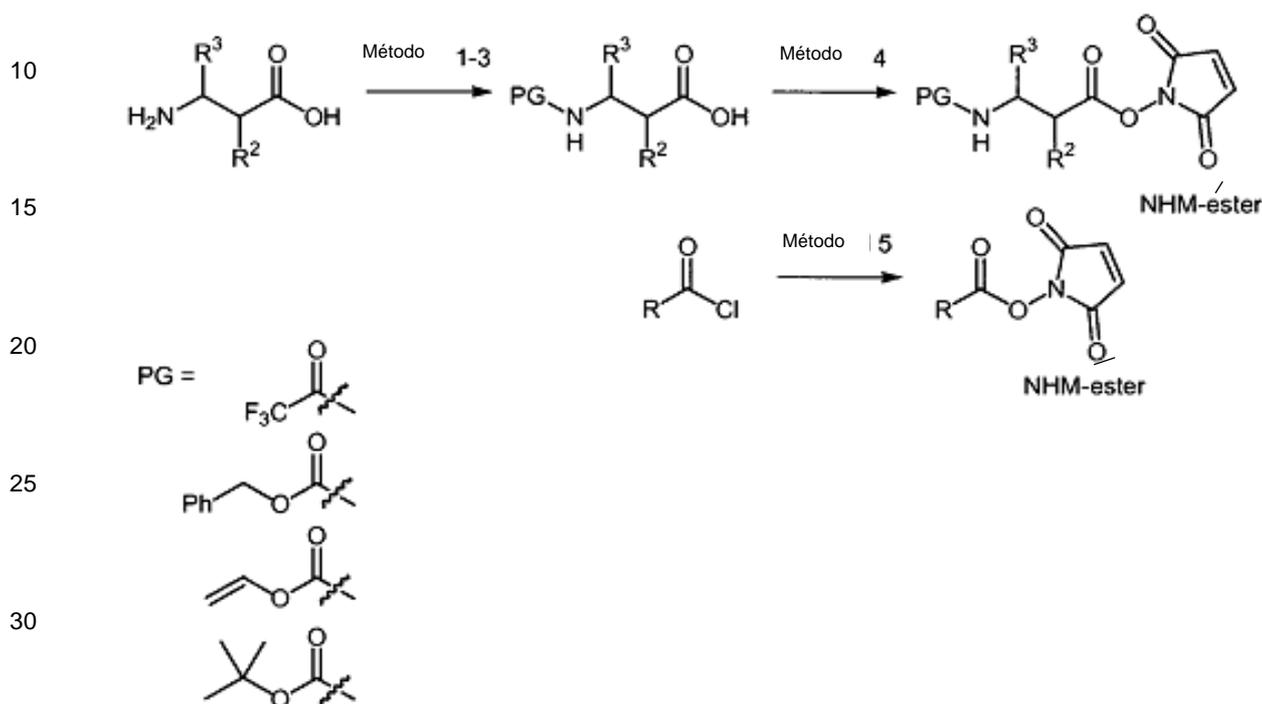
[0678] Los procedimientos de selección y de amplificación son repetidos hasta que un enriquecimiento apropiado sea obtenido. El enriquecimiento puede ser seguido por la caracterización (secuenciación) de las secuencias plantillas recuperadas. La secuencia de nucleótidos de las plantillas es obtenida utilizando protocolos estándar de secuenciación y un secuenciador de ADN (por ejemplo, MegaBase, Amersham Pharmacia Biotech). El enriquecimiento es obtenido cuando el número de secuencias que codifican al glutatión (C-A-T o T-A-C en la región D-D-D del cebador plantilla) se han incrementado en relación a otras secuencias en la biblioteca después del procedimiento de selección.

[0679] Este protocolo describe la incorporación de 3 derivados diferentes de mono-nucleótidos. Sin embargo, todos los mono-nucleótidos (incluyendo a dGTP) podrían ser utilizados para la construcción de bibliotecas de moléculas modeladas tal como se describió anteriormente. Aun así, esto limitará el número de diferentes derivados de nucleótidos a 4, y por lo tanto, pondrá un límite al tamaño de la biblioteca a 4<sup>N</sup> (donde N es el número de subunidades en la molécula modelada). Sin embargo, una persona podría utilizar, por ejemplo, derivados de di-nucleótidos en forma de bloques de construcción para incrementar el tamaño de la biblioteca a 16<sup>N</sup>. La incorporación de di-nucleótidos por la polimerasa ha sido descrita anteriormente en WO 01/16366 A2. La diversidad de la biblioteca puede ser incrementada aún más utilizando la incorporación de tri-nucleótidos o tetra-nucleótidos.

**Ejemplos 84 a 99: La preparación de compuestos intermedios para la síntesis de bloques de construcción de oligonucleótidos**

**Métodos experimentales generales**

5 [0680]



Método 1. Procedimiento General para la protección del N-trifluoroacetilo de aminoácidos

40 [0681] Una solución agitada de aminoácidos (20 mmol) en  $\text{CF}_3\text{COOH}$  (10 mL) a  $0^\circ\text{C}$  fue agregada lentamente ( $\text{CF}_3\text{CO}$ )<sub>2</sub>O (24 mmol). A la mezcla de la reacción se le permitió calentarse lentamente hasta la temperatura del cuarto y se dejó agitándose durante la noche. La mezcla de la reacción fue evaporada hasta secarse. Los productos crudos de naturaleza sólida fueron re - cristalizados a partir de EtOAc/heptano. Los productos crudos de naturaleza líquida fueron purificados por medio de cromatografía de columna de destellos ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=10:1$  o EtOAc/heptano=2:1). La producción fue en general más alta que el 85%.

45 Método 2. Procedimiento General para la protección del N-benciloxicarbonilo y N-viniloxicarbonilo de aminoácidos

50 [0682] A una solución agitada o una suspensión ligera del aminoácido (7.6 milimoles) en  $\text{NaHCO}_3$  sat. (10 mL) se le agregó 2 M de NaOH (aq., 3 mL) y luego una solución debencilcloroformiato o viniloxicloroformiato (8.4 milimoles) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (10 mL). La mezcla de la reacción fue dejada agitándose a la temperatura del cuarto durante la noche. Cuando el TLC indicó que se completó la transformación, a la mezcla de la reacción se la agregó  $\text{H}_2\text{O}$  (90 ml) y el pH fue ajustado a 10 utilizando 2 M de NaOH (aq.). La mezcla de la reacción fue lavada con Et<sub>2</sub>O (3x 50 mL) y el pH fue ajustado a 2-3 utilizando 1 M de HCl (aq.) y luego se extrajo utilizando Et<sub>2</sub>O o  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x100 mL). Las extracciones combinadas fueron secadas ( $\text{MgSO}_4$ ), filtradas y evaporadas hasta secarse para generar a un producto sólido, el cual fue utilizado sin más purificaciones. La producción fue en general más alta que el 70%.

55 Método 3. Procedimiento General para la protección de N-terc-butiloxicarbonilos de aminoácidos

60 [0683] A una suspensión ligera de los aminoácidos (15 mmol) en  $\text{H}_2\text{O}$  (5 ml) y dioxano (5 ml) se le agregó 2M de NaOH (aq, 6 mL). La mezcla fue enfriada y secada a  $0^\circ\text{C}$  (baño de hielo), y se agregó dicarbonato de di-terc-butilo. Se agregó 2 M adicionales de NaOH acuoso (4 ml). La mezcla fue calentada lentamente a la temperatura del cuarto (durante 5 horas), y se dejó agitándose a la temperatura del cuarto durante la noche. A la mezcla de la reacción se le agregó éter dietílico (20 ml) y el pH fue ajustado (desde -10 a -3), utilizando 2 M de HCl (aq.). La fase acuosa fue extraída, utilizando éter dietílico (3x 20 mL). Los extractos combinados fueron secados ( $\text{MgSO}_4$ ), filtrados y evaporados hasta secarse para generar a un producto sólido blanco, que fue utilizado sin más purificaciones. La producción fue comúnmente entre el 60-75%.

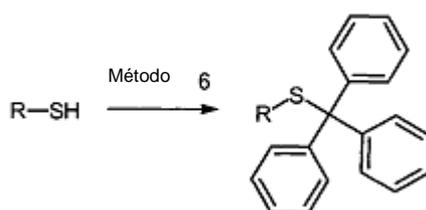
65 Método 4. Procedimiento general para la formación de ésteres de NHM de aminoácidos N- protegidos.

[0684] A una solución agitada del aminoácido N-protegidos (0.5 milimoles) y N-hidroximalleimida (0.62 milimoles) en

THF anhídrido (5 ml) a 0 °C bajo N<sub>2</sub> se le agregó diisopropilcarbodiimida (DIC) (0.64 milimoles) y a la solución se le permitió calentarse lentamente a la temperatura del cuarto y se la dejó agitándose durante la noche. La mezcla de la reacción fue filtrada y las precipitaciones fueron lavadas con un volumen pequeño de EtOAc/heptano=2/1. La filtración fue evaporada hasta casi secarse, diluida con un mínimo de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y sujeta a cromatografía de columna de destellos (EtOAc/heptano=2/1), generando al producto en forma de un sólido blanco en comúnmente 60-70%.

Métodos 5. Procedimiento general para la formación de ésteres de NHM a partir de cloruros de ácido carboxílico.

[0685] A una solución agitada de N-hidroximaleimida (4 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (16 mL) a 0 °C se le agregó lentamente el cloruro de ácido carboxílico (4 mmol). A la mezcla de la reacción se le permitió calentarse lentamente hasta la temperatura del cuarto y luego se dejó agitándose durante la noche. La mezcla de la reacción fue diluida con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (16 mL) y lavada con un 10% de ácido cítrico (aq., 3x 25 mL), NaHCO<sub>3</sub> sat. (aq., 2x 25 mL) y NaCl sat. (aq., 1x 25 mL). La fase orgánica fue secada (MgSO<sub>4</sub>), filtrada y evaporada hasta secarse para generar al producto en forma de cera o líquido con una producción del 40-60%. El producto fue utilizado sin la necesidad de purificación adicional.

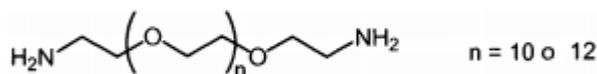


Métodos 6. Procedimiento General para la S-tritilación de mercaptanos

[0686] A una solución del mercaptano (20 mmol) y pirimidina (40 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (75 mL) a la temperatura del cuarto se le agregó tritilcloruro (22 mmol) y la reacción fue dejada agitándose durante la noche. El volumen de la mezcla de la reacción fue reducida a un mínimo y luego sujeta a cromatografía de destellos (SiO<sub>2</sub> pre - tratado con pirimidina antes del empaque de columna) (eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH=10/0.5). El producto fue aislado en aceite o en una cera pegajosa en algunas instancias.

Método 7. Procedimiento General para la O-acilación de 4-hidroxibenzaldehídos.

[0687] A una solución agitada de hidroxibenzaldehído (20 mmol) en DMF seco (10 ml) a 0 °C se le agregó lentamente un cloruro ácido (25 mmol) en éter dietílico (20 ml). La mezcla de la reacción fue agitada a 0 °C durante 15 minutos y a la temperatura del cuarto durante una hora. Se agregó agua (20 ml) y la mezcla de la reacción fue extraída con éter (3x10 mL). Las fases orgánicas combinadas fueron lavadas con agua (2x10 mL), secadas sobre MgSO<sub>4</sub> y el solvente fue removido al vacío. El crudo fue re-disuelto en diclorometano (5 ml) y filtrado a través de una almohadilla de sílice. El solvente fue removido al vacío. La producción fue en general más alta que el 75%.



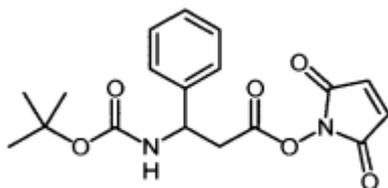
Método 8. Procedimiento general para la formación de diaminopolietilenglicoles

[0688] El polietilenglicol-diol correspondiente (0.8 milimoles), obtenido tal como se describió por Baker et al. J. Org. Chem. (1999), 64, 6870-6873, fue disuelto en THF seco (10 ml). Se agregó cloruro de tosilo (2.4 milimoles) y la mezcla de la reacción fue enfriada con hielo. NaOH (5.5 milimoles) disuelto en agua (2 ml) fue agregado en forma de gotas y la mezcla de la reacción fue agitada a la temperatura del cuarto durante la noche. La mezcla de la reacción fue extraída con éter dietílico (3x5 mL) y las fases orgánicas combinadas fueron lavadas con NaCl (sat., 3x3 mL) y secadas sobre MgSO<sub>4</sub>. El crudo fue re - disuelto en acetonitrilo seco (3 ml) y tratado con NaN<sub>3</sub> (2.8 mmol). La mezcla de la reacción fue calentada a 75 °C durante la noche. El sólido blanco fue filtrado y extraído con acetonitrilo (2x2 mL). Se agregó trifenilfosfina (2.8 milimoles) y agua (2 ml) a las fases orgánicas combinadas y la mezcla de la reacción fue agitada durante la noche. Se agregó IRA-120 H+ (1 g) y la mezcla de la reacción fue agitada durante una hora. Las microesferas fueron filtradas, lavadas con diclorometano (10x3 mL) y el compuesto final fue eluido con 6M de HCl (aq., 10x3 mL). La solución fue evaporada al vacío generando al polietilenglicol de diamino con un 40-50% de producción.

Ejemplo 84: Preparación del éster de 2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-ilo de ácido 3-fenil-3-terc-butoxicarbonilamino-propiónico (XVI)

5 [0689]

10



15 Compuesto XVI

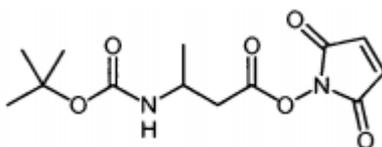
[0690] El compuesto fue preparado en 2 pasos a partir del ácido DL-3-amino-3-fenilpropiónico el cual es disponible comercialmente para el uso del método 3 seguido por el método 4.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 7.28-7.42 (m, 5H(ar)); 6.74 (s, 2H); 5.1-5.3 (m, 2H (NH+CH)); 3.24 (dd, 1H); 3.13 (dd, 1H); 1.46 (s, 9H)

Ejemplo 85: Preparación del éster de 2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-ilo de ácido 3-terc-butoxicarbonilamino-butanóico

[0691]

25



30 Compuesto XVII

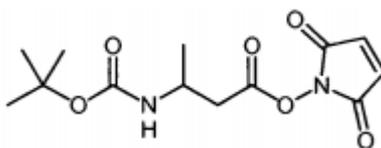
[0692] El compuesto fue preparado en 2 pasos a partir del ácido DL-3-aminobutírico que es disponible comercialmente para el uso de método 3 seguido por el método 4.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 6.80 (s, 2H); 4.83 (br s, 1H(NH)), 4.05-4.15 (m, 1H); 2.8-2.95 (m, 2H); 1.46 (s, 9H); 2.56 (d, 3H).

Ejemplo 86: Preparación de éster de 2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-ilo de ácido 3-terc-butoxicarbonilamino-propiónico

[0693]

40



Compuesto XVIII

[0694] El compuesto fue preparado en 2 pasos a partir de la beta-alanina disponible comercialmente para el uso del método 3 seguido por el método 4.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 6.80 (s, 2H); 5.09 (br s, 1H(NH)); 3.48-3.54 (m, 2H); 2.84 (t, 2H); 1.45 (s, 9H).

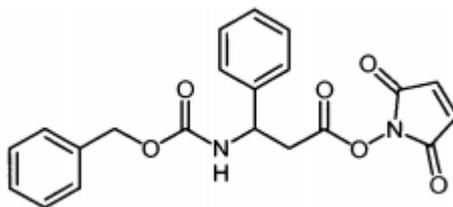
Ejemplo 87: Preparación del éster de 2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-ilo de ácido 3-benciloxycarbonilamino-3-fenil-propiónico

50

Éster de 2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-ilo de ácido 3-benciloxycarbonilamino-3-fenil-propiónico

[0695]

55



60

Compuesto XIX

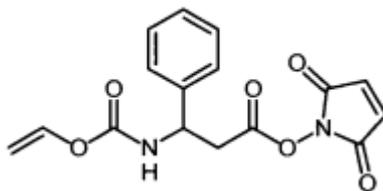
[0696] El compuesto fue preparado en 2 pasos a partir del ácido DL-3-amino-3-fenilpropiónico el cual está disponible comercialmente por el uso del método 2 seguido del método 4.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 7.55-7.20 (m, 10H); 6.75 (s, 2H); 5.55 (br., 1H); 5.35-5.25 (m, 1H); 5.15 (s, 2H); 3.35-3.10 (m, 2H).

Ejemplo 88: Éster de 2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-ilo de ácido 3-fenil-3-viniloxycarbonilamino-propiónico

[0697]

5



10 Compuesto XX

**[0698]** El compuesto fue preparado en 2 pasos a partir del ácido DL-3-amino-3-fenilpropiónico el cual está disponible comercialmente por medio del uso de métodos seguido por el método 4.

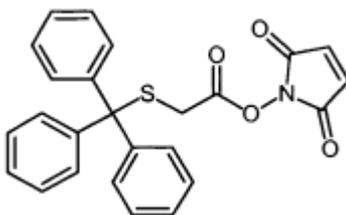
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 7.45-7.30 (m, 5H); 7.20 (dd, 1H); 6.75 (s, 2H); 5.75-5.60 (br., 1H); 5.30 (q, 1H); 4.70 (d, 1H); 4.50

15 (d, 1H); 3.30-3.15 (m, 2H)

Ejemplo 89: Preparación del Ester de 2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-ilo de ácido tritilsulfanil-acético

[0699]

20



25

Compuesto XXI

**[0700]** El compuesto fue preparado en 2 pasos a partir del ácido 2-mercaptoacético el cual está disponible comercialmente por medio del uso del método 6 seguido por el método 4.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 7.45-7.20 (m, 15H); 6.75 (s, 2H); 3.20 (s, 2H)

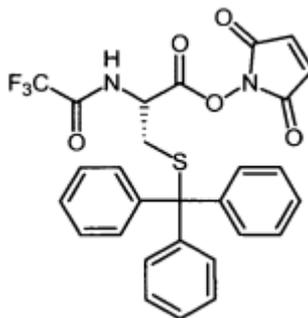
30

Ejemplo 90: Éster de 2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-ilo de ácido (R)-2-(2,2,2-trifluoro-acetilamino)-3-tritilsulfanil-propiónico (XXII)

35

[0701]

40



45

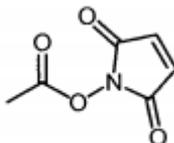
Compuesto XXII

**[0702]** El compuesto fue preparado en 3 pasos a partir de la L-cisteína disponible comercialmente por medio del uso del método 1 seguido por el método 6 y el método 4.

Ejemplo 91: Preparación del éster de 2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-ilo de ácido acético

[0703]

55



60 Compuesto XXIII

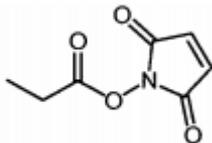
**[0704]** El compuesto fue preparado en un paso a partir del acético cloruro y de la N-hidroximaleimida disponibles comercialmente por medio del uso del método 5.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 6.75 (s, 2H); 2.35 (s, 3H).

65

**Ejemplo 92: Preparación del éster de 2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-ilo de ácido propiónico**  
**[0705]**

5



Compuesto XXIV

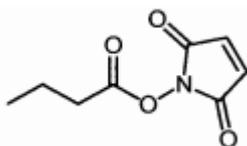
**[0706]** El compuesto fue preparado en un paso a partir del propanoil-cloruro y de la N-hidroxialeimida que son disponibles comercialmente por medio del uso del método 5.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 6.75 (s, 2H); 2.65 (q, 2H); 1.80 (t, 3H).

Ejemplo 93: Preparación del éster de 2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-ilo de ácido butírico

**[0707]**

20



Compuesto XXV

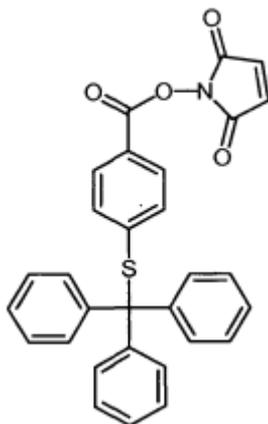
**[0708]** El compuesto fue preparado en un paso a partir del butanoilcloruro y de la N-hidroximaleimida disponibles comercialmente por medio del uso del método 5.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 6.75 (s, 2H); 2.60 (t, 2H); 1.80 (sxt, 2H); 1.05 (t, 3H).

Ejemplo 94: Preparación del éster de 2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-ilo de ácido S-Tritil-4-mercaptobenzóico

**[0709]**

30



35

40

45 Compuesto XXVI

**[0710]** El compuesto fue preparado en 2 pasos a partir del ácido 4-mercaptobenzóico disponible comercialmente por medio de la S-tritilación de acuerdo al método 6 seguido por una esterificación de acuerdo al método 4.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 8.75 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.45-7.20 (m, 15H), 7.05 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.80 (s, 2H).

50 Ejemplo 95: Preparación del tetrahidrocloruro de tetrakis(aminometilo)metano

**[0711]**



55

Compuesto XXVII

**[0712]** El tetrahidrocloruro de tetrakis(aminometil)metano fue preparado por medio de un método ligeramente modificado en comparación al de Fleischer et al. J. Org. Chem. (1971), 36, 3042-44. Se mezcló Pentaeritritol (2.01 g; 14.76 milimoles) con el cloruro de tosilo (14.07 g; 73.81 moles) en piridina seca (50 ml). La mezcla fue agitada durante la noche. La mezcla cruda de la reacción fue transferida a agua (100 ml). Se agregó MeOH (200 mL) y HCl concurrentemente (80 ml) y la precipitación blanca fue filtrada, sacada y lavada con agua (100 ml) y MeOH (200 mL). El LC-MS mostraron al tetratosilato de pentaeritritol. El tetratosilato de pentaeritritol (4.0 gramos, 5.31 mmol) fue disuelto en DMF seco (50 ml) y se agregó  $\text{NaN}_3$  (3.45 g; 53.1 mmol). La mezcla de la reacción fue calentada a 100 °C durante la noche. Se agregó agua (100 ml) y la mezcla de la reacción fue extraída con éter dietílico (3x100 mL). Se agregó THF (300 mililitros) y el éter dietílico fue removido al vacío. Se agregaron trifenilfosfina (6.95 gramos,

60

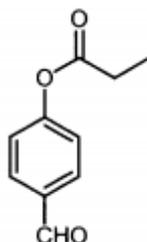
65

26.5 milimoles) y NH<sub>3</sub> concurrentemente. (25 mL) a la solución de THF y la mezcla de la reacción fue agitada a la temperatura del cuarto. Los solventes fueron removidos al vacío, re-disueltos en diclorometano (500 ml) y extraídos con 2M DE HCL (2x150 mL). La fase acuosa fue lavada con diclorometano (3x100 mL) y evaporada al vacío. Se agregó MeOH (20 mL) y el sólido blanco fue filtrado, sacado y lavado con MeOH (2x10 mL). Producción 1.12 gramos (76%).

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): 3.28 (s).

Ejemplo 96: Preparación del éster de 4-formil-fenilo de ácido propiónico

**[0713]**



Compuesto XXVII

**[0714]** El compuesto fue preparado de acuerdo al método 7 a partir de 4-hidroxibenzaldehído el cual está disponible comercialmente.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 10.00 (s, 1H), 7.90 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.65 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.32 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H).

Ejemplo 97: preparación de este de 4-formil-fenilo de ácido butanoico

**[0715]**

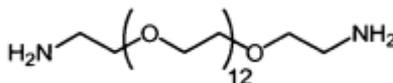


Compuesto XXX

**[0718]** Preparado de acuerdo al método 8 con una producción del 48%. MS-H<sup>+</sup> = 545.2 (esperado MS-H<sup>+</sup> = 544.6)

Ejemplo 99: Preparación de la 3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39-tridecanoxahentetracontan-1,41-diamina

**[0719]**



Compuesto XXXI

(05028) preparado de acuerdo al método 8 con un 40% de producción. MS-H<sup>+</sup> = 633.3 (esperado MS-H = 632.8)

Ejemplo 100: Diseño y pruebas de los enlazadores de oligonucleótidos que porta cajas de compresión

**[0720]** Los experimentos 100-1 a 100-4 fueron realizados para probar la eficiencia de los diferentes diseños de cajas de compresión. La información obtenida está a continuación, y luego sigue un debate acerca de la información.

Materiales.

Amortiguadores.

**[0721]**

Amortiguador A: (100 mM de Hepes pH= 7,5, 1 M de NaCl)

Amortiguador B: (100 mM de NaPO<sub>4</sub> pH=6, 1 M de NaCl)

Amortiguador C: (100 mM de NaBorato pH=9, 1 M de NaCl)

Amortiguador D: (100 mM de NaBorato pH=10, 1 M de NaCl)

Amortiguador E: (500 mM de NaPO<sub>4</sub>pH=7, 1 M de NaCl)

Amortiguador F: (500 mM de NaPO<sub>4</sub>pH=8, 1 M de NaCl)

Recosido de los oligonucleótidos de ADN

**[0722]** Se mezcla a los oligos en el amortiguador relevante y se calienta a 80 °C, luego se enfría a 28 °C (-2 °C/30 segundo).

Marcación de 5' con <sup>32</sup>P.

**[0723]** Se mezcla 200 pmol de oligonucleótidos, 2 µl) 10 x amortiguador de fosforilación (Promega cat#4103), 1 µl de quinasa de polinucleótidos T4 (Promega cat#4103), 1 µl de γ-32P ATP, H2O ad 20 ml. Se incuba a 37 °C, 10-30 minutos.

5 PAGE (electroforesis de gel de poliacrilamidas - polyacrylamide gel electrophoresis).

**[0724]** Las muestras son mezcladas con colorante de formamida 1:1 (98% de formamida, 10 mM de EDTA, pH 8, 0,025 % de Cianol de Xileno, 0,025% de Bromfenol azul), se incuba a 80 °C durante 2 minutos, y se ejecuta una desnaturalización con un 10% de gel de poliacrilamida. Se desarrolla el gel utilizando auto radiografía (Kodak, BioMax film).

10

Bloques de construcción de oligonucleótidos

**[0725]**

15 AH36: 5'-CGACCTCTGGATTGCATCGGTCATGGCTGACTGTCCGTCGAATGTGTCCAGTTACX (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 20) AH37: 5'-  
 ZGTAACTGGACTGTAAGCTGCCTGTCAGTCGGTACTGACCTGTTCGAGCATCCAGCT (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 21) AH51: 5'-  
 ZGTAACACCTGTGTAAGCTGCCTGTCAGTCGGTACTGACCTGTTCGAGCATCCAGCT (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 22) AH38: 5'- AGCTGGATGCTCGACAGGTCCCGATGCAATCCAGAGGTCG (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 23)

25

AH66: 5'-ZTTGTAACTGGACTGTAAGCTGCCTGTCAGTCGGTACTGACCTGTTCGAGCATCCAGCT (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 26) AH65: 5'-  
 CGACCTCTGGATTGCATCGGTCATGGCTGACTGTCCGTCGAATGTTCCAGTTACTTX (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 27)

30

AH67: 5'- ZCATTGACCTGTGTAAGCTGCCTGTCAGTCGGTACTGACCTGTTCGAG-  
 CATCCAGCT (Identificación secuencial número: 24)

35

AH69: 5'- AGZAACACCTGTGTAAGCTGCCTGTCAGTCGGTACTGACCTGTTCGAG-  
 CATCCAGCT (Identificación secuencial número: 25)

40

45

50

55

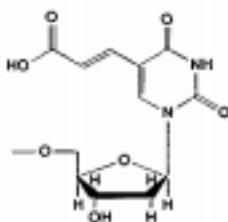
60

65

[0726] Las secuencias de las cajas de compresión están subrayadas.

Modificador carboxi C2 dT

5

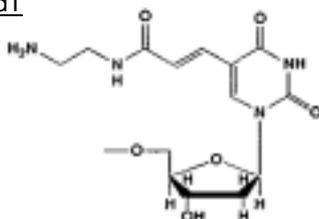


X= Carboxi-dT cat.no. 10-1035-

10

Modificador amino C2 dT

15

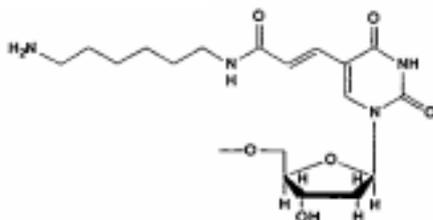


Y= Modificador-amino C2 dT  
10-1037-

20

Modificador amino C6 dT

25



Z= Modificador-amino C6 dT 10-1039-

30

**Experimento 100-1 (figura 56):**

35

**[0727]**

Mezclar 2 µl del amortiguador B, 5 µl de Ah36 (0,4 pmol/ul), 1 µl de Ah37 (2 pmol/ul), 1 µl de Ah38 (2 pmol/ul), 1 µl de H2O.

40

Mezclar 2 µl del amortiguador B, 5 µl de Ah36 (0,4 pmol/ul), 1 µl de Ah37 (2 pmol/ul), 2 µl de H2O.

Recoser al calentar a 80 °C, luego enfriar a 44 °C (-2 °C/30 segundo).

Agregar 1 µl de 100 mM de NHS y 1 µl de 1 M de EDC. Incubar a las temperaturas indicadas (refiérase más adelante) durante 45 minutos, luego agregue 2 µl del amortiguador D. Incubar durante alrededor de 2 horas, y luego analice por medio de electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea.

45

**[0728] Temperaturas de incubación:**

45 °C, 48,2 °C, 53,0 °C, 58,5 °C, 63,1 °C, 65,6 °C

**Experimento 100-2 (figura 57, A y B):**

**[0729]**

mezcle 2 µl del amortiguador B, 1 µl de Ah36 (2 pmol/ul), 1 µl de Ah51 (2 pmol/ul), 1 µl de Ah38(2 pmol/ul), 5 µl de H2O.

Mezcle 2 µl del amortiguador B, 1 µl de Ah36 (2 pmol/ul), 1 µl de Ah51 (2 pmol/ul), 6 µl de H2O

Recosa al calentar a 80 °C, luego enfriar a 35 °C (-2 °C/30 segundos) (para temperaturas de 1 a 6) o caliente a 80 °C, y luego enfríe a 15 °C (-2 °C/30 segundos) (para temperaturas del 7 al 12).

55

Agregue 1 µl de 100 mM de NHS y 1 µl de 1 M de EDC. Incúbese a las temperaturas indicadas (refiérase más adelante) durante una hora, luego agregue 2 µl del amortiguador D. Se incuba durante 1 hora, y se analiza entonces con una electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea, tal como se describió anteriormente.

**[0730] Temperaturas de incubación:**

1) 34,9°C, 2) 36,3°C, 3) 40,3°C, 4) 45,7°C, 5) 51,0°C, 6) 55,77, 7) 14,9°C, 8) 17,8°C,9)22,7°C, 10)28,3°C, 11)31,0°C, 12)36°C

Mezclar 2 µl del amortiguador B, 0,5 µl de Ah36 (2 pmol/ul), 1 µl de Ah51 (2 pmol/ul), 1 µl de Ah38(2 pmol/ul), 5,5 µl de H2O

Mezclar 2 µl del amortiguador B, 0,5 µl de Ah36 (2 pmol/ul), 1 µl de Ah51 (2 pmol/ul), 6,5 µl de H2O

Recoser al calentar a 80 °C luego enfriar a 5 °C (-2 °C/30 segundos).

65

Agregar 1 µl de 100 mM de NHS y 1 µl de 1 M de EDC. Incubar a diferentes temperaturas (refiérase más adelante) durante una hora, luego agregar 2 µl del amortiguador D. Incubar durante una hora, y luego analizar por medio de electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea.

5 **[0731]** Temperaturas de incubación:

1) 5,9°C, 2) 9,9°C, 3) 12,6°C, 4) 18,3°C, 5) 23,3°C, 6) 27,9°C 7) 35,6°C, 8) 45,9°C

**Experimento 100-3 (figura 58, A y B).**

10 **[0732]** Mezclar 2 µl del amortiguador A, un micro litro del oligo 1 relevante (2pmol/micro litro), un micro litro del oligo 2 relevante (10 pmol/microlitros), un micro litro del oligo 3 relevante (10pmol/microlitros), 5 µl de H<sub>2</sub>O. (Refiérase a la tabla a continuación). Recosa tal como se describió anteriormente.

15 **[0733]** Agregue un micro litro de 100 mM de NHS y un micro litro de 1 M de EDC. Incúbese a diferentes temperaturas 1) 7,7°C, 2) 15,4°C, 3) 21,0°C 4) 26,2°C durante alrededor de 2 horas, y 5) 10 °C durante un segundo, luego 35 °C durante un segundo-repita esto 99 veces. Analice por medio de electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea.

Experimento	Oligo 1 ( <sup>32</sup> P)	Oligo 2	Oligo 3
100-3-1	Ah36	Ninguno	Ninguno
100-3-2	Ah36	Ninguno	Ninguno
100-3-3	Ah36	Ah51	Ah38
100-3-4	Ah36	Ah51	Ninguno
100-3-5	Ah36	Ah67	Ah38
100-3-6	Ah36	Ah67	Ninguno
100-3-7	Ah36	Ah69	Ah38
100-3-8	Ah36	Ah69	Ninguno

**Experimento 100-4 (figura 59).**

55 **[0734]** Mezclar 2.5 microlitros del amortiguador A, un microlitro del oligo relevante 1 (2 pmol/microlitros, un micro litro del oligo relevante 2 (10 pmol/microlitros), un micro litro del oligo relevante 3 (10 pmol/microlitros), 4.5 microlitros de H<sub>2</sub>O. (Refiérase a la tabla a continuación). Recosa al calentar a 80 °C y luego enfriar a 30 °C o a 55 °C. Agregue un micro litro de 100 mM de NHS y un micro litro de 1 M de EDC. Incúbese a 30 °C o a 55 °C. Entonces analice por medio de electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea.

60

65

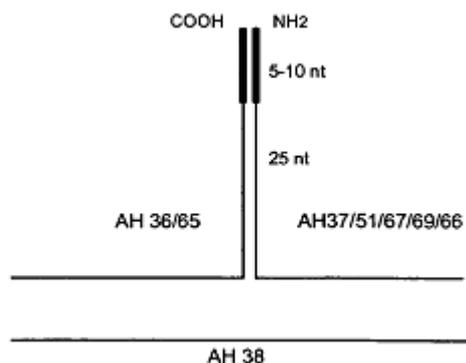
Experimento	Oligo 1 (marcado como <sup>32</sup> P)	Oligo 2	Oligo 3
100-4-1	Ah36	Ah37	Ah38
100-4-2	Ah36	Ah37	Ninguno
100-4-3	Ah65	Ah66	Ah38
100-4-4	Ah65	Ah66	Ninguno
100-4-5	Ah36	Ah66	Ah38
100-4-6	Ah36	Ah66	Ninguno
100-4-7	Ah65	Ah37	Ah38
100-4-8	Ah65	Ah37	Ninguno

**Debate de los resultados**

[0735] Se examinó la eficiencia de los enlaces transversales utilizando oligos que portan a grupos reactivos (aminos o ácidos carboxílicos) en los casos en que el enlazador que conecta al grupo reactivo y a la región de recosido era de aproximadamente 25 nucleótidos.

[0736] En un experimento, los oligonucleótidos Ah36 (que portan a un ácido carboxílico) y Ah67 (que portan una amina) fueron utilizados. La plantilla utilizada (Ah38) recose los 2 oligonucleótidos que están inmediatamente adyacentes, es decir, con una separación de cero parejas base. Bajo las condiciones del experimento, se observó menos del 5% de eficiencia de enlaces transversales, y únicamente a la temperatura más alta probada (figura 58, Ay B, líneas 5).

[0737] Para mejorar la eficiencia de enlaces transversales, introdujimos una secuencia denominada caja de compresión en el extremo 5' y 3' de los oligos Ah67 y Ah36, respectivamente, la misma terminal que porta a los grupos reactivos. Las cajas de compresión son secuencias complementarias, y, por lo tanto, podrían traer a los grupos reactivos de los 2 oligos a una proximidad cercana. Las 2 longitudes diferentes de las cajas de compresión fueron probadas, específicamente una caja de compresión de 10' mer (Ah37/Ah36 que forma un ADN dúplex de 10 parejas base) y una caja de compresión de 5' mer (Ah36/51 que forma un ADN dúplex de 5 parejas base). Refiérase a la figura a continuación.



[0738] Además, diferentes diseños de cajas de compresión fueron probados, por ejemplo, oligos en los cuales el grupo reactivo está adherido en una forma inmediatamente adyacente a la caja de compresión (Ah36, Ah37 y Ah36/Ah51), o nucleótidos colocados corriente arriba desde la caja de compresión (Ah65/Ah66), o colocados en el medio de la caja de compresión (Ah67).

[0739] Al principio probamos el efecto de la caja de compresión de 5' mer en relación a la eficiencia de enlaces transversales. Tal como puede observarse, la caja de compresión de 5' mer mejora dramáticamente la eficiencia de los enlaces transversales (figura 58, A y B, compara a las líneas 3 y a las líneas 5). Tome en cuenta que la plantilla es requerida absolutamente para los enlaces transversales en todas las temperaturas probadas. La eficiencia más alta de enlaces transversales se obtiene cuando la temperatura entra en 99 ciclos arriba y abajo entre 10 °C y 35 °C (figura 58B). Una eficiencia alta también es obtenida cuando la temperatura es mantenida constante a 21 °C o a 26 °C (figura 58A y B, línea 3). La eficiencia de los enlaces transversales no mejora a temperaturas que van por sobre los 26 °C (figura 57, A y B).

[0740] Después de eso probamos la eficiencia de enlaces transversales en el formato de caja de compresión de 10' mer. Los oligos Ah36 y Ah37 fueron recosidos a la plantilla Ah38, y la eficiencia de enlaces transversales fue examinada a varias temperaturas. Se observó un sorprendente alto nivel de enlaces transversales con la ausencia de la plantilla (figura 55, 45 °C y 48. 2 °C). Sin embargo, a temperaturas por sobre los 58.5 °C, no se observó enlaces transversales en la ausencia de la plantilla.

[0741] A continuación, las ubicaciones diferentes de los grupos reactivos en relación a la caja de compresión fueron probadas. Tal como se muestra en la figura 58, A y B, líneas 7, la eficiencia de los enlaces transversales disminuye dramáticamente cuando uno de los 2 grupos reactivos está ubicado en el medio de la caja de compresión (es decir, el grupo reactivo está adherido a un nucleótido involucrados en la formación de hélices dobles de ADN; Ah67).

[0742] La ubicación de los grupos reactivos en relación a la caja de compresión también fue probada en el contexto de la caja de compresión de 10' mer. En este contexto, cuando ambos grupos reactivos son separados de la caja de compresión por 2 nucleótidos (Ah65, Ah66), la eficiencia de enlaces transversales se reduce ligeramente (figura 59, comparar las líneas 1 y 3). La eficiencia de enlaces transversales no cambia dramáticamente cuando se prueban a diferentes combinaciones de Ah65, Ah66, Ah36 y Ah37 (es decir, cuando los grupos reactivos son ubicados inmediatamente al lado de la caja de compresión, o 2 nucleótidos corriente arriba). Debe tomarse en cuenta que la plantilla no es absolutamente requerida en todas las temperaturas en el contexto de la caja de compresión del 10' mer. Esta independencia del plan día es particularmente pronunciada a temperaturas más bajas (por ejemplo, la figura 59, 30 °C).

#### **Ejemplos 101 al 104: Métodos generales para la preparación de bloques de construcción de oligonucleótidos**

Ejemplo 101: Procedimiento para transformar a oligonucleótidos que comprenden a un ácido carboxílico a un enlazador que termina con un amino o con un aminometilo

[0743] Los siguientes oligos que contienen a una base nitrogenada modificada, con una partícula de ácido carboxílico, fueron sintetizados utilizando el método convencional de fosforamiditas:

A: 5'-GCT ACT GGC XTC GGT (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 28)

B: 5'-TCA CTX GCA GAC AGC (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 29)

C: 5'-CGA CCT CTG GAT TGC ATC GGT CAT GGC TGA CTG TCC GTC GAA

TGT GTC CAG TTA CX (Identificación secuencial número: 20)

D: 5'-CTG GTA ACG CGG ATC GAC CTT CAT GGC TGA CTG TCC GTC GAA

TGT GTC CAG TTA CX (Identificación secuencial número: 30)

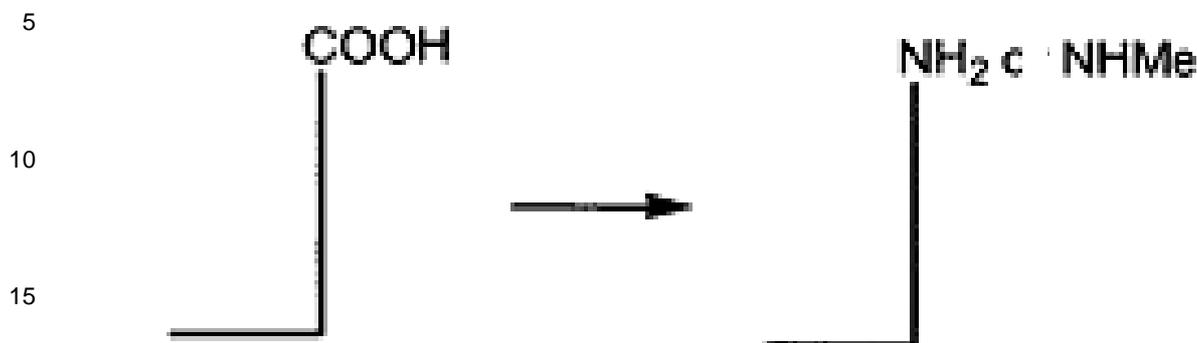
E: 5'- ACG ACT ACG TTC AGG CAA GAT CAT GGC TGA CTG TCC GTC GAA

TGT GTC CAG TTA CX (Identificación secuencial número: 31)

[0744] X fue incorporada utilizando a la fosforamidita de carboxi-dT la cuales están disponibles comercialmente (10-1035-90 de Glen Research). Las bases nitrogenadas subrayadas representan la región de la caja de compresión.

#### **Representación esquemática de la transformación**

[0745]



20

25

[0746] Un oligo (20 pmol) fue mezclado con un compuesto diamino (20 µl de 0.1 M de solución), amortiguador de sodiofosfato (15 µl de 100 mM de solución, pH = 6), NHS (5 µl de 100 mM de solución) y EDC (5 µl de 1M de una solución preparada recientemente). A la mezcla se le dejó que repose a 30 °C durante 45 minutos y fue tratada con borato de sodio (20 µl de 100 mM de solución, pH = 10) y se dejó a 30 °C durante 35 minutos adicionales. El oligo fue purificado por medio de precipitaciones de EtOH convencionales. Los productos fueron marcados en el extremo con <sup>32</sup>P y la pureza fue analizada por medio de PAGE. En todos los casos, no se logró ningún oligo inicial y apareció una nueva banda, que emigró más lentamente en el gel.

[0747] Ejemplos de compuestos de aminos utilizados: XXX, XXXI y la N,N'-dimetiletilendiamina la cual está disponible comercialmente (D15,780-5 from Sigma-Aldrich).

Ejemplo 102: Método para transformar un ácido carboxílico que contiene oligonucleótidos a un bloque de construcción portador de trisamina

[0748] Los siguientes oligos que contienen a una base nitrogenada modificada, con una partícula de ácido carboxílico, fueron sintetizados utilizando el método convencional de fosoramidita:

F: 5'-GAC CTG TCG AGC ATC CAG CTG TCC ACA ATG X (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 32)

G: 5'-GAC CTG TCG AGC ATC CAG CTT CAT GGG AAT TCC TCG TCC ACA

ATG X (Identificación secuencial número: 33)

H: 5'-GAC CTG TCG AGC ATC CAG CTT CAT GGG AAT TCC TCG TCC ACA

ATG XT (Identificación secuencial número: 34)

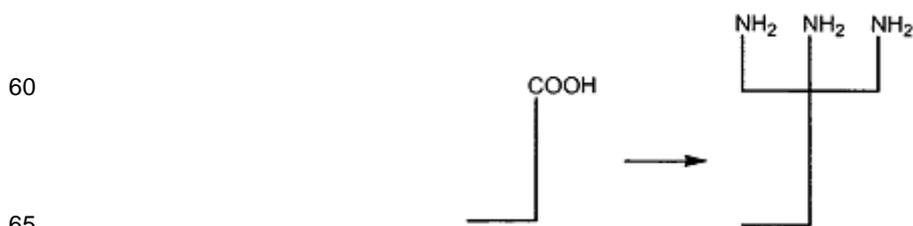
I: 5'-XGT AAC TGG AGG GTA AGC TCA TCC GAA TTC GGT ACT GAC CTG TCG

AGC ATC CAG CT (Identificación secuencial número: 35)

X fue incorporada utilizando una fosoramidita de carboxi-dT la cual está disponible comercialmente (10-1035-90 de Glen research). Las bases nitrogenadas subrayadas representan a la región de compresión.

Representación esquemática de la reacción:

[0749]



**[0750]** Un oligo que contiene una base nitrogenada modificada con una partícula de ácido carboxílico (uno nmol) fue mezclada con agua (100 µl), amortiguador hepes (40 µl de 200 mM, pH = 7.5), NHS (20 µl de una 100 mM de una solución), EDC (20 µl de 100 M de una solución preparada recientemente) y la tetraamina (XXVII) (20 µl de 100 mM de la solución). La mezcla de la reacción fue dejada a que repose durante la noche a la temperatura del cuarto. El volumen fue reducido a 60 µl por medio de evaporación al vacío. El oligo puro fue obtenido por medio de la adición de NH<sub>3</sub> conc. (20 uL) seguido por una purificación HPLC. Fue posible aislar el pico después de aproximadamente 6 minutos utilizando al siguiente gradiente: durante los minutos 0-3 100% de A entonces 15% de A y 85% de B durante los minutos 3-10 luego 100% de B durante los minutos 10-15 luego 100% de A durante los minutos 15-20. A = 2% de acetonitrilo en 10 mM de TEAA y B = 80% de acetonitrilo en 10 mM de TESS.

**[0751]** Después de una purificación HPLC 2-3 pmol fueron marcados en el extremo con <sup>32</sup>P y la pureza fue analizada por medio de gel de PAGE (refiérase la figura 60). El gel de PAGE mostró la adherencia de la tetraamina (XXVI) a un oligo que contenía una base nitrogenada modificada con una partícula de ácido carboxílico.

Línea 1: Oligo 1 referencial F.

Línea 2: Trisamina purificada por HPLC producto del oligo F.

Línea 3: Oligo referencial G.

Línea 4: Trisamina purificada por HPLC producto del oligo G.

Línea 5: Oligo referencial H.

Línea 6: Trisamina purificada por HPLC producto del oligo H.

Ejemplo 103: Procedimiento general para adherir a una entidad funcional a un oligo tio.

**[0752]** el siguiente oligo que contiene a una base nitrogenada modificada, con una partícula tio protegida por S-trifenilmetilo, fue sintetizada utilizando el método convencional de fosforamidita:

**J: 5'-WCA TTG ACC TGT GTA AGC BTG CCT GTC AGT CGG TAC TCG ACC**

**TCT GGA TTG CAT CGG** | (Identificación secuencial número: 36)

**K: 5'-WCA TTG ACC TGT CTG CCB TGT CAG TCG GTA CTG TGG TAA CGC**

**GGA TCG ACC T** (Identificación secuencial número: 37)

**L: 5'-WCA TTG ACC TGA ACC ATG BTA AGC TGC CTG TCA GTC GGT ACT**

**ACG ACT ACG TTC AGG CAA GA** (Identificación secuencial número: 38)

**M: 5'-WCA TTG ACC TGA ACC ATG TBA AGC TGC CTG TCA GTC GGT ACT**

**TCA AGG ATC CAC GTG ACC AG** | (Identificación secuencial número: 39)

**[0753]** W fue incorporada utilizando la fosforamidita codificadora de tiol que disponible comercialmente (10-1926-90 de Glen research). B es una biotina interna incorporada utilizando a la fosforamidita que disponible comercialmente (10-1953-95 de Glen research). Las bases nitrogenadas que están subrayadas y que son cursivas indican la región del compresor.

**[0754]** El oligo de tio protegido por S-trifenilmetilo (10 nmol) fue evaporado al vacío y re - suspendido en un amortiguador de TEAA (200 µl de 0.1 M de solución, pH = 6.4). Se agregó AgNO<sub>3</sub> (30 uL de 1 M de solución) y la mezcla fue dejada a la temperatura del cuarto durante 1-2 horas. Se agregó DTT (36 µl de 1M de solución) y se dejó durante 5-10 minutos. La mezcla de la reacción fue atemperada (20.000 G durante 20 minutos) y el sobrenadante fue recaudado. El sólido fue extraído con un amortiguador adicional de TEAA (C microlitros de 0.1 M de solución, pH = 6.4). El oligo de tio puro fue obtenido por medio de la precipitación convencional de EtOH.

**Representación esquemática de la reacción:**

[0755]



10 [0756] El oligo de tio (1 nmol) fue secado al vacío y tratado con un bloque de construcción comprendido de la entidad funcional (05087) en dimetilformamida (50  $\mu$ l de 0.1 M de solución) y dejado durante la noche a la temperatura del cuarto. El oligo de tio fue atemperado (20.000 G durante 10 minutos) y el sobrenadante fue removido. Se agregó dimetilformamida (1 ml) y el oligo tio cargado fue re - suspendido en un amortiguador de TEAA (25  $\mu$ l de 0.1 M de solución, pH = 6.4) y analizado por medio de HPLC.

15 Ejemplos de bloques de construcción utilizados: XXVI, XVI, XVII, XVIII, XXIII, XXIV, XXV)

Ejemplo 104: Procedimiento general para la adherencia de una entidad funcional a un oligo que termina en amino o en aminometilo.

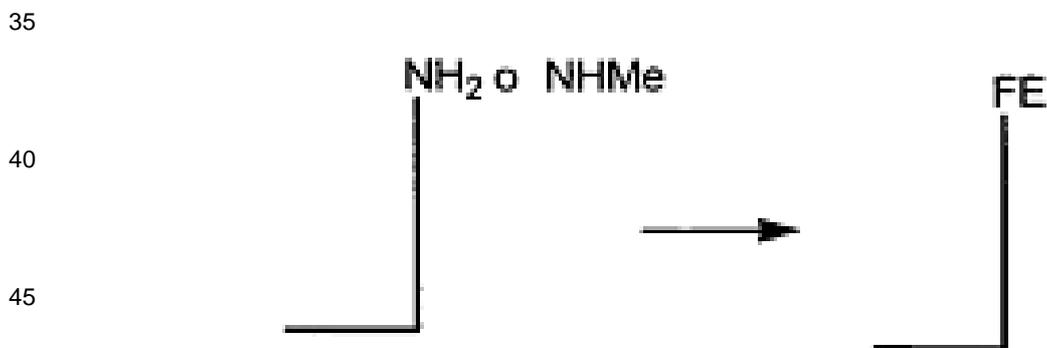
20 [0757] El siguiente oligo contenía una base nitrogenada modificada, con un grupo amino fue sintetizado, utilizando el método convencional de fosforamidita:

N: 5'-ZGT AAC ACC TGT GTA AGC TGC CTG TCA GTC GGT ACT GAC CTG  
TCG AGC ATC CAG CT (SEQ ID NO:40)

25 [0758] Z contenía a la base nitrogenada (Identificación secuencial número: 40) incorporada utilizando la fosforamidita C6 dT codificadora de aminos (10-1036).

30 [0759] Además, los oligos C-E fueron transformados en el correspondiente oligo que termina en aminometilo, tal como se describió anteriormente.

[0760] Los oligos fueron utilizados en el siguiente experimento representado por el esquema a continuación:



50 [0761] Un oligo de amino o de aminometilo (3 pmol) fue mezclado con un amortiguador de fosfato (3  $\mu$ l de 0.1 M de solución, pH = 6) y NaBH<sub>3</sub>CN (3  $\mu$ l de 1 M de solución en MeOH). Un bloque de construcción comprendido de la entidad funcional (3  $\mu$ l de 1 M de solución en MeOH) fue agregado en la mezcla y se dejó durante la noche a la temperatura del cuarto. La formación de producto fue analizada por un gel de PAGE (refiérase a la figura 61).

55 [0762] Ejemplos de los bloques de construcción utilizados: XXVIII, XXIX, y el 4-acetoxibenzaldehído (24,260-8 de Sigma-Aldrich).

[0763] La figura 60 muestra un análisis de PAGE de la carga de un oligo que contiene a una base nitrogenada modificada con un grupo amino (comp. XXIV).

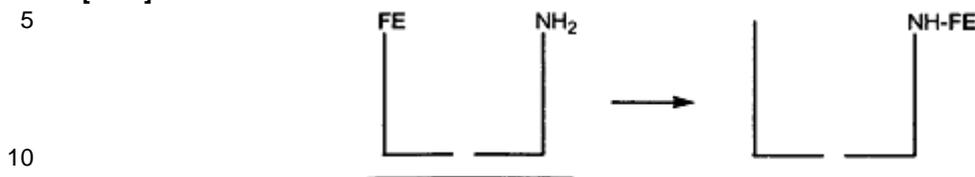
60 [0764] La línea 1 muestra el oligo de amino referencial (N).

[0765] La línea 2 muestra el oligo de amino (N) después de la carga con un bloque de construcción que comprende a la entidad funcional.

65 [0766] La línea 3 muestra la remoción de la entidad funcional, adherida en la línea 2, por medio del tratamiento con pH = 11 durante una hora.

Ejemplo 105: Procedimiento general para la síntesis modelada de un compuesto orgánico, cuando el portador y el sustituyente son codificados por la plantilla:

[0767]



Plantilla

15 [0768] El oligo plantilla (1 nmol) fue mezclado con un oligo de tior (L o M) cargado con una entidad funcional (XXIII o XVII, respectivamente, 1 nmol) y un oligo de amino o en un amortiguador de hepes (20  $\mu$ l de 100 mM de HEPES y 1M de una solución de NaCl, pH = 7.5) y agua (agregado a un volumen final de 100  $\mu$ l). Los oligos fueron recosidos a la plantilla al calentarse a 50  $^{\circ}$ C y enfriarse (-2  $^{\circ}$ C/30 segundos) a 30  $^{\circ}$ C. Se dejó a la mezcla para que repose durante la noche en una temperatura fluctuante (10  $^{\circ}$ C durante un segundo luego 35  $^{\circ}$ C durante un segundo). El

20 complejo de oligos fue adherido a estreptavidina por medio de la adición de microesferas de estreptavidina (C microlitros, pre lavados con 2x1 mL de 100 mM de amortiguador de hepes y 1 M de NaCl, pH=7.5). Las microesferas fueron lavadas con un amortiguador de hepes (1 ml). El oligo de aminos fue separado del complejo enlazado de estreptavidina al agregarse agua (200  $\mu$ l) seguido de un calentamiento de 70  $^{\circ}$ C durante un minuto. El agua fue transferida y evaporada al vacío, re - suspendida en un amortiguador de TEAA (45  $\mu$ l de 0.1 M de solución) y la

25 formación del producto fue analizada por medio de HPLC (refiérase la figura 62).

[0769] La figura 62 muestra la transferencia de una entidad funcional a un oligo que contiene una base nitrogenada modificada con un grupo amino.

30 A) El cromatograma superior muestra al oligo de amino referencial O: 5'-GAC CTG TCG AGC ATC CAG CTT CAT GGC TGA GTC CAC AAT GZ (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 41). Z contiene a la base nitrogenada modificada con un grupo amino, incorporada utilizando a la fosoramidita C6 dT codificadora de aminos que está disponible comercialmente (10-1039-90 de Glen research).

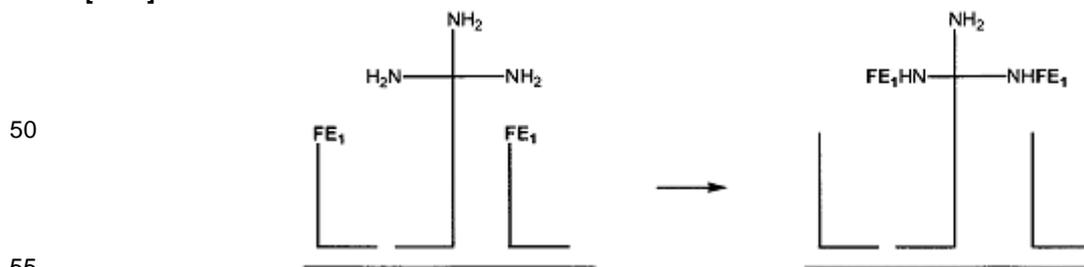
35 B) El cromatograma del medio muestra al oligo O de aminos purificado por la estreptavidina después una transferencia parcial de una entidad funcional (XXIII).

C) El cromatograma de la parte inferior muestra al oligo O de aminos purificado por la estreptavidina después de una transferencia completa de una entidad funcional más lipófila (XVII). El siguiente gradiente fue utilizado: Durante los minutos 0-3 un 100% de A luego un 15% de A y un 85% de B durante los minutos 3-10.

40 [0770] El experimento en el cual el oligo plantilla fue omitido no mostró ninguna formación de producto modelado. Los resultados indican que la eficiencia de la síntesis modelada fue de alrededor de un 80-100%. La razón para una eficiencia menor al 100% fue probablemente debido a la separación hidrolítica de la entidad funcional.

Ejemplo 106: Procedimiento general para la síntesis modelada de una molécula portadora, en donde el portador y 2 sustituyentes idénticos son codificados por la plantilla

[0771]



Plantilla

60 [0772] El oligo plantilla (1 nmol) fue mezclado con 2 oligos de tios (K y L) cargados con la misma entidad funcional (XXVI; 1 nmol) y el oligo H de trisamina (1 nmol) en un amortiguador de hepes (20  $\mu$ l de 100 mM de hepes y 1 M de una solución de NaCl, pH = 7.5) y agua (agregada a un volumen final de 100  $\mu$ l). Los oligos fueron recosidos a la plantilla al calentarse a 50  $^{\circ}$ C y enfriarse (-2  $^{\circ}$ C/30 segundos) a 30  $^{\circ}$ C. La mezcla fue dejada durante la noche con una temperatura fluctuante (10  $^{\circ}$ C durante un segundo y entonces 35  $^{\circ}$ C durante un segundo). El complejo de oligos fue adherido a estreptavidina agregando microesferas de estreptavidina (100  $\mu$ l, pre - lavados con 2x1 mL de 100 mM de un amortiguador de hepes y 1 M de NaCl, pH = 7.5). Las microesferas fueron lavadas con un amortiguador de hepes (1  $\mu$ l). El oligo H portador de trisamina fue separado del complejo enlazado a estreptavidina por medio de

65

la adición de agua (200  $\mu$ l) seguido por un calentamiento a 70 °C. El agua fue transferida re - suspendida en un amortiguador de TEAA (45  $\mu$ l de 0.1 M de solución) y la formación del producto fue analizada por medio de HPLC (refiérase la figura 63).

5 **[0773]** El cromatograma de HPLC muestra la transferencia de 2 entidades funcionales a un oligo portador con 3 grupos aminos.

A) El cromatograma superior muestra al oligo portador referencial G.

10 B) El cromatograma inferior muestra al oligo portador G purificado por medio de estreptavidina después de una transferencia parcial de una (pico a los 7.94 minutos) y 2 (pico a los 10.76 minutos) entidades funcionales idénticas (XXVI). El siguiente gradiente fue utilizado: Durante los minutos 0-3 100% de A entonces 15% de A y 85% de B durante los minutos 3-10 entonces 100% de B durante los minutos 10-15. A = 2% de acetonitrilo en 10 mM de TEAA y B = 80% de acetonitrilo en 10 mM de TEAA.

15 **[0774]** Debido a la naturaleza lipófila de las entidades funcionales se observó un tiempo más largo de retención, en el cromatograma de HPLC, de la molécula portada con 2 entidades funcionales en comparación a una entidad funcional. La eficiencia de la síntesis modelada de la molécula portada con las 2 entidades funcionales idénticas (XXVI) fue de alrededor del 25% (pico a los 10.76 minutos en la figura 63).

20 Ejemplo 107: Procedimiento para la síntesis modelada de una molécula portada, donde el portador y los 3 sustituyentes son codificados por la plantilla

**[0775]**



35 **[0776] Procedimiento A (caja de compresión de 5-mer):** El oligo plantilla (1 nmol) fue mezclado con 3 oligos de tio (J-L) cargados con 3 diferentes entidades funcionales (XVI, XVII y XVIII, respectivamente; 1 nmol) y el oligo H portador de trisamina (1 nmol) en un amortiguador de hepes (20  $\mu$ l de 100 mM de hepes y 1 M de una solución de NaCl, pH = 7.5) y agua (agregada a un volumen final de 100  $\mu$ l). Los oligos fueron recosidos a la plantilla al calentarse a 50 °C y enfriarse (-2 °C/30 segundos) a 30 °C. La mezcla fue dejada entonces durante la noche a una temperatura fluctuante (10 °C durante un segundo y entonces 35 °C durante un segundo). El complejo oligo fue adherido a estreptavidina al agregarse microesferas de estreptavidina (100  $\mu$ l, pre - lavadas con 2x1 mL de 100 mM de amortiguador de hepes y 1M de NaCl pH=7.5). Las microesferas fueron lavadas con un amortiguador de hepes (un micro litro). El oligo portador de trisamina fue separado del complejo enlazado a estreptavidina al agregarse agua (200  $\mu$ l) seguido de un calentamiento a 70 °C. El agua fue transferida y evaporada al vacío, re - suspendida en el amortiguador de TEAA (45  $\mu$ l de 0.1 M de solución) y la formación de la molécula codificada fue identificada por HPLC.

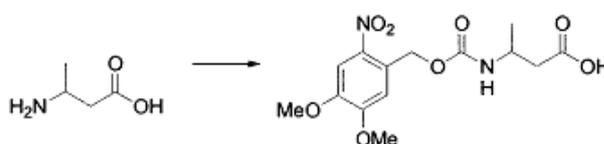
50 **[0777] Procedimiento B (caja compresora de 9-mer):** El oligo plantilla (15 pmol) fue mezclado con 3 oligos de metilamino (C-E) cargados con 3 entidades funcionales diferentes (XXVII, XXIX y 4-acetoxibenzaldehído, respectivamente; 20 pmol) y un oligo I portador de trisamina marcado en el extremo con P<sup>32</sup> (15 pmol) en un amortiguador de hepes (6.5 microlitros de 100 mM de hepes en 1 M de una solución de NaCl, pH = 7.5). La mezcla fue calentada a 58.5 °C y dejada a 58.5 °C durante 5 días. La formación de la molécula codificada fue identificada por PAGE.

55 Ejemplo 108 (modelo): Descripción de la preparación de una biblioteca de 3-mer  $\beta$ -aminoácidos

**A) Síntesis de los bloques de construcción de  $\beta$ -aminoácidos**

60 **[0778]** Protección de la terminal N: el grupo<sup>1</sup> Nvoc (3,6-dimetoxi-6-nitrobenzoxicarbonilo) fue utilizado como un grupo protector de N foto-separable y fue introducido a un  $\beta$ -aminoácido de acuerdo al siguiente método:

60

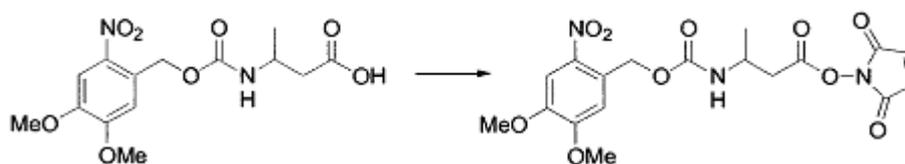


<sup>1</sup>Burgess et al. J. Org. Chem. (1997), 62, 5165-68, Alvarez et al. J. Org. Chem. (1999), 64, 6319-28 y Pedersen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (1998), 95, 10523-28.

[0779] Se mezcló a ácido 3-amino-butírico (147 mg, 1.43 milimoles) con agua (10 ml), dioxano (10 ml) y 2 M de NaOH (10 mL). La mezcla fue enfriada a 0 °C y tratada con Nvoc-Cl (1.58 mmol). Se agregaron 2 M de NaOH en porciones pequeñas (8 x 1.25 mL) durante 75 minutos. El baño enfriador fue removido y la mezcla de la reacción fue dejada a la temperatura del cuarto durante la noche. Se agregó agua (30 ml) y la mezcla fue filtrada. La fase acuosa fue ajustada a pH = 4 con 2 M de HCl (aq.) y extraída con éter dietílico (3 x 50 mL). El sólido fue disuelto en agua (50 ml) y éter dietílico (50 ml). Las fases orgánicas combinadas fueron secadas sobre MgSO<sub>4</sub> y evaporadas al vacío generando 176 mg (36%) de ácido 3-(4,5-dimetoxi-2-nitro-benciloxycarbonilamino)-butírico puro. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 7.72 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 5.51 (s, 2H), 5.40-5.30 (brs, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 2.60 (d, 2H), 1.31 (d, 3H).

[0780] La β-alanine, el ácido cis-2-amino-1-ciclohexanocarboxílico, el ácido carboxílico de trans-2-Amino-1-ciclohexano, el ácido cis-2-amino-1-ciclopentanocarboxílico, el ácido cis-2-amino-4-ciclohexeno-1-carboxílico, el ácido trans-2-amino-4-ciclohexeno-1-carboxílico, el ácido butírico de 3-amino-4,4,4-trifluoro, el ácido 3-amino-4-metilpentanóico, el monohidrato del ácido DL-3-aminoisobutírico, el ácido 3-amino-3-fenilpropiónico, el clorhidrato del ácido 2-fluoro-3-aminopropiónico son protegidos similarmente.

[0781] **Activación de la terminal C:** El éster de NHM (N-hidroximaleimida) del β-aminoácido protegido por N-Nvoc fue utilizado y preparado de acuerdo al siguiente método, ejemplificado utilizando al ácido 3-(4,5-dimetoxi-2-nitro-benciloxycarbonilamino)-3-fenil-propiónico:

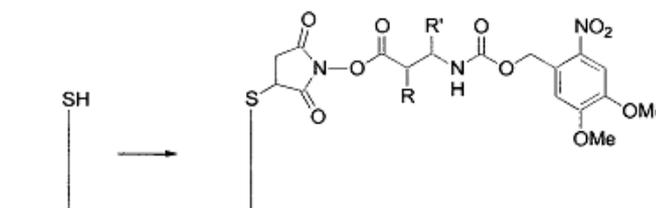


[0782] El ácido 3-(4,5-dimetoxi-2-nitro-benciloxycarbonilamino)-butírico (418 mg, 1.22 milimoles) fue disuelto en THF (10 ml), se agregó N-hidroximaleimida (1.22 mmol) y la mezcla fue enfriada a 0 °C. La dicitlohexilcarbodiimida (1.22 milimoles) fue agregada y la mezcla de la reacción fue dejada durante la noche a la temperatura del cuarto. El solvente fue removido por medio de evaporación al vacío y el producto fue aislado por medio de purificación de columna sílice utilizando EtOAc-heptano (1:4 luego 1:2 luego 1:1) en calidad de eluyente. Producción 219 mg (42%) de éster de 2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-ilo de ácido 3-(4,5-dimetoxi-2-nitro-benciloxycarbonilamino)-butírico puro. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 7.73 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.81 (s, 2H), 5.55 (dd, 2H), 5.30-5.20 (br s, 1H), 4.25 (m, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 2.86 (m, 2H), 1.39 (d, 3H).

[0783] Los análogos protegidos por N-Nvoc de β-Alanina, ácido cis-2-amino-1-ciclohexanocarboxílico, ácido trans-2-Amino-1-ciclohexanocarboxílico, ácido cis-2-amino-1-ciclopentanocarboxílico, ácido cis-2-amino-4-ciclohexeno-1-carboxílico, ácido trans-2-amino-4-ciclohexeno-1-carboxílico, ácido 3-amino-4,4,4-trifluorobutírico, ácido 3-amino-4-metilpentanóico, monohidrato de ácido DL-3-aminoisobutírico, ácido 3-amino-3-fenilpropiónico, clorhidrato de ácido 2-fluoro-3-aminopropiónico son activados similarmente.

## B) Preparación de oligos de bloques de construcción:

[0784]



[0785] Un oligo de tio (1 nmol) es tratado con éster de 2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-ilo de ácido 3-(4,5-dimetoxi-2-nitro-benciloxycarbonilamino)-3-fenil-propiónico (50 μl de 0.1 M de solución en DMF). La mezcla es dejada a la temperatura del cuarto durante la noche. El oligo del bloque de construcción es centrifugado (20,000 G durante 15 minutos) y el DMF es removido. Se agrega DMF (1 ml), el oligo del bloque de construcción es centrifugado (20,000 G durante 15 minutos) y el DMF es removido.

[0786] Los análogos activados por NHM de la terminal C protegida por N-Nvoc de β-Alanina, ácido cis-2-amino-1-

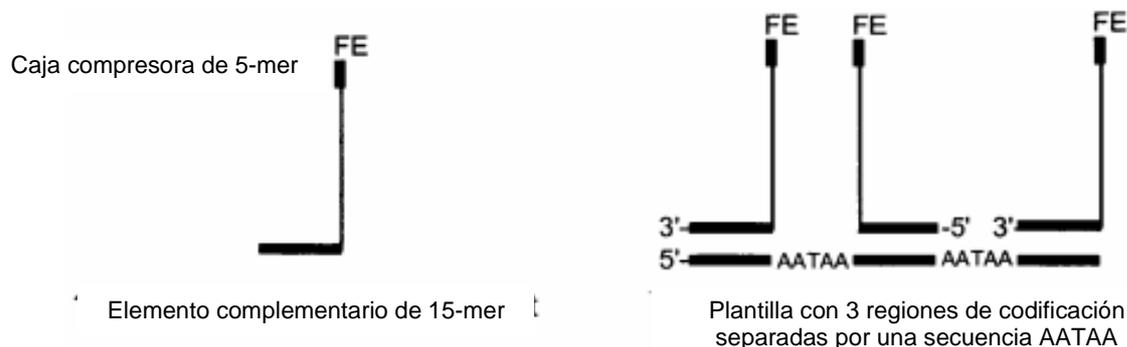
ciclohexanocarboxílico, el ácido trans-2-Amino-1-ciclohexanocarboxílico, el ácido cis-2-amino-1-ciclopentanocarboxílico, el ácido cis-2-amino-4-ciclohexeno-1-carboxílico, el ácido trans-2-amino-4-ciclohexeno-1-carboxílico, el ácido 3-amino-4,4,4-trifluorobutírico, el ácido 3-amino-4-metilpentanóico, el monohidrato de ácido DL-3-aminoisobutírico, el ácido DL-beta-aminobutírico, el clorhidrato de ácido 2-fluoro-3-aminopropiónico, son cargadas en 11 oligos de tio diferentes en una forma similar.

[0787] A continuación, cualquier 4 de los oligos de bloques de construcción preparados son seleccionados utilizados para la producción de bibliotecas.

**C) Producción de una biblioteca de 3-mer  $\beta$ -péptidos de 64 miembros ( $4^3$ ):**

Diseño de un oligo de bloque de construcción: Diseño de la configuración de la biblioteca:

[0788]



[0789] Las secuencias para los oligos de bloques de construcción se muestran más adelante. Los nucleótidos en negrillas constituyen el elemento complementario y se subraya a la caja compresora de 5-mer. La  $FE^{1-4}$  está adherida a las entidades funcionales (4  $\beta$ -aminoácidos protegidos por N-Nvoc) y B es una biotina interna.

- 1) 5'- $FE^1$ -CAT TGT TTT TTT TTT TBT TTT TTT TTT TGC ATA CAA CTA TGT A (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:42)
- 2) 5'- $FE^2$ -CAT TGT TTT TTT TTT TBT TTT TTT TTT TGC ATA CGG CTA TGT A (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:43)
- 3) 5'- $FE^3$ -CAT TGT TTT TTT TTT TBT TTT TTT TTT TGC ATA CGA CTA TGT A (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:44)
- 4) 5'- $FE^4$ -CA T TGT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TGC ATA CAG CTA TGT A (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:45)
- 5) 3'- $FE^1$ -GTA ACT TTT TTT TTT TBT TTT TTT TTT TAT GCG TAA AGC CAT G (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:46)
- 6) 3'- $FE^2$ -GTA ACT TTT TTT TTT TBT TTT TTT TTT TAT GCG TGG AGC CAT G (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:47)
- 7) 3'- $FE^3$ -GTA ACT TTT TTT TTT TBT TTT TTT TTT TAT GCG TGA AGC CAT G (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:48)
- 8) 3'- $FE^4$ -GTA ACT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TAT GCG TAG AGC CAT G (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO:49)

[0790] 64 oligo plantillas (2 pmol cada uno) que consisten de 3 regiones codificadoras están mezclados con 4 oligos de bloques de construcción diferentes (1-4, 200 pmol cada uno) y amortiguador de hepes (20  $\mu$ l, 100 mM de amortiguador de hepes y 1 M de NaCl, pH = 7.5). Se agrega agua a un volumen final de 1000  $\mu$ l. Los oligos son recosidos a plantillas al calentarse a 50  $^{\circ}$ C y enfriarse (-2  $^{\circ}$ C/30 segundos) a 20  $^{\circ}$ C. Los grupos protectores de Nvoc son removidos por medio de desgasificación completamente con Ar, seguido de la exposición a una lámpara de mercurio (lámpara de mercurio de HPLC de 450 W, un filtro de pirex, corte < 300 nm) durante 1-2 horas. A la mezcla se le dejó durante la noche a una temperatura fluctuante (10  $^{\circ}$ C durante un segundo y entonces 35  $^{\circ}$ C durante un segundo).

[0791] La formación de moléculas codificadas en la producción de la biblioteca es abordada en 2 experimentos separados, donde únicamente la plantilla es utilizada en cada experimento. La primera plantilla (3'-CGT ATG TTG ATA CAT AAT AAC GTA TGT TGA TAC ATA ATA ACG TAT GTT GAT ACA T (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 50)) codifica a la formación del 3-mer  $\beta$ -péptido de  $\beta$ -alanina y la otra plantilla (3'-CGT ATG CCG ATA CAT AAT AAC GTA TGC CGA TAC ATA ATA ACG TAT GCC GAT ACA T (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 51)) para la formación del 3-mer  $\beta$ -péptido del ácido 3-amino- 4,4,4-trifluorobutírico.

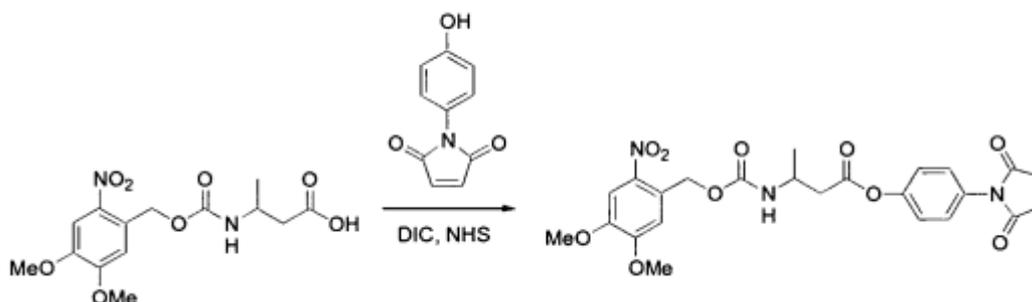
**[0792]** Un oligo plantilla (2 pmol) que consiste de 3 regiones codificadoras que están mezcladas con 4 diferentes oligos de bloques de construcción (1-4, 200 pmol cada uno) y un amortiguador de hepes (20  $\mu$ l, 100 mM de amortiguador de hepes y 1 M de NaCl, pH = 7.5). Se agrega agua hasta un volumen final de 100  $\mu$ l. Los oligos son recosidos a las plantillas al calentarse a 50 °C y enfriarse (-2 °C/30 segundos) a 20 °C. Los grupos protectores de Nvoc son removidos por medio de desgasificación completamente con Ar, seguido de una exposición a una lámpara de mercurio (lámpara de mercurio de HPLC de 450 W, un filtro de pirex, un corte <300 nm) durante 1-2 horas. A la mezcla se le deja durante la noche a una temperatura fluctuante (10 °C durante un segundo y entonces 35 °C durante un segundo). El complejo oligo es adherido a estreptavidina mediante la adición de microesferas de estreptavidina (100  $\mu$ l, pre - lavadas con 2x1 mL de 100 mM de amortiguador de hepes y 1 M de NaCl, pH=7.5). Las microesferas son lavadas con un amortiguador de hepes (1 ml). El oligo del bloque de construcción, que contiene al producto codificado, es separado del complejo enlazado a estreptavidina por medio de la adición de agua (200  $\mu$ l) seguido por un calentamiento a 70 °C. El agua es transferida a una formación de producto verificada por un análisis MS.

**Ejemplo 109 (modelo): Descripción de la preparación de una biblioteca de 3-mer 6-aminoácidos**

### A) Síntesis de los bloques de construcción de $\beta$ -aminoácidos

**[0793] La protección de la terminal N:** El grupo Nvoc (3,6-dimetoxi-6-nitrobenzilo carbonilo) fue utilizado como un grupo protector de N foto-separable e introducido a un  $\beta$ -aminoácido de acuerdo al método descrito anteriormente.

**[0794] Activación de la terminal C:** El  $\beta$ -aminoácido protegido por N-Nvoc fue activado utilizando la 1-(4-hidroxifenil)-pirrol-2,5-diona conocida (Choi et al. Mol.Cryst.Liq.Cryst.Sci.Technol.Sect.A (1996), 280, 17-26), de acuerdo al siguiente método:

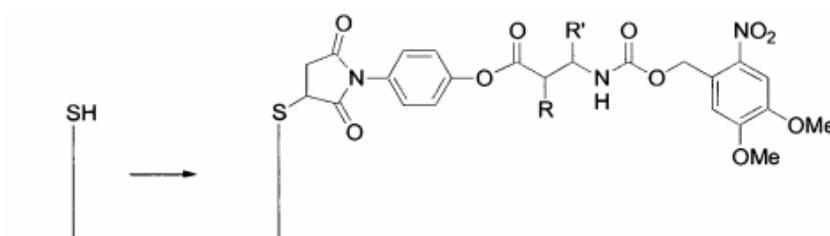


**[0795]** La 1-(4-Hidroxifenil)-pirrol-2,5-diona (1 mmol), NHS (1.0 mmol) y el ácido 3-(4,5-dimetoxi-2-nitro-bencilo carbonilamino)-butírico (1 mmol) son disueltos en THF (3 ml). La solución es enfriada a 0 °C y tratada en forma de gotas con DIC (1.2 mmol). El baño de enfriamiento es removido después de una hora y la mezcla de la reacción se la deja a la temperatura del cuarto durante la noche. El solvente es evaporado al vacío y el producto puro (éster de 4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-fenilo de ácido 3-(bencilo carbonil-amino de 4,5-dimetoxi-2-nitro)-butírico) es aislado por medio de una purificación de columna de sílice utilizando EtOAc-heptano (1:4 entonces 1:2 entonces 1:1) como eluyente.

**[0796]** Los análogos protegidos de N-Nvoc de  $\beta$ -alanina, ácido cis-2-amino-1-ciclohexanocarboxílico, ácido trans-2-Amino-1-ciclohexanocarboxílico, ácido cis-2-amino-1-ciclopentanocarboxílico, ácido cis-2-amino-4-ciclohexeno-1-carboxílico, ácido trans-2-amino-4-ciclohexeno-1-carboxílico, ácido 3-amino-4,4,4-trifluorobutírico, ácido 3-amino-4-metilpentanoico, monohidrato de ácido DL-3-aminoisobutírico, ácido DL-beta-aminobutírico, clorhidrato de ácido 2-fluoro-3-aminopropiónico, son activados similarmente en la terminal C.

### B) Preparación de oligos de bloques de construcción:

**[0797]**



[0798] Un oligo de tio (2 nmol) en agua (25  $\mu$ l) es tratado con éster de 4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-fenilo de ácido 3-(4,5-dimetoxi-2-nitrobenciloxycarbonil-amino)-butírico (25  $\mu$ l de 10 mM de solución en MeOH). A la mezcla se le deja durante la noche a la temperatura del cuarto. El oligo del bloque de construcción es purificado por medio de una precipitación convencional de EtOH. El pellet es lavado con diclorometano (3 x 300  $\mu$ l) y secado al vacío.

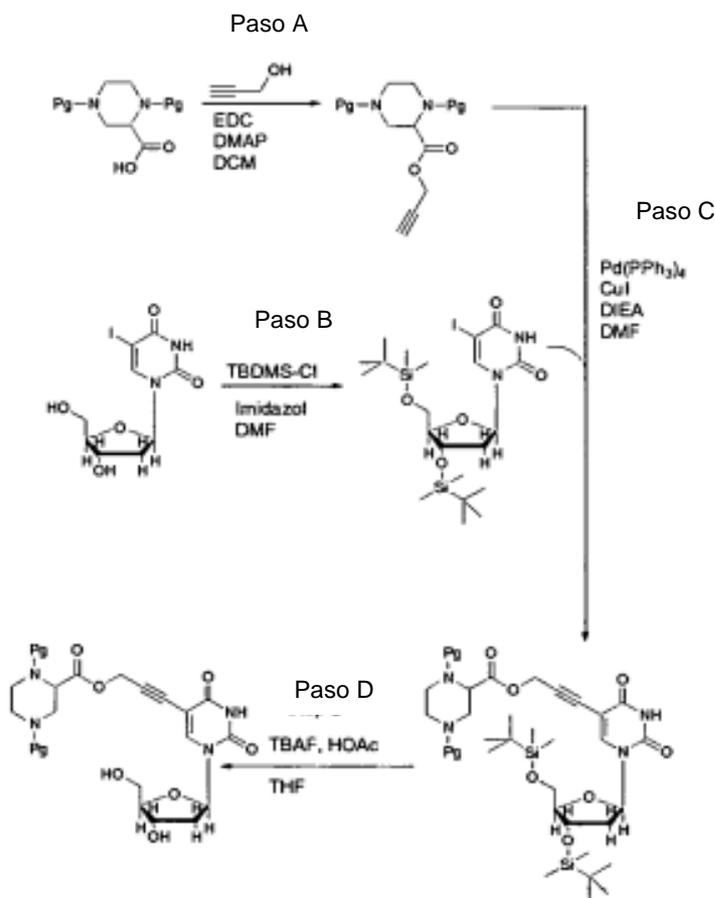
[0799] Los análogos activados de la terminal C protegidos por N-Nvoc de  $\beta$ -alanina, ácido cis-2-amino-1-ciclohexanocarboxílico, ácido trans-2-Amino-1-ciclohexanocarboxílico, ácido cis-2-amino-1-ciclopentanocarboxílico, ácido cis-2-amino-4-ciclohexeno-1-carboxílico, ácido trans-2-amino-4-ciclohexeno-1-carboxílico, ácido 3-amino-4,4,4-trifluorobutírico, ácido 3-amino-4-metilpentanoico, monohidrato de ácido DL-3-aminoisobutírico, ácido DL-beta-aminobutírico, clorhidrato de ácido 2-fluoro-3-aminopropiónico, son cargados similarmente en 11 oligos de tio diferentes.

[0800] Cualquier 4 de los oligos del bloque de construcción preparados son seleccionados y utilizados para la producción de bibliotecas tal como se describió anteriormente.

Ejemplo 110 (modelo): A continuación, se describe un método de preparación de bibliotecas que se basa en plantillas de oligonucleótidos y en bloques de construcción de nucleósidos de 5'-fosfoimidazólidos

#### Preparación de bloques de construcción

[0801]



Paso A: Preparación de un enlazador de ésteres con una alquina terminal

[0802] El derivado ácido (10.37 milimoles) es disuelto en DCM (20 ml) y enfriado a 0 °C en un baño de agua. Se agrega EDC (12.44 milimoles, 1.2 equiv) seguido de DMAP (1.04 mmol, 0.1 equiv) y el alcohol (15.55 milimoles, 1.5 equiv) en DCM (5 ml). Después de una hora de reacción en un baño de hielo, a la mezcla se le permite llegar a 20 °C y se la deja reaccionar durante 16 horas. Los volátiles son removidos y el residuo es absorbido en dietileter (150 ml) y HCl (aq, 0.1 M, 75 ml). Las fases son separadas y la fase orgánica es lavada primero con una mezcla de NaHCO<sub>3</sub> (sat, 35 mL) y agua (35 mL) y luego de nuevo con agua (75 ml). Al evaporarse el dietileter, el producto es secado azotrópicamente utilizando tolueno (2x120 mL) generando al éster deseado que podría ser purificado por cromatografía si fuese necesario.

Paso B: Introducción de grupos protectores en nucleósidos sustituidos con yodo

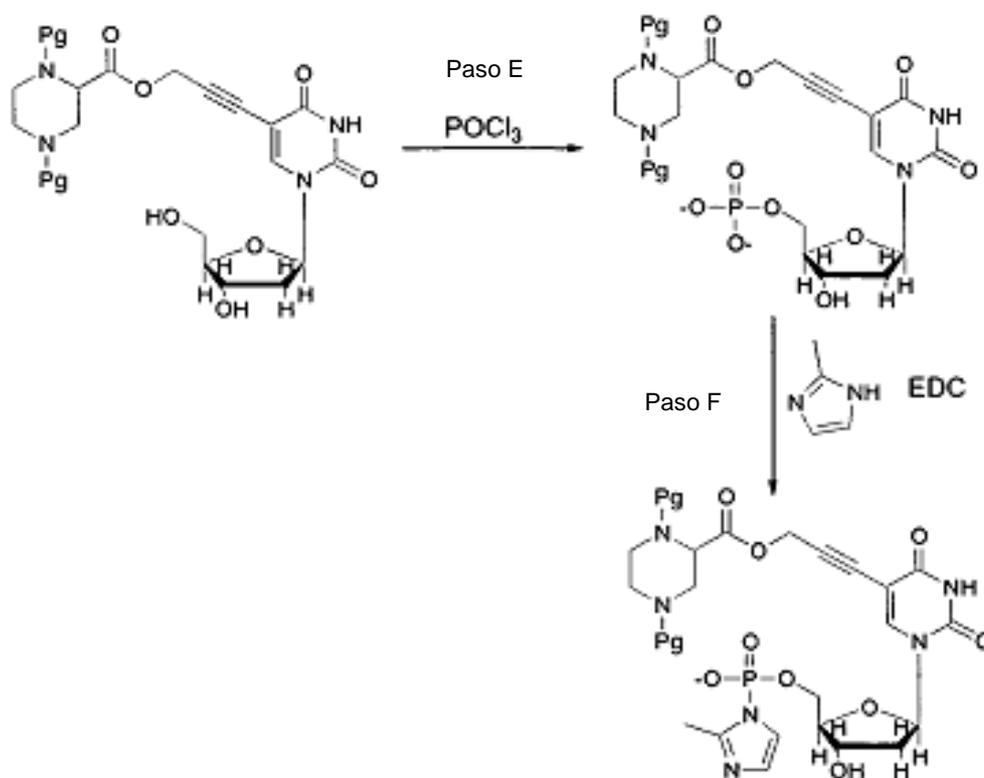
[0803] El nucleósido (5.65 mmol, 1eq), TBDMS-Cl (2.04g, 13.56 mmol, 2.4 eq) y imidazol (1.85g, 27.11 mmol, 4.8 eq) son mezclados en DMF (20 ml) y agitados a 25 °C durante la noche. Se agrega EtOAc (400 mL) y la fase orgánica es lavada con una mezcla de NH<sub>4</sub>Cl(aq) (sat, 40 mL) + H<sub>2</sub>O (40 mL) seguido por H<sub>2</sub>O (80 mL). La fase orgánica es extirpada y el residuo es absorbido en tolueno, filtrado y extirpado para dejar al nucleósido protegido deseado. El compuesto podría ser purificado aún más por medio de la cristalización.

Paso C: Acoplamiento Sonogashira de nucleósidos sustituidos con yodo protegido en alquinos terminales

[0804] Una solución de DMF (20 ml) del nucleósido sustituido con yodo protegido (3.4 milimoles), el alquino (6.9 milimoles, 2 eq), DIEA (2.5 mL) es purgada con Ar durante 5 minutos. Se agrega paladio de trifetilfosfina de tetrakis (0.3 milimoles, 0.1 eq) y CuI (0.7 milimoles, 0.2 eq) y la mezcla es calentada 50 °C y se mantiene así durante 20 horas. Cuando se enfría, a la mezcla se le agrega 700 ml de dietiléter. La fase orgánica es lavada con cloruro de amonio (sat, aq, 250 mL) y agua (250 ml). La evaporación de volátiles seguido por una extirpación con tolueno (400 ml) genera al nucleósido modificado deseado que es purificado por medio de cromatografía de columnas (gel sílice, eluyente acetato de heptano/etilo).

Paso D: Remoción de los grupos protectores OH

[0805] A una solución de THF del producto que se mencionó anteriormente (1.8 milimoles en 30 ml) se le agrega ácido acético (0.8 mililitros, 14.1 mmol, 8eq) y fluoruro de tetrabutilamonio (7 mmol, 4eq). Al agitarse a 20 °C durante 20 horas, los volátiles son removidos al vacío y el residuo es purificado por medio de cromatografía de columna (gel sílice, eluyente DCM/metanol).

Paso E: Síntesis de mono-fosfato

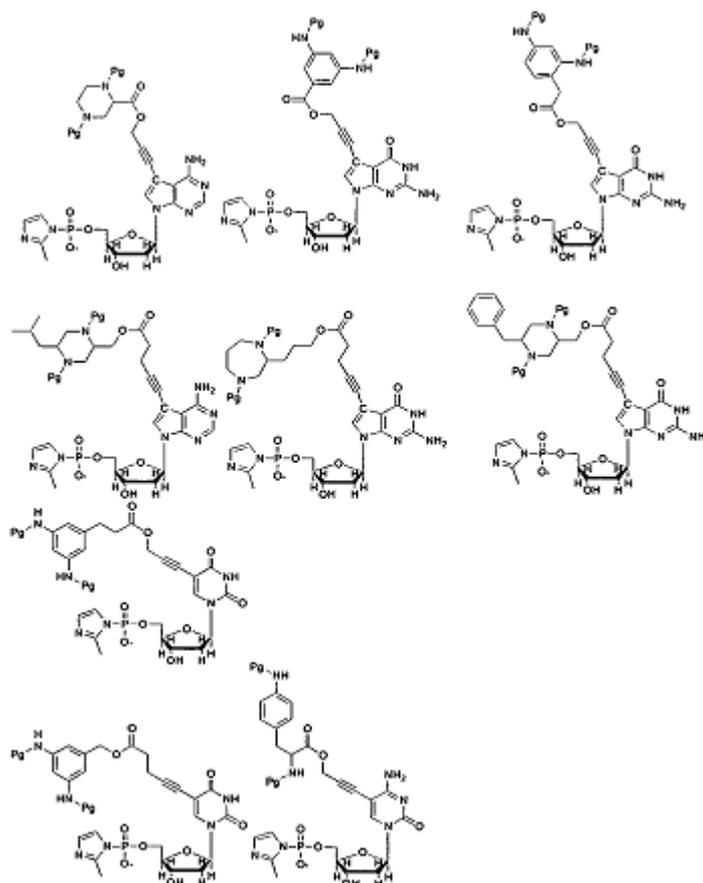
[0806] A una sustancia espesa del nucleósido modificado en el paso D (1.65 milimoles) en fosfato de trimetilo (5 ml) es enfriada a 0 °C y agregada fosforoxitricloruro (190 µl, 307 mg, 2 mmol, 1.2 eq). La reacción es mantenida a 0 °C durante 2 horas. Se agrega amina de tributilo (1 ml) y la reacción se le permite llegar a 20 °C. Otra porción de amina de tributilo (1.3 mililitros) es agregada para elevar el pH, seguido de agua. Los volátiles son removidos al vacío y el residuo podría ser purificado utilizando cromatografía de intercambio de iones (Sephadex A25, amortiguador de bromuro de tetra-etilamonio 0.05-1.0 M, pH 7).

Paso F: síntesis del Fosfoimidazólido

**[0807]** A una solución del derivado de mono-fosfato que se acaba de mencionar (0.1 M) se le agrega 2-metilimidazol (0.5 M) y EDC (0.5 M) a un pH de 6.5 y a 0 °C. La reacción es agitada durante 2 horas manteniendo la temperatura a 0 °C. La mezcla podría ser utilizada directamente en la síntesis de bibliotecas [Vischer;1988; Journal of Molecular Evolution (Revista de Evolución Molecular); 3-6]. Alternativamente, un tratamiento de fosfatos con diimidazol de carbonilo también genera a los fosfoimidazólidos. [Zhao;1998; J. Org. Chem.; 7568-7572].

Una colección de bloques de construcción

**[0808]** En el esquema a continuación, se muestran varios bloques de construcción útiles para la síntesis de bibliotecas. Todos los bloques de construcción tienen entidades funcionales adheridas al elemento de reconocimiento por medio de un éster carboxílico y podrían ser sintetizados tal como se menciona anteriormente.

Preparación de la biblioteca

**[0809]** El esquema a continuación muestra un ejemplo del proceso de la elaboración de una biblioteca de poliamidas utilizando plantillas de oligonucleótidos y bloques de construcción de fosfoimidazólidos que se mostraron anteriormente. Una secuencia de cebador de oligonucleótidos con un modificador de secuencias que porta una (opcionalmente) amina protegida (por ejemplo, el modificador de aminas C2 dT, cat no 10-1019 de Glen Research) es recosido a las plantillas utilizadas en la biblioteca. Además, otra secuencia de oligonucleótidos es recosida en calidad de una secuencia terminal exponiendo, de esa forma, solamente la parte de la plantilla que codifica a la incorporación de bloques de construcción. Para fines de claridad, las bases de los bloques de construcción de fosfoimidazólidos han sido reemplazadas con códigos de letras en negrillas.

5

10

15

20

25

30

35

40

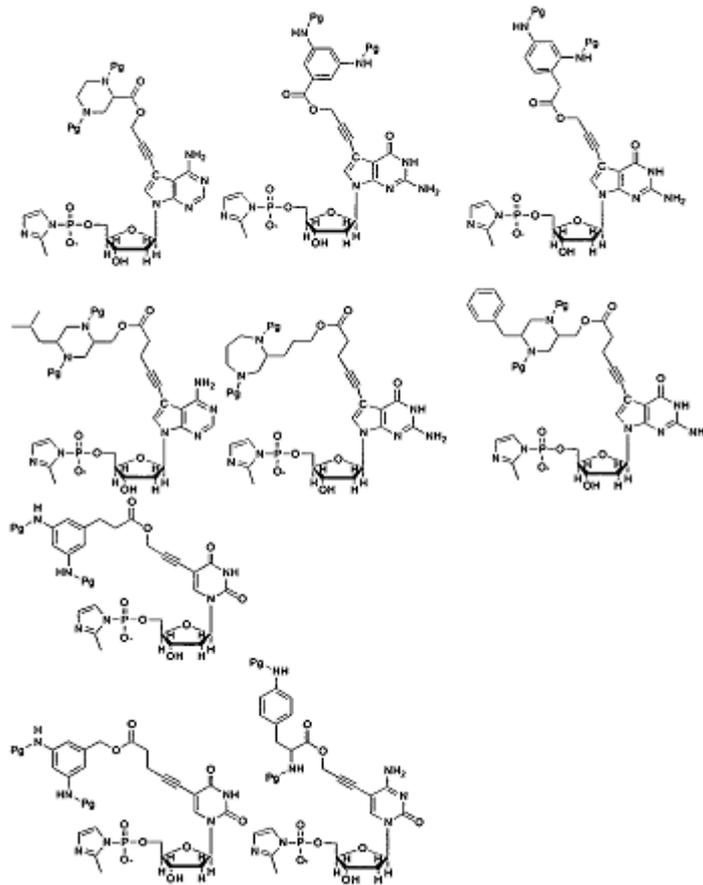
45

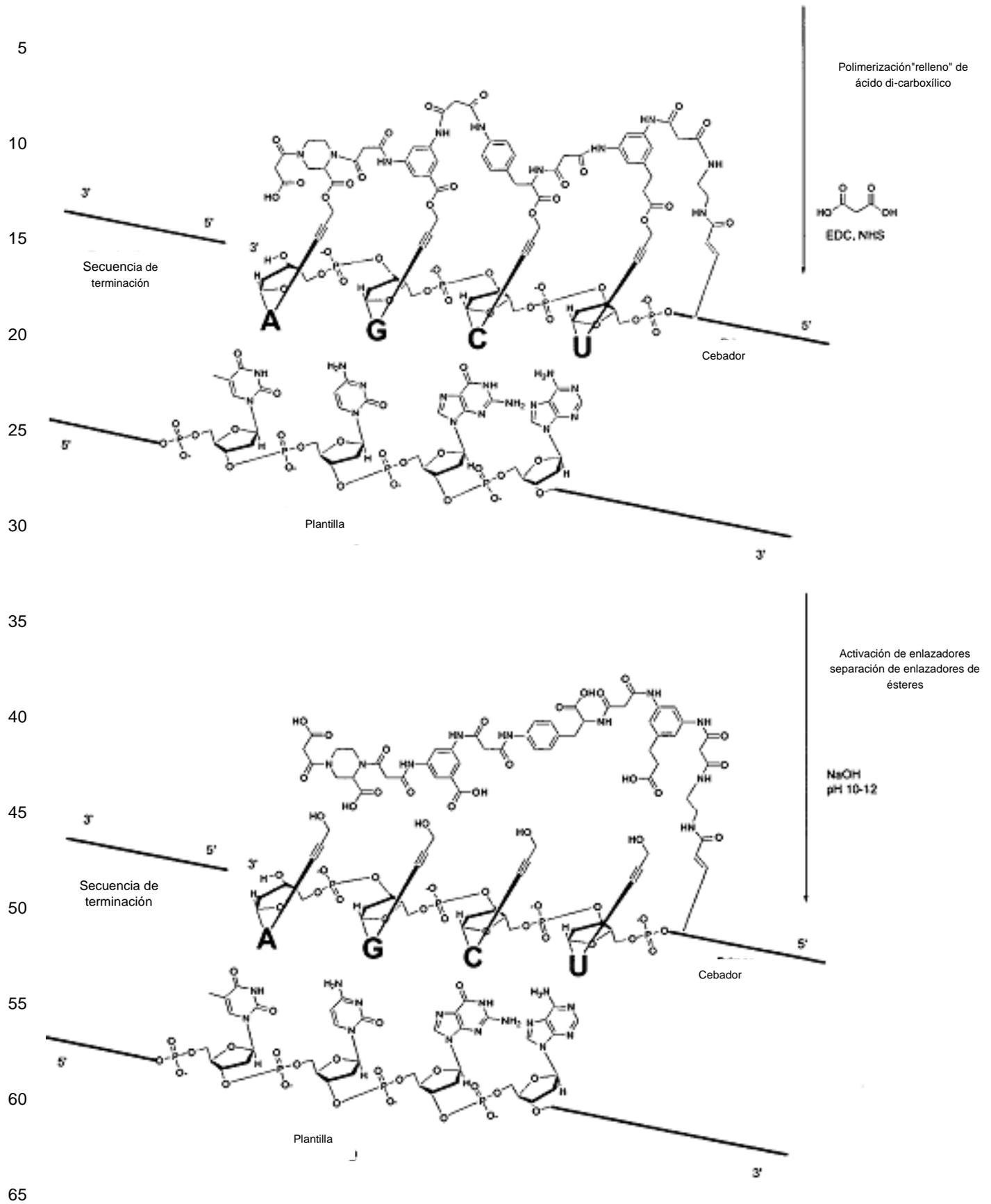
50

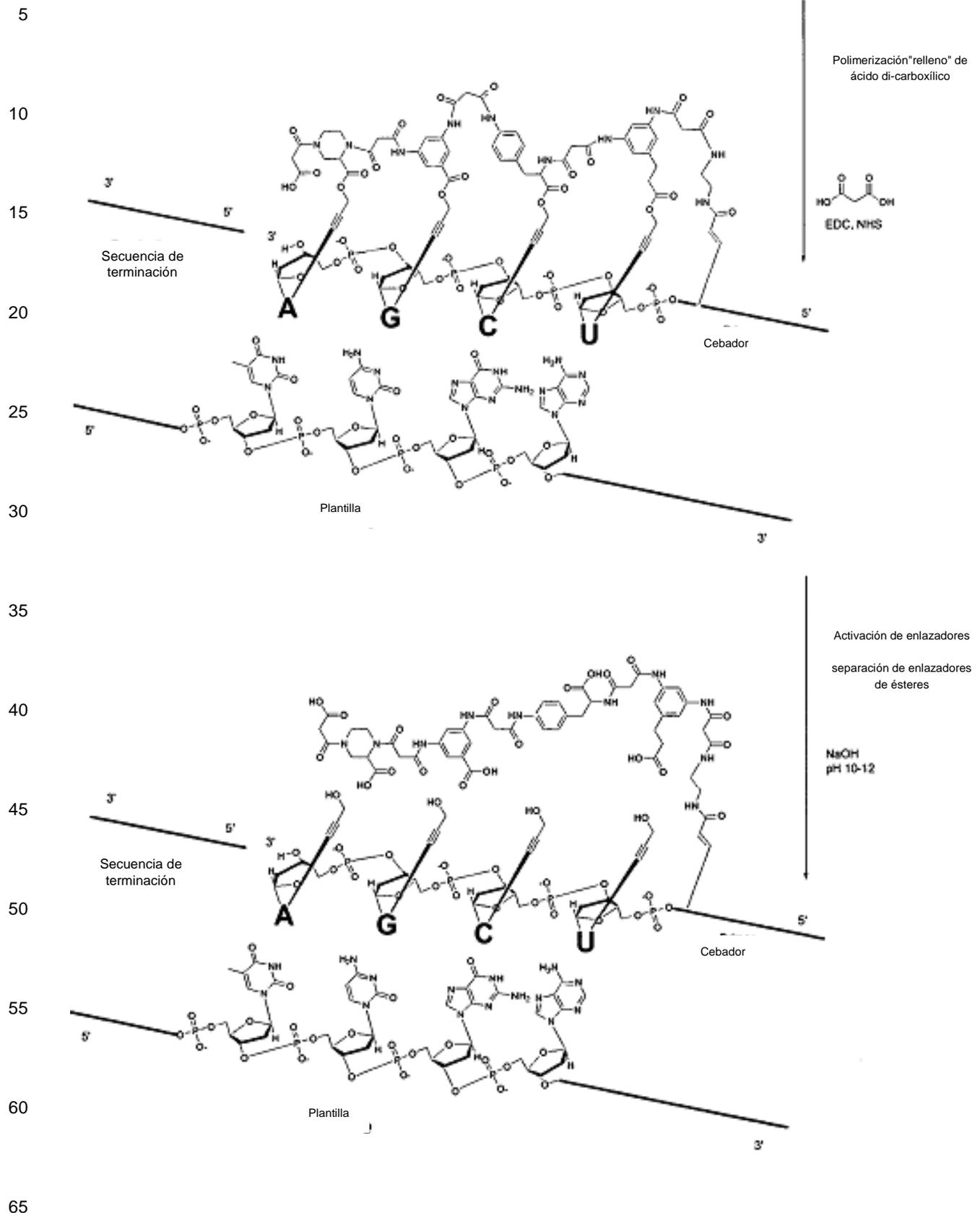
55

60

65







Incorporación

**[0810]** Las condiciones típicas de oligomerización de bloques de construcción en la plantilla son 0.05 M de plantillas, 0.1-0.2 M de bloques de construcción, en 0.2 M de amortiguador de 2,6-lutidina-HCl ajustado a pH = 7.2, amortiguador que contiene 1.0 M de cloruro de sodio, 0.2 M de cloruro de magnesio. La temperatura fue mantenida a 0 °C durante 1-21 días. [Inoue;1984; Journal of Molecular Biology (Revista de Biología Molecular); 669-676]. Los complejos de oligonucleótidos podrían ser purificados utilizando filtración de gel de micro - centrifugación (BioRad).

Protección de aminas

**[0811]** Los grupos de protección Cbz podrían ser removidos por medio de una variedad de métodos [Greene;1999;]. Debido a su moderación, una reducción catalítica es a menudo el método escogido. Al combinar un catalizador de hidrogenación insoluble, por ejemplo, Pd/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Pd/CaCO<sub>3</sub>, Pd/C, PtO<sub>2</sub>, o uno soluble, por ejemplo el catalizador de Wilkinsons y una fuente de hidrógeno, por ejemplo, pero sin limitarse a, H<sub>2</sub>, formiato de amonio, ácido fórmico, 1,4-ciclohexadieno, y ciclohexeno en un solvente adecuado tal como el agua, metanol, etanol, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etilenglicol, acetonitrilo, ácido acético o una de sus mezclas con los complejos de oligonucleótidos remueven a los grupos protectores Cbz.

Polimerización

**[0812]** Las di-aminas son enlazadas entre sí utilizando ácidos di-carboxílicos, un reactivo de acoplamiento de péptidos opcionalmente en la presencia de un modificador de acoplamiento de péptidos en un solvente adecuado tal como el agua, el metanol, el etanol, la dimetilformamida, el dimetilsulfóxido, el etilenglicol, el acetonitrilo o una de sus mezclas. A una solución amortiguada acuosa (10uL, 1 M de NaCl, 100-500 mM de amortiguador pH 6-10, preferiblemente 7-9) de complejos de oligonucleótidos (0.1-100 uM, preferiblemente 0.5-10 uM) que portan di-aminas libres se le agrega un ácido di-carboxílico (0.1 mM-100 mM, preferiblemente, 1-10 mM), por ejemplo, pero sin limitarse a, el ácido oxálico-, malónico-, succínico-, pentanedióico- o hexanedióico, ácido ftálico-, isoftálico, tereftálico, ácido glutámico N-prottegido o ácido aspártico N-prottegido mezclado con un reactivo de acoplamiento de péptidos (0.1 mM - 100 mM, preferiblemente 1-10 mM), por ejemplo, pero sin limitarse a, EDC, DCC, DIC, HATU, HBTU, PyBoP, PyBroP o tetrafluoroborato de *N*-metil-2-cloropiridinio y un modificador de acoplamiento de péptidos (0.1 mM-100 mM, preferiblemente 1-10 mM), por ejemplo, pero sin limitarse a, NHS, sulfo-NHS, HOBt, HOAt, DhbtOH en un solvente adecuado (un microlitro), por ejemplo, agua, metanol, etanol, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etilenglicol, acetonitrilo o una de sus mezclas. Las reacciones son ejecutadas a temperaturas entre -20 °C y 100 °C, preferiblemente entre 0 °C y 60 °C. Los tiempos de reacción son de entre una hora y una semana, preferiblemente 1 hora-24 horas.

El procedimiento ejemplifica la polimerización en una escala de 11 µl, pero cualquier otro volumen de reacción entre 1.1 microlitros y 1.1 litros podría ser utilizada.

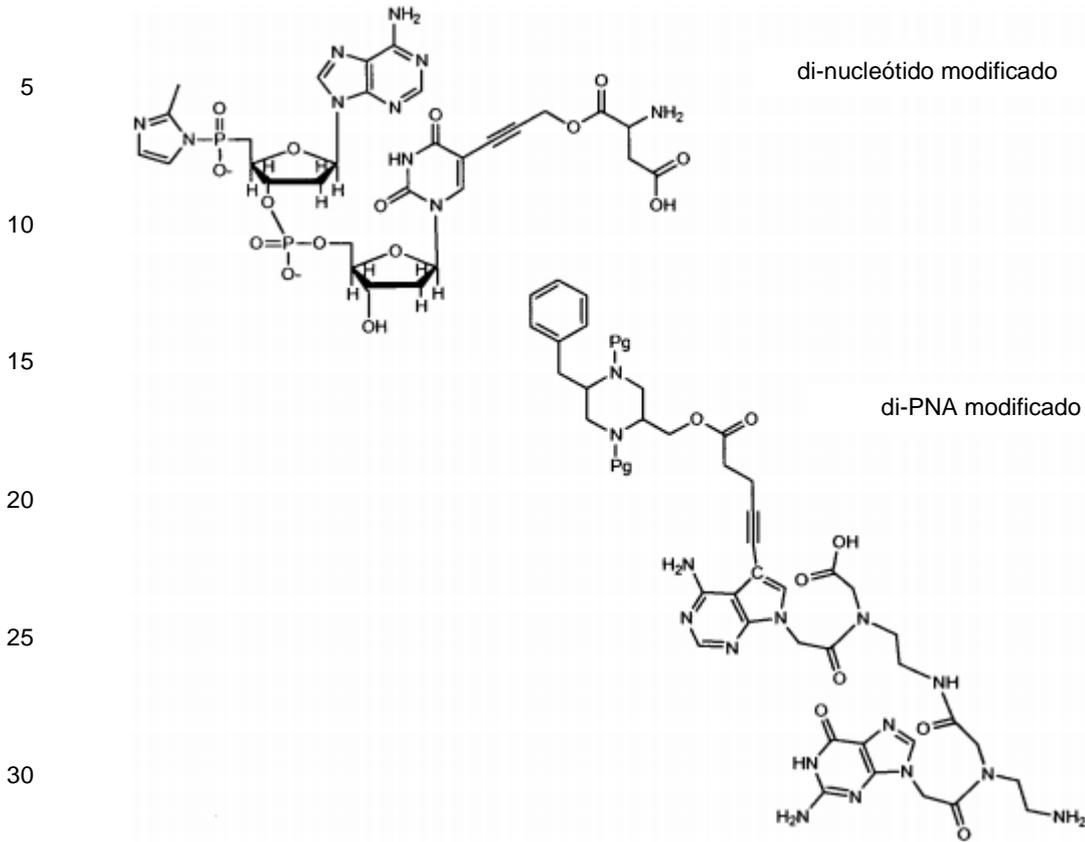
Separador de enlazadores

**[0813]** Los enlazadores de ésteres son separados con hidróxido acuoso a pH 9-12 a la temperatura del cuarto, 16 horas en un solvente adecuado tal como agua, metanol, etanol, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etilenglicol, acetonitrilo o una mezcla de estas.

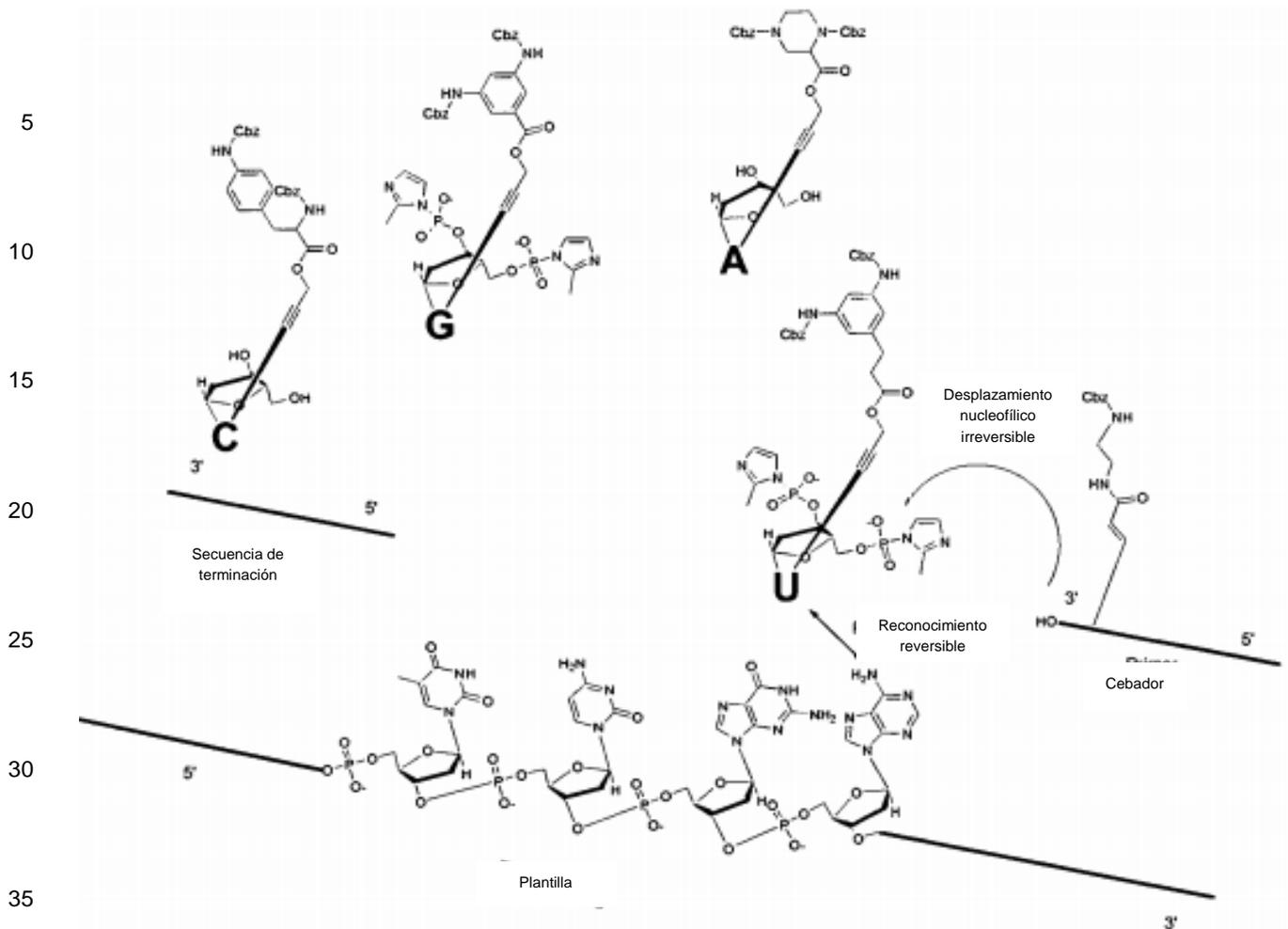
Análisis MS

**[0814]** Los miembros de la biblioteca pueden ser analizados por medio de una espectroscopía de masa.

**[0815]** En la secuencia que se mencionó anteriormente, las diaminas portan grupos protectores Cbz que son desprotegidos en el oligonucleótido. Otros esquemas de protección también pueden ser relevantes para la protección de aminas [Greene y Wuts;1999;]. En algunos casos, podría ser suficiente ejecutar a la secuencia con bloques de construcción que no portan grupos protectores en las aminas, eliminando, por lo tanto, el paso de desprotección de las aminas. El procedimiento descrito para la síntesis de bibliotecas modeladas también podría utilizar el uso de di- y tri-nucleótidos modificados, así como análogos de ácidos nucleicos modificados tal como morfolinos, LNAs y PNAs. En referencia a las condiciones de reacciones del caso posterior, durante la incorporación debería cambiarse para acomodar a reacciones de acoplamiento de péptidos. [Schmidt;1997; Nucleic Acids Research (Investigación de Ácidos Nucleicos); 4792-4796] ejemplos de bloques de construcción alternos como esos se muestran en el esquema continuación. Síntesis de las unidades modificadas de PNA en comparación a las unidades ordinarias de PNA difieren únicamente en el uso de las bases modificadas.



**[0816]** Además, en vez de utilizar 5'-fosfoimidazólido-nucleósidos, una mezcla de bis-3',5'fosfoimidazólido-nucleósidos [Visscher y Schwartz; 1988; Journal of Molecular Evolution (Revista de Evolución Molecular); 3-6] y nucleósidos pueden ser utilizados en la producción de bibliotecas, refiérase más adelante. Alternando la incorporación de cada tipo de bloque de construcción es requerido, pero debido a la reversibilidad del paso de reconocimiento y el hecho de que ninguna reacción ocurre, si, por ejemplo, 2 bis-3',5'fosfoimidazólido-nucleósidos son colocados adyacentes entre sí, todo lo que es necesario es que ambos tipos de bloques de construcción estén presentes en la mezcla.



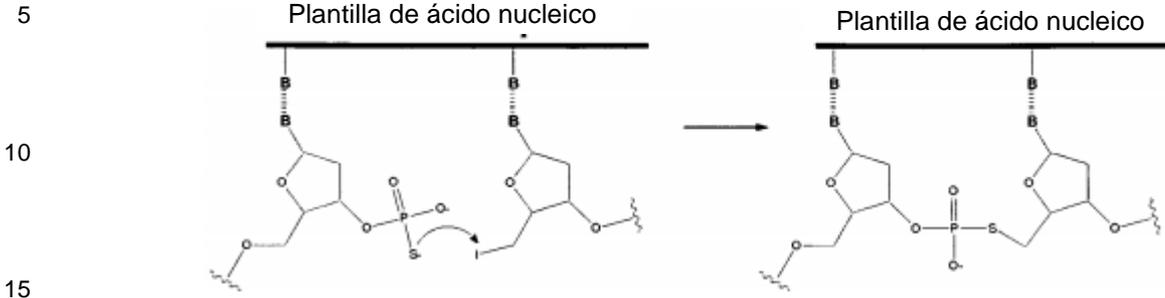
Referencias

**[0817]**

- (1) Visscher, J.; Schwartz, A. W. *Journal of Molecular Evolution* (Revista de Evolución Molecular) 1988, 28, 3-6.
- (2) Zhao, Y.; Thorson, J. S. *J. Org. Chem.* 1998, 63, 7568-7572.
- (3) Inoue, T.; Joyce, G. F.; Grzeskowiak, K.; Orgel, L. E.; Brown, J. M.; Reese, C. B. *Journal of Molecular Biology* (Revista de Biología Molecular) 1984, 178, 669-676.
- (4) Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis* (Grupos Protectores en Síntesis Orgánica); 3<sup>ra</sup> ed.; John Wiley & Sons: Nueva York, 1999.
- (5) Schmidt, J. G.; Christensen, L.; Nielsen, P. E.; Orgel, L. E. *Nucleic Acids Research* (Investigación de Ácidos nucleicos) 1997, 25, 4792-4796.

Ejemplo 111 (modelo): Síntesis de una biblioteca de moléculas modeladas por medio de la liberación no enzimática de entidades funcionales comprendidas de dinucleótidos

**[0818]** Algunos sistemas han sido desarrollados que permiten la ligación química no enzimática de nucleótidos y oligonucleótidos en plantillas de ácidos nucleicos o de PNAs (Xu et al., 2001, *Nat Biotechnol* 19, 148-152; 2000, *J Am Chem Soc*, 122, 9040-41). Un protocolo describe la autoligación de 3'-fosfotioato y una partícula 5' comprendida de un yodo que abandona el grupo tal como se muestra más adelante.



[0819] El protocolo de ligación no enzimática puede ser utilizado para la síntesis modelada de una biblioteca de moléculas. Aquí, un conjunto de dinucleótidos donde cada uno comprende a una entidad funcional única fue sintetizado mediante la química de nucleótidos modificados de fosfoamiditas tal como se describe más adelante. Se sintetizaron 4 bloques de construcción de di-nucleótidos con secuencias dUdNp. Cada di-nucleótido comprende un 5'-yodo- y un grupo 3'-fosfotioato capaz de formar un enlace covalente con un grupo reactivo cercano.

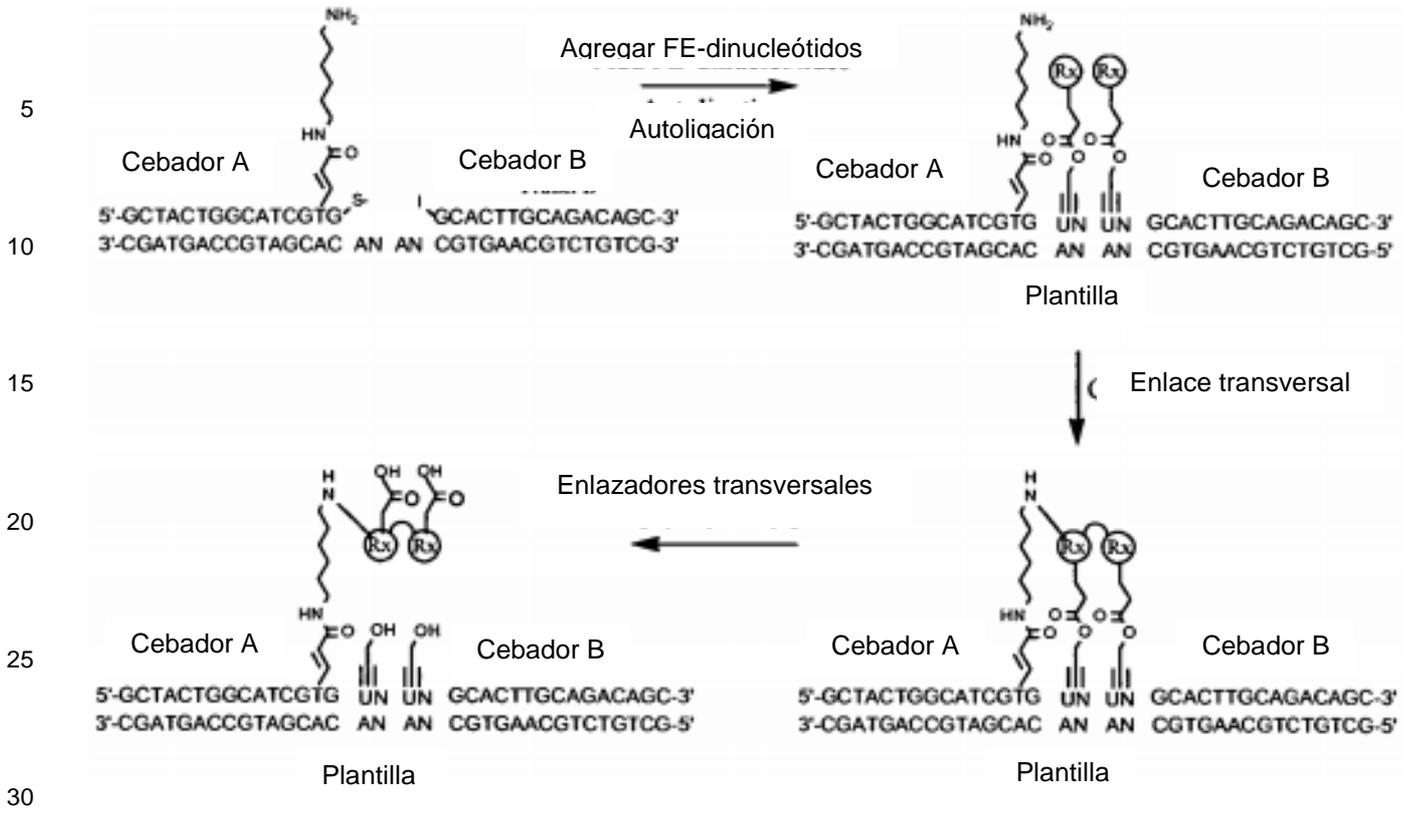
**Incorporación de di-nucleótidos en una plantilla de ADN:**

[0820] 1 pmol de cada uno de los cebadores de extensión A (5'-GCTACTGGCATCGXG-3'-fosfotioato (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 52), donde X denota a deoxitimidina-C6-NH<sub>2</sub>, Glen Research Cat#: 10-1035-90) y B (5'-yodo-GCACTTGCAGACAGC-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 53)) son recosidos a un oligo plantilla (5'-GCTGTCTGCAAGTGCNANACACGATGCCAGTAGC-3' (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 54)) en un amortiguador de enlace: 50 mM de HEPES-KOH, pH=7.5, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 mM, KCl e incubado a 80 °C durante 2 minutos antes de enfriarse lentamente a 20 °C. El vínculo del enlazador A y B a la plantilla forma un complejo de ADN de doble hebra con un segmento central de una sola hebra de 4 nucleótidos tal como se muestra más adelante. 10 pmol de di-nucleótidos son agregados y la mezcla de la reacción es incubada a 4 °C durante 30 minutos, seguido por un calentamiento breve a 25 °C durante 30 segundos. La mezcla de la reacción es sujeta a ciclos oscilantes sucesivos de temperatura durante 24 horas. Éste paso promueve la ligación química entre los di nucleótidos recosidos correctamente y los cebadores A y B.

[0821] Después del completamiento de la plantilla y de la ligación química, los dinucleótidos y el amortiguador son removidos por medio de filtración de gel de centrifugación (Biorad).

Enlaces transversales de entidades funcionales y la activación de moléculas modeladas

[0822] Los complejos de ADN que comprenden a las entidades funcionales son incubadas en un amortiguador de 20 mM de EPES-KOH pH = 7.5, 100 mM de KCl. Se agregan 5 mM de Bis[Sulfosuccinimidil]suberato (BS3, Pierce) en la muestra y se incuba a 30 °C durante 2-8 horas. El amortiguador y el exceso de BS3 son removidos por medio de filtración de gel de micro - centrifugación (Biorad). Las moléculas modeladas son activadas por medio de separación de los enlaces de éster utilizando 0.2 M de NaOH a 50 °C durante 15 minutos antes de la adición de HCl equimolar. La muestra transferida a un amortiguador adecuado para diálisis.



[0823] Este protocolo facilita la síntesis de una biblioteca pequeña de 16 diferentes moléculas cada una en la sala a su plantilla aplicable para experimentos de selección/amplificación. Bibliotecas más grandes pueden ser sintetizadas utilizando tri-, tetra- u otros oligo-nucleótidos que comprenden a entidades funcionales y/o al incrementar el número de bloques de construcción que van a ser acoplados por la ligación no enzimática en la plantilla de ADN.

35

40

45

50

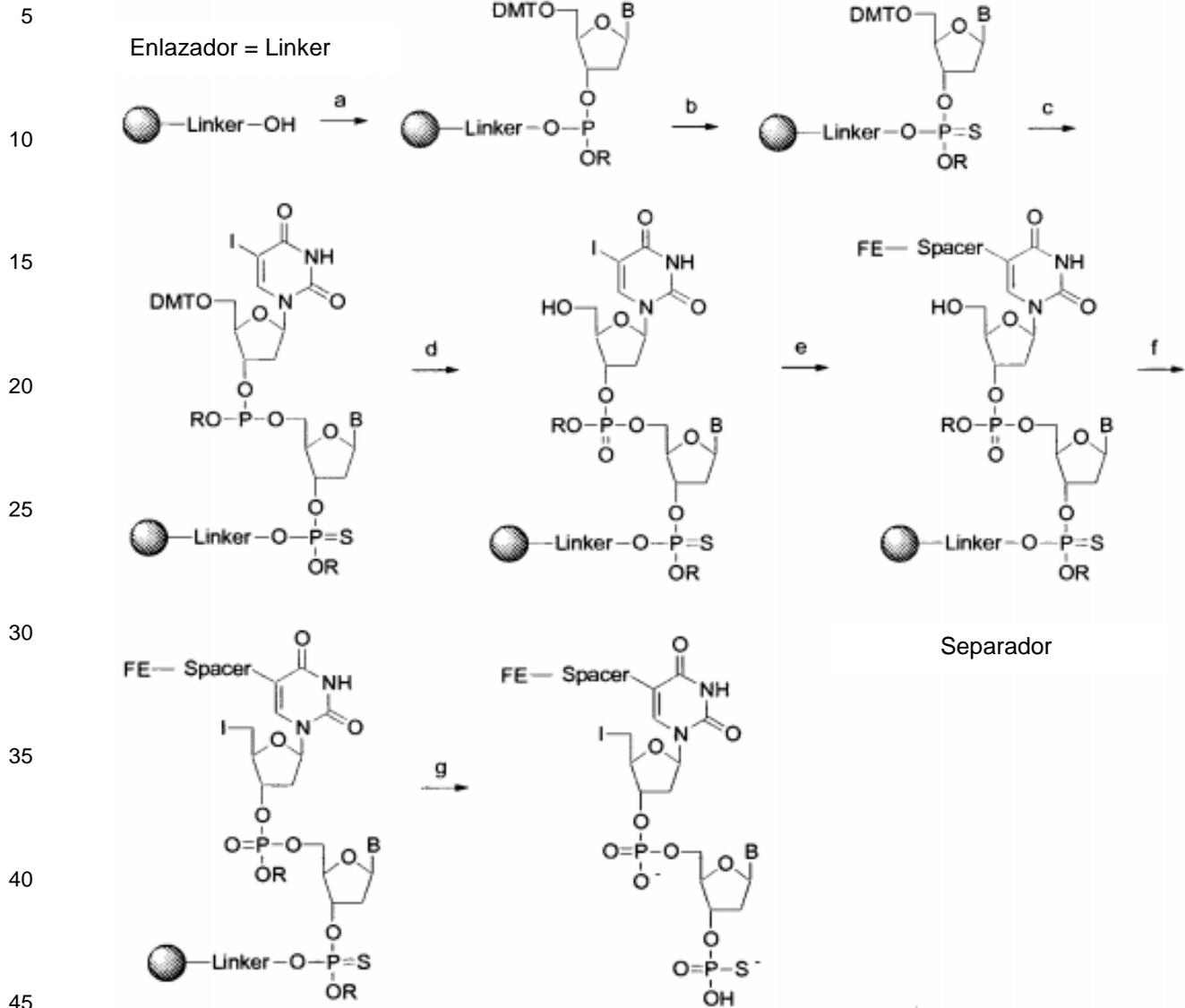
55

60

65

**Síntesis de bloques de construcción:**

**[0824]** Síntesis de dímeros de 5'-yodo-3'-fosfonioato con una entidad funcional adherida.



50 **[0825]** a) Acoplamiento convencional de fosforamiditas; b) S8 en piridina; c) acoplamiento de fosforamiditas para introducir a 5-I-dU; d) CF<sub>3</sub>COOH entonces I<sub>2</sub>/piridina/agua; e) separador de FE y Pd(0) en THF-Et<sub>3</sub>N; f) Ph<sub>3</sub>P y I<sub>2</sub> en DMF; g) foto - lisis >300 nm.

**[0826]** B es igual a A, T, G o C protegida apropiadamente con el grupo protector foto - lábil Nvoc<sup>2</sup>. El enlazadores es igual a un soporte sólido de CPG foto - lábil. <sup>3</sup>R es igual a el grupo protector de fosfato foto - lábil. <sup>4</sup>

<sup>2</sup>Alvarez et al. J. Org. Chem. (1999), 64, 6319-28

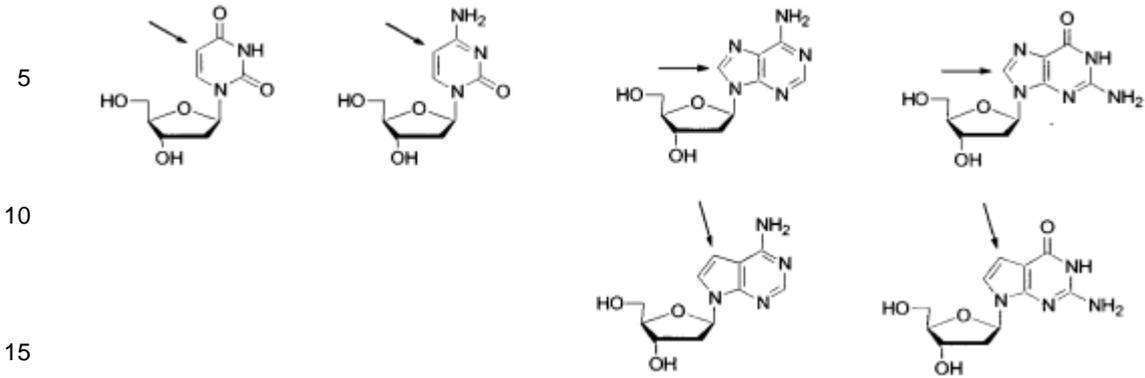
<sup>3</sup>Pirrung et al. J. Org. Chem. (1998), 63, 241-46

<sup>4</sup>Givens y Kueper Chem. Rev. (1991), 93, 55

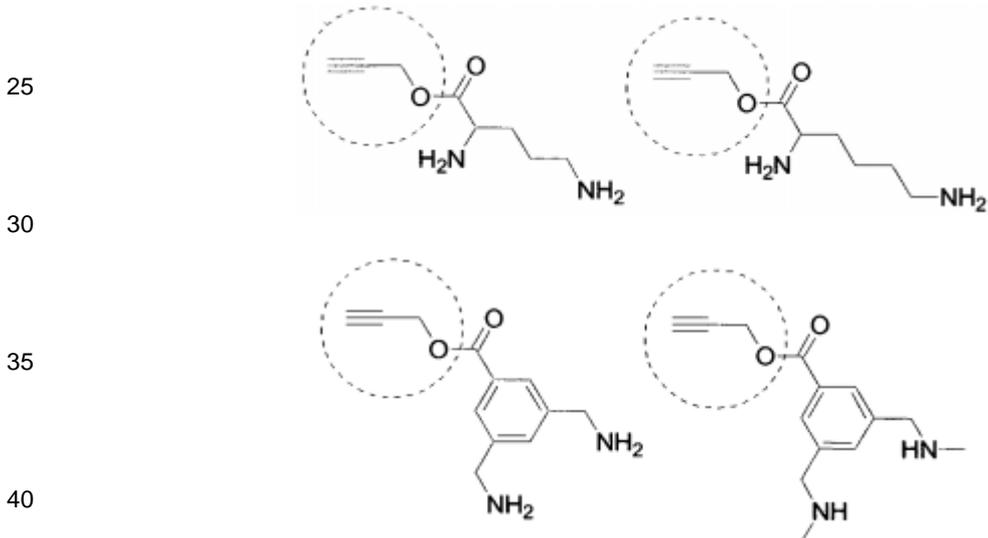
**[0827]** Ejemplos de puntos de adherencia (indicados por una flecha) del enlazador en las bases nitrogenadas.

60

65



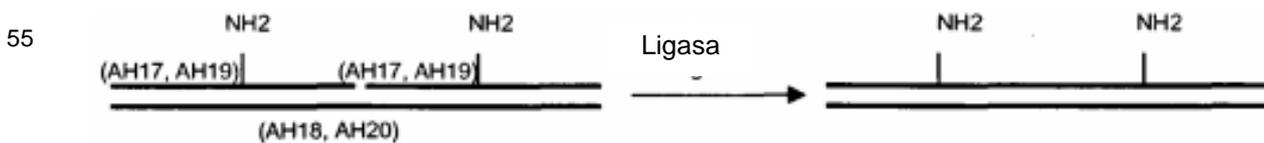
20 **[0828]** Ejemplos de enlazadores (indicados por un anillo de puntos) y de entidades funcionales



45 Ejemplo 112: ligación de oligonucleótidos de ADN, derivados en el nucleótido central.

**[0829]** Para examinar la deficiencia de los sustratos de varios derivados oligos de ADN para la ligasa de ADN de T4, los oligo-derivados Ah17 y Ah19 fueron recosidos a las plantillas Ah18 y Ah20, respectivamente. Cada una de las plantillas contiene 2 lugares de recosido para el oligo apropiado. El oligo-derivado contiene un nucleótido modificado en la posición del nucleótido central (refiérase a la figura más adelante).

50 **[0830]** La reacción puede ser representada esquemáticamente tal como se indica a continuación:



**X=** amino-modificador C6 dT

Ah 17: 5'- CACXGAA (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 55)

Ah 18: 5'- TCGGATTCAGTGTTCAGTGCCTAG (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 56)

Ah 19: 5'- TGCACXGAAGC (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 57)

5 Ah20: 5'- TCGGAGCTTCAGTGCAGCTTCAGTGCACGTAG (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 58)

10 **[0831]** Mezclar 0.5 microlitros del amortiguador a, 0.5 microlitros de Ah18 o Ah20 (1 pmol/μl), y 2 μl de Ah 17 o Ah18 (marcado con <sup>32</sup>P) (1 pmol/ μl). Recoser al calentar a 80 °C y luego enfriar a 10 °C. Agregar 3 μl de ligasa de T4-ADN (TAKARA, código #6022). Incubado a 4.7 °C durante alrededor de 48 horas. Luego analizarse por medio de electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea.

15 **[0832]** Tal como se ve en la figura 64, la ligasa de ADN es capaz de ligarse eficientemente a ambos oligo-derivados probados, es decir, aún con el oligo más corto (Ah17), con una longitud de 7 nucleótidos, y una modificación en la posición 4, la ligación se ejecuta para aproximadamente el 50% de terminación.

LISTAS DE SECUENCIAS

**[0833]**

20 <110> Nuevolution A/S

<120> Moléculas modeladas y métodos para usar aquellas moléculas

<130> TM1-PCT

25 <140> PCT/DK02/00419

<141> 2002-06-20

<150> PA 2001 00962

<151> 2001-06-20

30 <150> PA 2002 00415

<151> 2002-03-15

<160> 58

35 <170> Versión de la patente 3.1

<210> 1

<211> 15

40 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ninguna

45 <400> 1  
gctactggca tcggt 15

<210> 2

50 <211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

55 <223> ninguna

<400> 2  
gctgtctgca agtgataacc gatgccagta gc 32

5 <210> 3  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> ninguna

<400> 3  
gctactggca tcggt 15

15 <210> 4  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Ninguna

<400> 4  
gctgtctgca agtgatgacc gatgccagta gc 32

<210> 5  
<211> 15  
<212> ADN  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Ninguna

35 <400> 5  
gctactggca tcggt 15

<210> 6  
<211> 34  
40 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Ninguna

45 <400> 6  
gctgtctgca agtgacgtaa ccgatgccag tagc 34

<210> 7  
50 <211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Ninguna

<400> 7  
taagaccgat gccagtagc 19

5

<210> 8  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

10

<220>  
<223> Ninguna

<400> 8  
15 tagaccgatg ccagtagc 18

<210> 9  
<211> 18  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Ninguna

<400> 9  
25 tccgctactg gcatcggc 18

<210> 10  
<211> 18  
30 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Ninguna

<400> 10  
35 tgaaccgatg ccagtagc 18

<210> 11

<211> 18  
40 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Ninguna

45

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (18)..(18)  
<223> deoxi-timidina-C6-NH2, (Glen research, cat #10-1039-90)

50

<400> 11  
tccgctactg gcatcggn 18

<210> 12  
 <211> 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Ninguna

<220>  
 <221> característica\_misc  
 10 <222> (1)..(1)  
 <223> deoxi-timidina-C6-NH2, (Glen research, cat #10-1039-90)

<400> 12  
 ncacttgacg acagc 15

15 <210> 13  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Ninguna

<400> 13  
 25 gctgtctgca agtgaccgat gccagtagc 29

<210> 14  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Ninguna

<220>  
 35 <221> característica\_misc  
 <222> (18)..(18)  
 <223> deoxi-timidina-C2-COOH (Glen research, cat #10-1035-90)

<400> 14  
 40 tccgctactg gtatcggn 18

<210> 15  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Ninguna

50 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(1)  
 <223> deoxi-timidina-C2-COOH (Glen research, cat #10-1035-90)

<220>  
<221> base\_modificada  
<222> (1)..(1)  
<223>

5  
<400> 15  
ncacttgacg acagc 15

10  
<210> 16  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

15  
<220>  
<223> Ninguna

<400> 16  
gctactggca tcggt 15

20  
<210> 17  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

25  
<220>  
<223> Ninguna

<400> 17  
gctgtctgca agtgagtacc gatgccagta gc 32

30  
<210> 18  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

35  
<220>  
<223> Ninguna

<400> 18  
gtaattggag tgagccdda ccgatgccag tagc 34

40  
<210> 19  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

45  
<220>  
<223> ninguna

<400> 19  
tagaccgatg ccagtagc 18

50  
<210> 20  
<211> 56  
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> ninguna

5  
<220>  
<221> característica\_misc

10  
<222> (56)..(56)  
<223> deoxitimina-C2-COOH (Glen Research, cat #10-1035-)

<400> 20  
cgacctctgg attgcatcgg tcatggctga ctgtccgtcg aatgtgtcca gttacn 56

15  
<210> 21  
<211> 56  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

20  
<220>  
<223> ninguna

<220>  
<221> característica\_misc

25  
<222> (1)..(1)  
<223> deoxi-timidina-C6-NH2, (Glen research, cat #10-1039-90)

<400> 21  
ngtaactgga ctgtaagctg cctgtcagtc ggtactgacc tgtcgagcat ccagct 56

30  
<210> 22  
<211> 56  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

35  
<220>  
<223> ninguna

<220>  
<221> característica\_misc

40  
<222> (1)..(1)  
<223> deoxi-timidina-C6-NH2, (Glen research, cat #10-1039-90)

<400> 22  
ngtaacacct gtgtaagctg cctgtcagtc ggtactgacc tgtcgagcat ccagct 56

45  
<210> 23  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

50  
<220>  
<223> ninguna

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> deoxi-timidina-C6-NH2, (Glen research, cat #10-1039-90)

<400> 23  
 agctggatgc tcgacaggtc cccgatgcaat ccagaggtcg 40

10 <210> 24  
 <211> 56  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> ninguna

<220>  
 <221> característica\_misc  
 20 <222> (1)..(1)  
 <223> deoxi-timidina-C6-NH2, (Glen research, cat #10-1039-90)

<400> 24  
 ncattgacct gtgtaagctg cctgtcagtc ggtactgacc tgtcgagcat ccagct 56

25 <210> 25  
 <211> 56  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> ninguna

<220>  
 35 <221> característica\_misc  
 <222> (3)..(3)  
 <223> deoxi-timidina-C6-NH2, (Glen research, cat #10-1039-90)

<400> 25  
 40 agnaacacct gtgtaagctg cctgtcagtc ggtactgacc tgtcgagcat ccagct 56

<210> 26  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> ninguna

<220>  
 50 <221> característica\_misc

<222> (1)..(1)  
 <223> deoxi-timidina-C6-NH2, (Glen research, cat #10-1039-90)

# ES 2 571 835 T3

<400> 26  
nttgaactg gactgaagc tgcctgtcag tcggtactga cctgtcgagc atccagct 58

5 <210> 27  
<211> 58  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> ninguna

<220>  
<221> característica\_misc  
<223> carboxi-modificador C2 dT (Glenn Research cat. no. 10-1035-)

15 <220>  
<221> característica\_misc

20 <222> (58)..(58)  
<223> carboxi-modificador C2 dT (Glenn Research cat. no. 10-1035-)

<400> 27  
cgacctctgg attgcatcgg tcatggctga ctgtccgtcg aatgtgtcca gttactn 58

25 <210> 28  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

30 <220>  
<223> ninguna

<220>  
<221> característica\_misc  
35 <222> (10)..(10)  
<223> carboxi-modificador C2 dT (Glenn Research cat. no. 10-1035-)

<400> 28  
gctactggcn tcggt 15

40 <210> 29  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> ninguna

<220>  
<221> característica\_misc

50 <222> (6)..(6)  
<223> carboxi-modificador C2 dT (Glenn Research cat. no. 10-1035-)

<400> 29

tcactngcag acagc 15

5 <210> 30  
 <211> 56  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> ninguna

10 <220>  
 <221> característica\_misc

15 <222> (56)..(56)  
 <223> carboxi-modificador C2 dT (Glenn Research cat. no. 10-1035-)

<400> 30  
 ctggaacgc ggatcgacct tcatggctga ctgtccgtcg aatgtgtcca gttacn 56

20 <210> 31  
 <211> 56  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> ninguna

<220>  
 <221> característica\_misc

30 <222> (56)..(56)  
 <223> carboxi-modificador C2 dT (Glenn Research cat. no. 10-1035-)

35 <400> 31  
 acgactacgt tcaggcaaga tcatggctga ctgtccgtcg aatgtgtcca gttacn 56

40 <210> 32  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> ninguna

45 <220>  
 <221> característica\_misc

<222> (31)..(31)

<223> carboxi-modificador C2 dT (Glenn Research cat. no. 10-1035-)

50 <400> 32  
 gacctgtcga gcatccagct gtccacaatg n 31

- 5 <210> 33  
 <211> 46  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
 <223> ninguna  
 <220>
- 10 <221> característica\_misc  
 <222> (46)..(46)  
 <223> carboxi-modificador C2 dT (Glenn Research cat. no. 10-1035-)
- <400> 33  
 15 gacctgtcga gcatccagct tcatgggaat tcctcgtcca caatgn 46
- <210> 34  
 <211> 47  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
 <223> ninguna
- 25 <220>  
 <221> característica\_misc
- <222> (46)..(46)  
 <223> carboxi-modificador C2 dT (Glenn Research cat. no. 10-1035-)
- 30 <400> 34  
 gacctgtcga gcatccagct tcatgggaat tcctcgtcca caatgnt 47
- <210> 35  
 35 <211> 56  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
 40 <223> ninguna
- <220>  
 <221> característica\_misc
- 45 <222> (1)..(1)  
 <223> carboxi-modificador C2 dT (Glenn Research cat. no. 10-1035-)
- <400> 35  
 ngtaactgga gggaagctc atccgaattc ggtactgacc tgcgagcat ccagct 56
- 50 <210> 36  
 <211> 57
- <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> ninguna

5

<220>  
<221> característica\_misc

10

<222> (1)..(1)  
<223> 5'-Tiol-modificador C6 (Glen Research cat. No. #10-1926-)

<220>  
<221> característica\_misc

15

<222> (19)..(19)  
<223> biotina interna-C4 (Glen Research cat. #10-1953-)

<400> 36  
ncattgacct gtgtaagcnc gcctgtcagt cggctactcga cctctggatt gcatcgg 57

20

<210> 37  
<211> 52  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

25

<220>  
<223> ninguna

30

<220>  
<221> características\_misc

<222> (1)..(1)  
<223> 5'- Tiol-modificador C6 (Glen Research cat. No. #10-1926-)

35

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (18)..(18)  
<223> biotina interna -C4 (Glen Research cat. #10-1953-)

40

<400> 37  
ncattgacct gtctgcctng tcagtcggta ctgtggaac gcggatcgac ct 52

45

<210> 38  
<211> 62  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> ninguna

50

<220>  
<221> característica\_misc

ES 2 571 835 T3

<222> (1)..(1)  
<223> 5'- Tiol-modificador C6 (Glen Research cat. No. #10-1926-)  
  
<220>  
<221> característica\_misc  
5  
  
<222> (19)..(19)  
<223> biotina interna -C4 (Glen Research cat. #10-1953-)  
  
<400> 38  
10 ncatcgacct gaaccatgnt aagctgcctg tcagtcggta ctacgactac gttcaggcaa 60  
ga 62  
  
<210> 39  
<211> 62  
15 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> ninguna  
20  
  
<220>  
<221> característica\_misc  
  
<222> (1)..(1)  
25 <223> 5'-Tiol-modificador C6 (Glen Research cat. No. #10-1926-)  
  
<220>  
<221> característica\_misc  
  
30 <222> (20)..(20)  
<223> biotina interna-C4 (Glen Research cat. #10-1953-)  
  
<400> 39  
ncatcgacct gaaccatgtn aagctgcctg tcagtcggta ctcaaggat ccacgtgacc 60  
35 ag 62  
<210> 40  
<211> 56  
<212> ADN  
40 <213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> ninguna  
  
45 <220>  
<221> característica\_misc  
  
<222> (1)..(1)  
<223> modificador de aminos C6 dT (10-1039-90 de Glen Research)  
50  
  
<400> 40  
ngtaacacct gtgtaagctg cctgtcagtc ggtactgacc tgtcgagcat ccagct 56

- <210> 41  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
 <223> ninguna
- <220>  
 10 <221> característica\_misc  
 <222> (41)..(41)  
 <223> modificador amino C6 dT (Glen Research Cat. # 10-1039-)
- <400> 41  
 15 gacctgtcga gcatccagct tcatggctga gtccacaatg n 41
- <210> 42  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
 <223> ninguna
- <220>  
 25 <221> característica\_misc  
 <222> (17)..(17)  
 <223> biotina-C4 interna (Glen Research cat. #10-1953-)
- <400> 42  
 30 cattgtttt tttttnttt tttttttgc atacaactat gta 43
- <210> 43  
 <211> 43  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
 <223> ninguna
- <220>  
 40 <221> característica\_misc  
 <222> (17)..(17)  
 <223> biotina-C4 interna (Glen Research cat. #10-1953-)
- <400> 43  
 45 cattgtttt tttttnttt tttttttgc atacggctat gta 43
- <210> 44  
 <211> 43  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
 55 <223> ninguna

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (17)..(17)  
 5 <223> biotina-C4 interna (Glen Research cat. #10-1953-)  
  
 <400> 44  
 cattgtttt tttttnttt tttttttgc atacgactat gta 43  
  
 10 <210> 45  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> ninguna  
  
 <400> 45  
 cattgtttt ttttttttt tttttttgc atacagctat gta 43  
  
 20 <210> 46  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> ninguna  
  
 <220>  
 30 <221> característica\_misc  
 <222> (27)..(27)  
 <223> biotina-C4 interna (Glen Research cat. #10-1953-)  
  
 <400> 46  
 35 gtaccgaaat gcgtatttt tttttnttt tttttttca atg 43  
  
 <210> 47  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> ninguna  
  
 45 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (27)..(27)  
 <223> biotina-C4 interna (Glen Research cat. #10-1953-)  
  
 50 <400> 47  
 gtaccgaggt gcgtatttt tttttnttt tttttttca atg 43  
  
 <210> 48  
 <211> 43

<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

5 <220>  
<223> ninguna

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (27)..(27)  
10 <223> biotina-C4 interna (Glen Research cat. #10-1953-)

<400> 48  
gtaccgaagt gcgtatntt tttttntt ttttttca atg 43

15 <210> 49  
<211> 43  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> ninguna

<400> 49  
gtaccgagat gcgtatntt tttttntt ttttttca atg 43

25 <210> 50  
<211> 55  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

30 <220>  
<223> ninguna

<400> 50  
tacatagttg tatgcaataa tacatagttg tatgcaataa tacatagttg tatgc 55

35 <210> 51  
<211> 55  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

40 <220>  
<223> ninguna

45 <400> 51  
tacatagccg tatgcaataa tacatagccg tatgcaataa tacatagccg tatgc 55

50 <210> 52  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> ninguna

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (14)..(14)  
<223> deoxitimina-C6-NH2 (Glen Research cat. # 10-1035-)

5  
<400> 52  
gctactggca tcgng 15

10  
<210> 53  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

15  
<220>  
<223> ninguna

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (1)..(1)  
20 <223> 5'-yodo-guanina

<400> 53  
ncactgcag acagc 15

25  
<210> 54  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

30  
<220>  
<223> ninguna

<220>  
<221> característica\_misc  
35 <222> (16)..(16)  
<223> cualquiera de a o g o c o t

<220>  
<221> característica\_misc  
40 <222> (18)..(18)  
<223> cualquiera de a o g o c o t

<400> 54  
gctgtctgca agtgcnanac acgatgccag tagc 34

45  
<210> 55  
<211> 7  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

50  
<220>  
<223> ninguna

<220>

<221> característica\_misc  
 <222> (4)..(4)  
 <223> deoxi-timidina-C6-NH2, (Glen research, cat #10-1039-90)

5 <400> 55  
 cacngaa 7

<210> 56  
 <211> 24  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> ninguna

15 <400> 56  
 tcggattcag tgttcagtgc gtag 24 <210> 57

<211> 11  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> ninguna

25 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (6)..(6)  
 <223> deoxi-timidina-C6-NH2, (Glen research, cat #10-1039-90)

30 <400> 57  
 tgcacngaag c 11

<210> 58  
 <211> 32  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> ninguna

40 <400> 58  
 tcggagcttc agtgcagctt cagtcacgt ag 32

45

50

55

**Reivindicaciones**

1. Un método para sintetizar una composición de moléculas de diferentes plantillas que comprenden una pluralidad de grupos funcionales, comprendiendo dicho método las etapas de

5 i) proporcionar una pluralidad de plantillas que tienen diferentes elementos de codificación y / o un orden diferente de elementos de codificación, dichas plantillas que comprenden una pluralidad de nucleótidos y una secuencia de 3 a 100 elementos de codificación,

10 en el que cada elemento de codificación comprende al menos un grupo de reconocimiento capaz de reconocer un predeterminado elemento que complementa, y

en el que cada elemento de codificación comprende o consiste en de 4 a 100 subunidades,  
ii) proporcionar una pluralidad de bloques de construcción, en el que cada bloque comprende la construcción

15 a) al menos un elemento de complementación que comprende al menos un grupo de reconocimiento capaz de reconocer un elemento de codificación predeterminado,

b) al menos una entidad funcional que comprende al menos un grupo funcional y al menos un grupo reactivo, y

20 c) al menos un enlazador que separa la al menos una entidad funcional desde el al menos un elemento que complementa,

iii) poner en contacto cada uno de dichos elementos de codificación con un elemento de complementación capaz de reconocer dicha codificación elemento, dicho elemento comprende una pluralidad de nucleótidos complementando,

25 iv) formar una plantilla complementando que comprende al menos 3 elementos de complementación en la forma de un lineal secuencia de elementos que complementan por enzimáticamente que una dicho por lo menos 3 elementos de complementación, y

30 v) la obtención de una composición de diferentes moléculas con plantilla comprendiendo cada uno unido covalentemente, grupos funcionales mediante la vinculación de un grupo funcional de al menos una entidad funcional a un grupo funcional de otra entidad funcional,

en donde la molécula de plantilla está unida por medio de un conector a la plantilla o la plantilla complementaria a la templated la síntesis de la molécula de plantilla, y

35 en el que la síntesis de las moléculas con plantilla no implica traducción mediada por ribosomas de un ácido nucleico.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la molécula de molde está unida por medio de un solo enlazador a la complementación plantilla o plantilla que templated la síntesis de la molécula de plantilla.

40 3. El método de la reivindicación 1, en donde las etapas iii) a través de v) se repiten para diferentes bloques de construcción.

4. El método de la reivindicación 1, en el que los elementos de codificación forman una secuencia lineal.

45 5. El método de la reivindicación 1, en el que cada plantilla contiene de 3 a 10 elementos de codificación.

6. El método de la reivindicación 1, en el que los elementos de codificación comprenden o consisten en de 7 a 60 subunidades.

50 7. El método de la reivindicación 1, en el que se obtienen más de  $10^3$  moléculas de plantilla diferente.

8. El método de la reivindicación 1, en el que las moléculas con plantilla se seleccionan del grupo que consiste en mono-funcional, hidrocarburos de cadena abierta di-funcionales, tri-funcional y oligo-funcional; mono-funcional, funcional di-tri-funcional, y, carbociclos no aromáticos oligo-funcional; mono-cíclico, bicíclico, tricíclico y poli-cíclico, hidrocarburos;puenteados, hidrocarburos sin poli-cíclico; mono-funcional, di-funcional, tri-funcional y oligo-funcional, no aromáticoheterociclos; , heterociclos tri-cíclico y poli-cíclicos mono-cíclico, bi-cíclico; heterociclos con puente policíclicos; monofuncional,, carbociclos aromáticos difuncionales, tri-funcional y oligo-funcional; mono-cíclico, bicíclico, tricíclico y, carbociclos aromáticos policíclicos; mono-funcional, di-funcional, tri-funcional y oligo-funcional, aromático heterociclos; y mono-cíclico, heterociclos bi-cíclico, tri-cíclicos y policíclicos.

9. El método de la reivindicación 1, en el que la molécula de plantilla no es un péptido.

10. Una pluralidad de diferentes complejos que comprenden moléculas pequeñas no peptídicas,, en donde cada molécula pequeña no peptídico, está unido covalentemente por medio de un enlazador covalente a un producto de doble cadena de nucleótidos complementaria de oligonucleótidos que identifican la molécula pequeña, no peptídico.

I Figura 1. Presentación química - principio

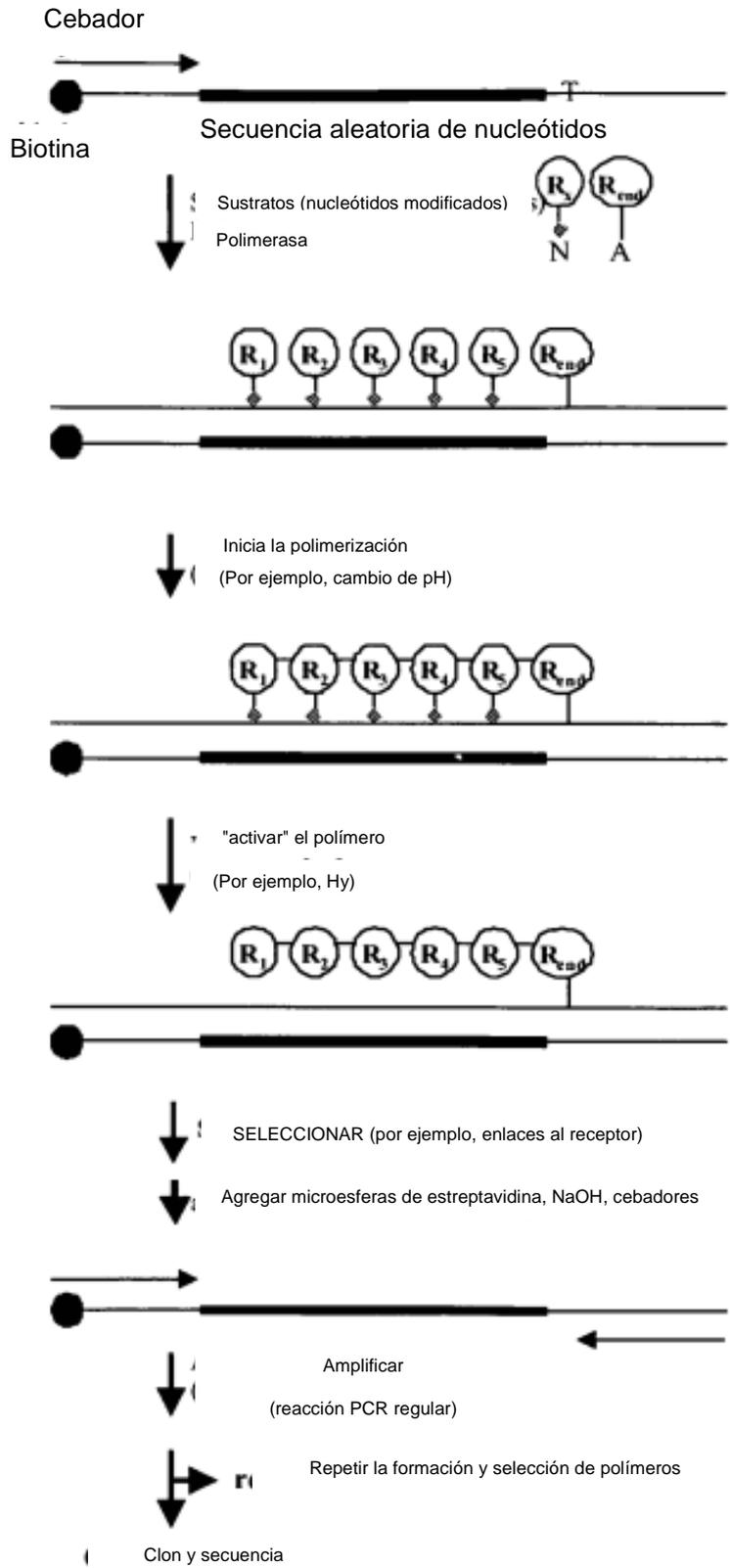


Figura 2a. Un conjunto expandido de parejas base

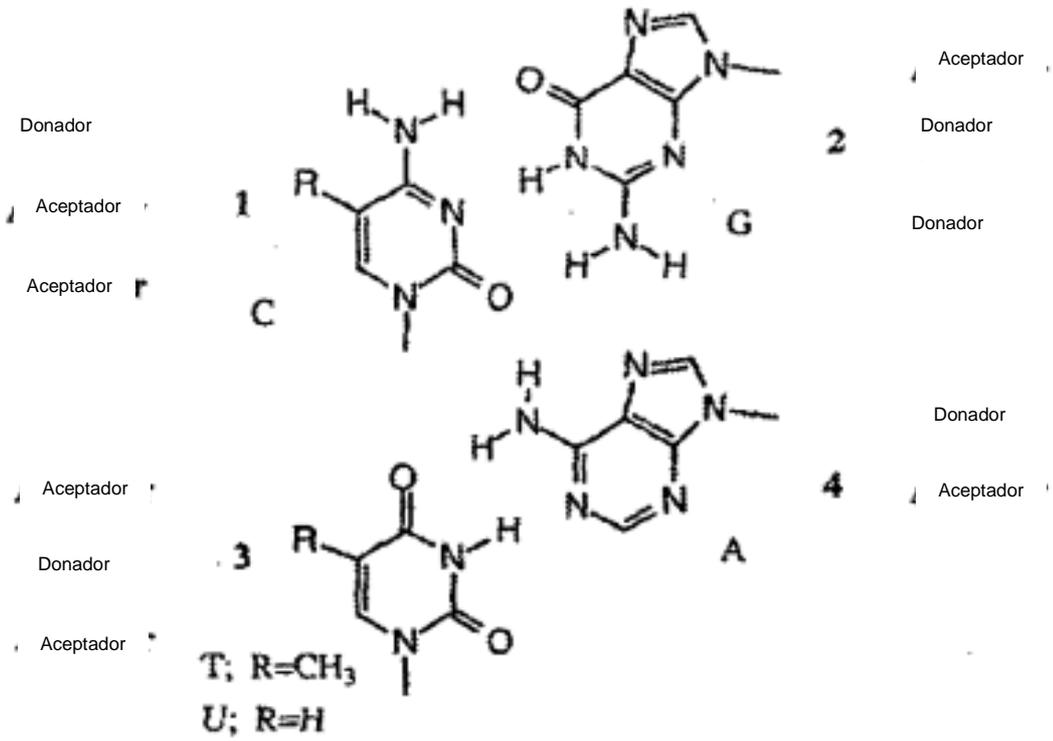


Figura 2b. Un conjunto expandido de parejas base

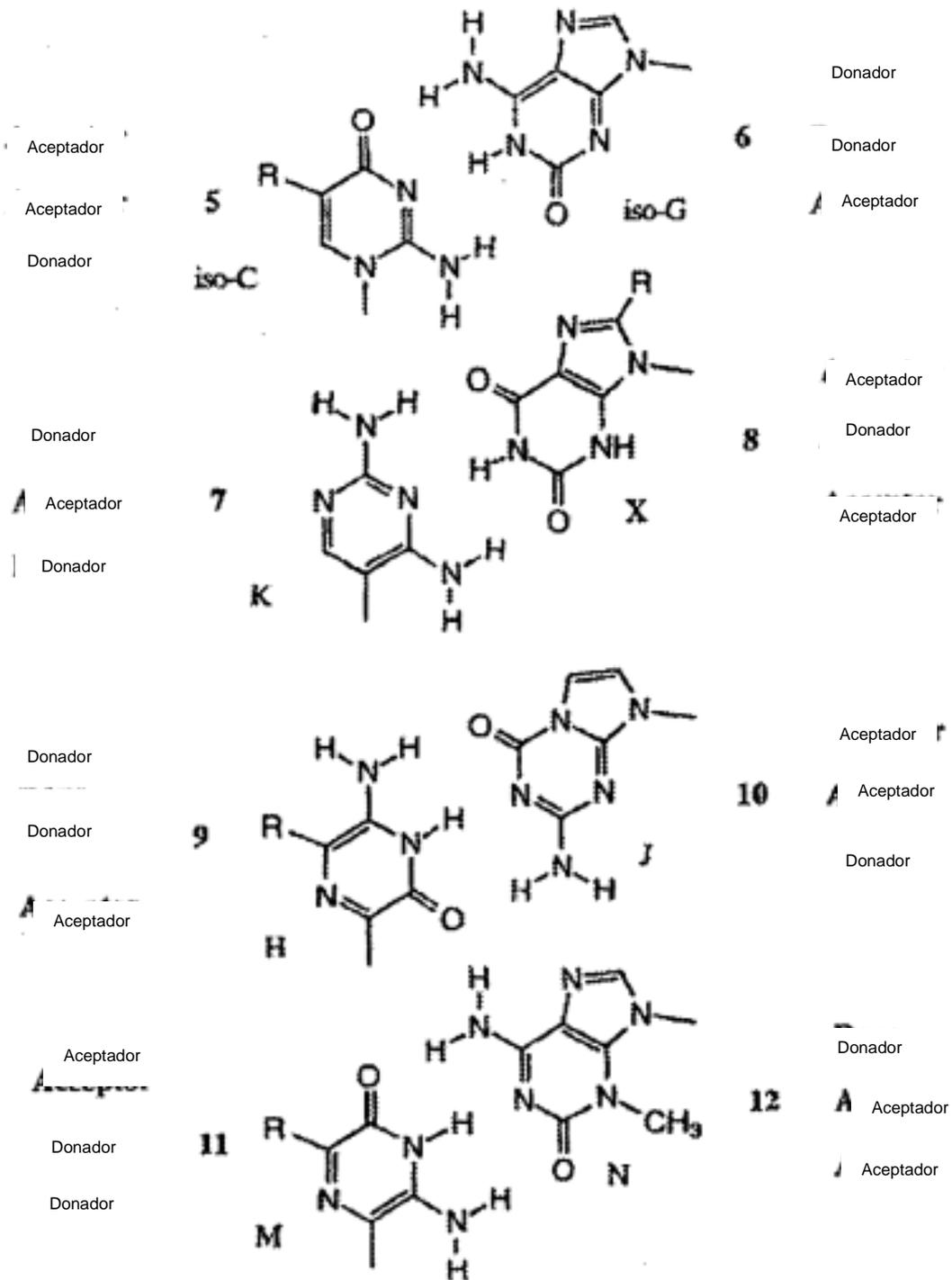


Figura 3. Un bloque monomérico de construcción

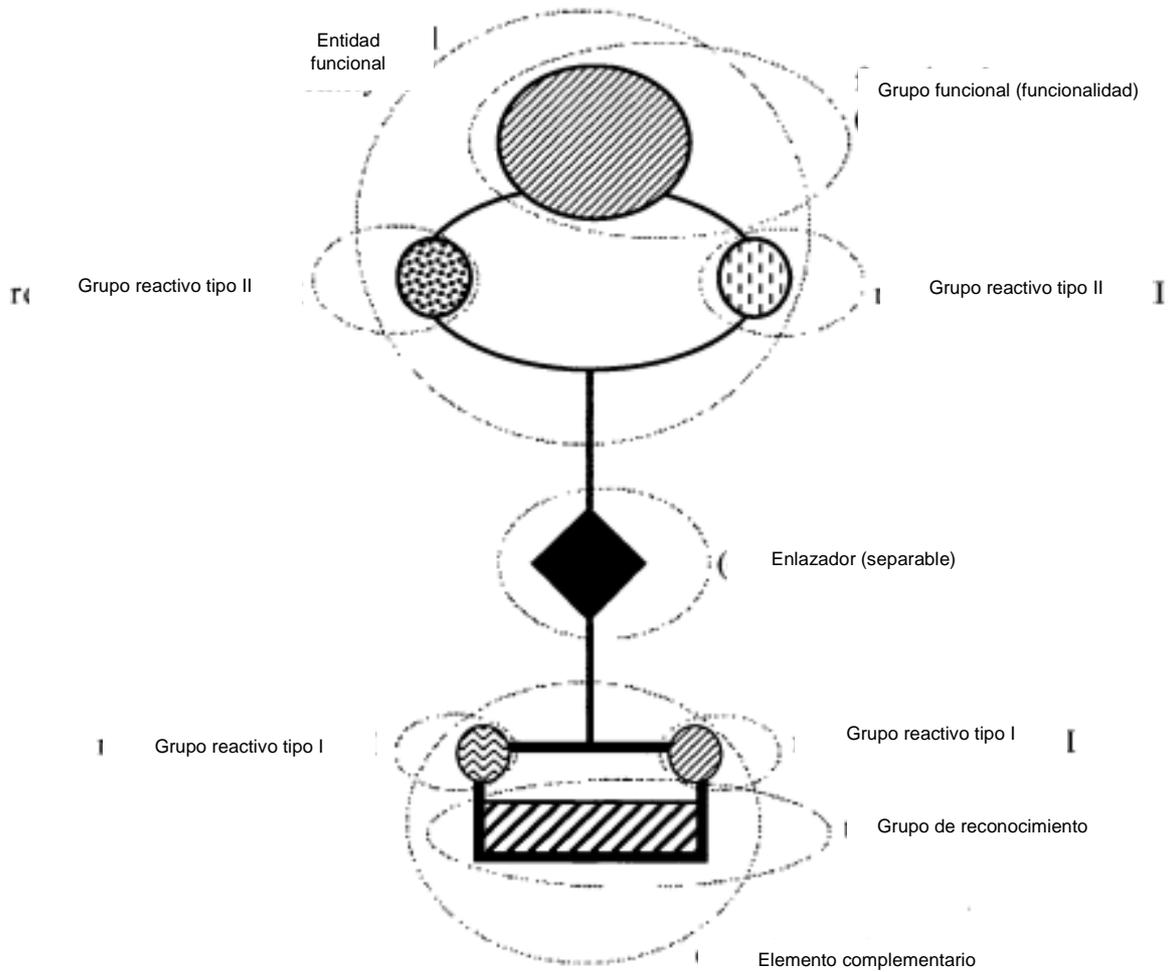


Figura 4. Un bloque monomérico de construcción con solamente un grupo reactivo tipo II

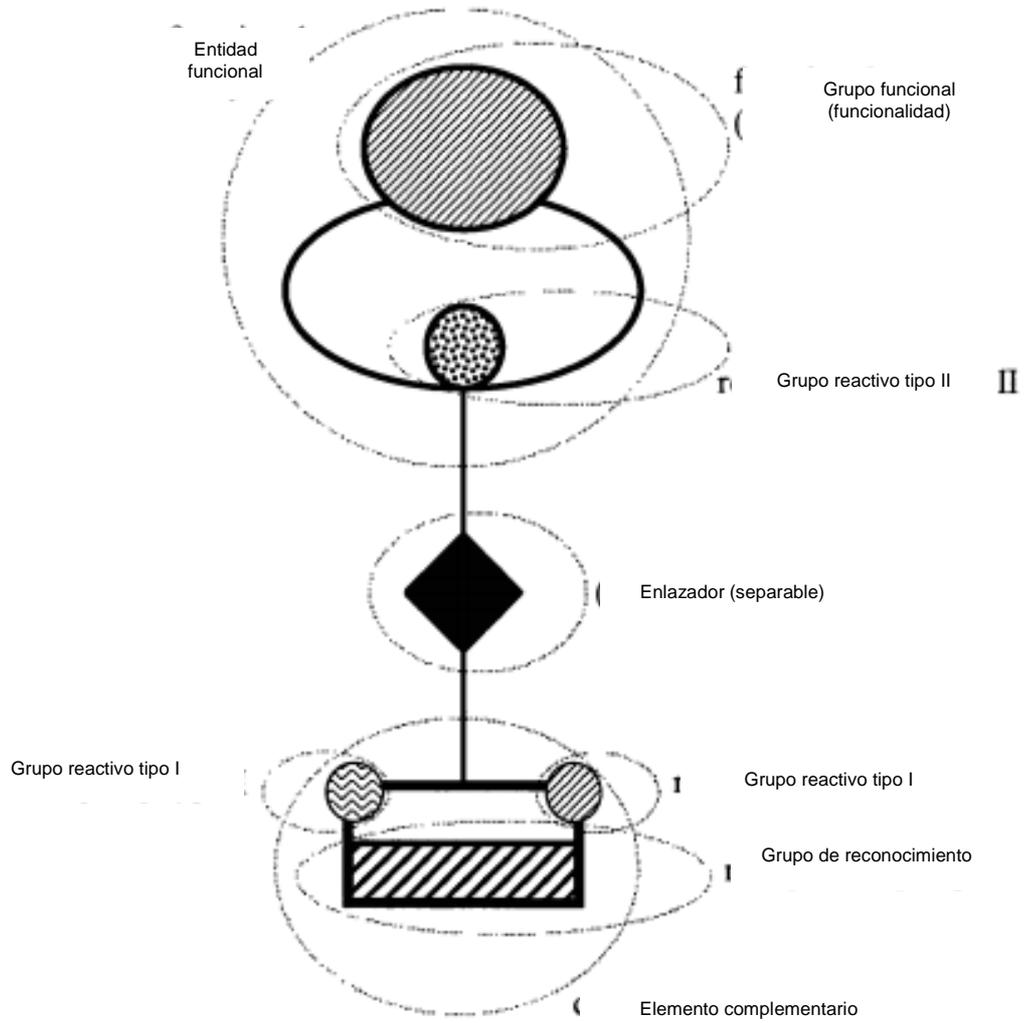


Figura 5. Bloques de construcción y los polímeros que resultan de la incorporación dirigida por plantillas de los bloques de construcción y de su polimerización y activación

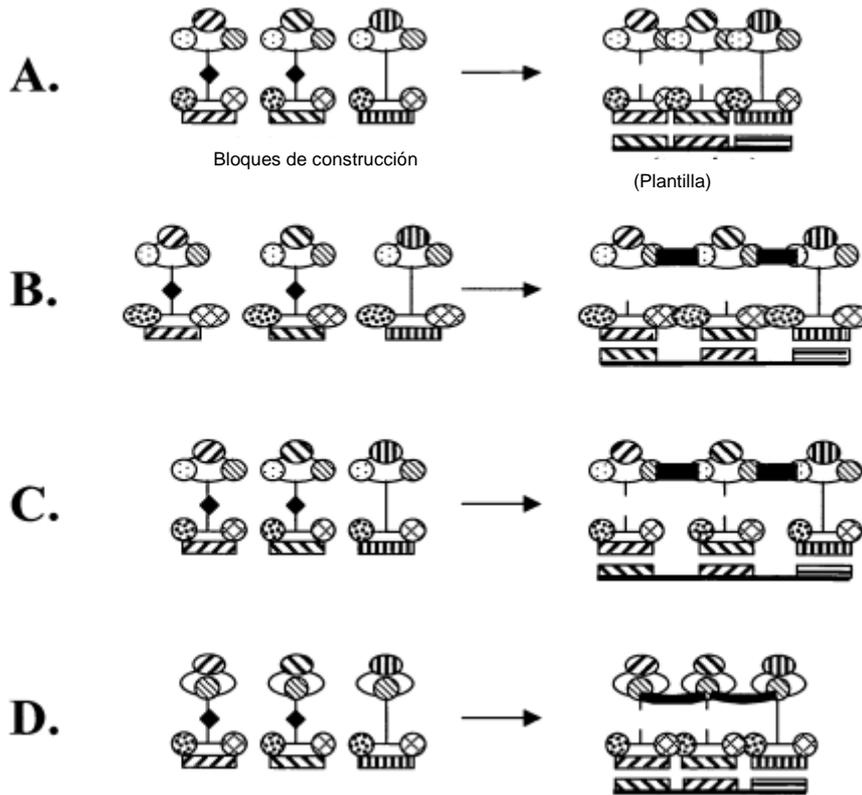


Figura 6.

Un nucleótido derivado en forma de bloque de construcción

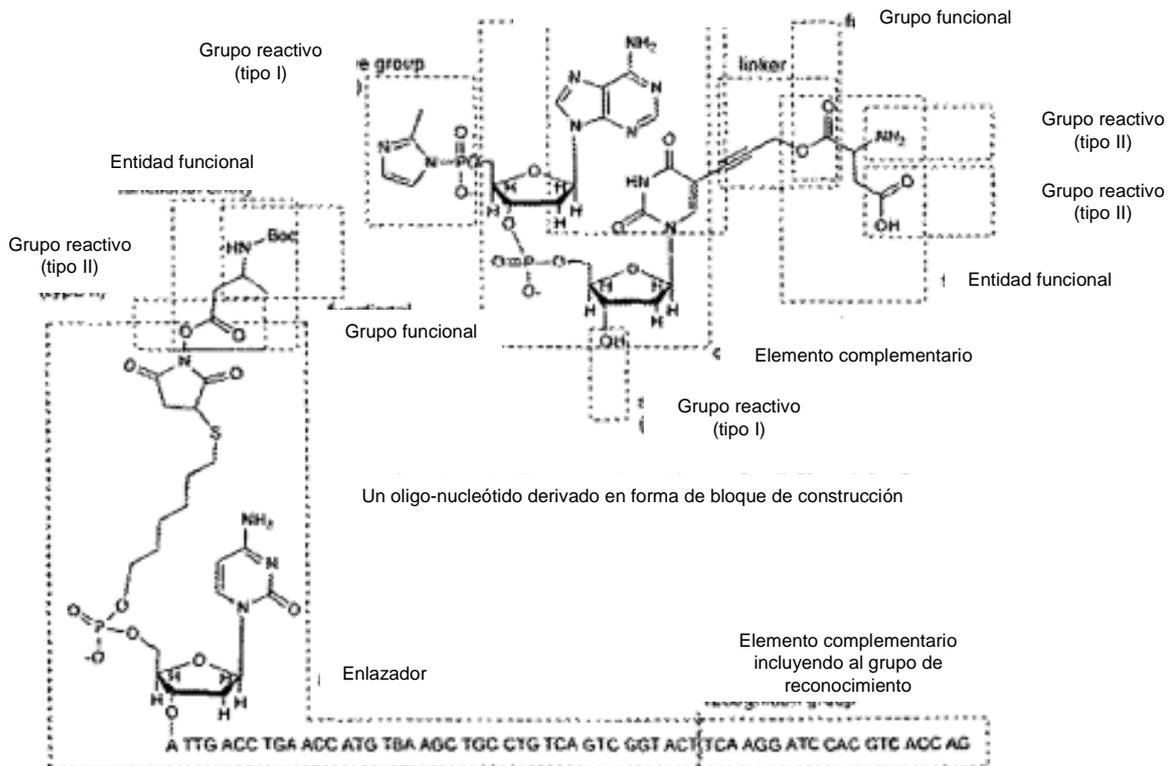
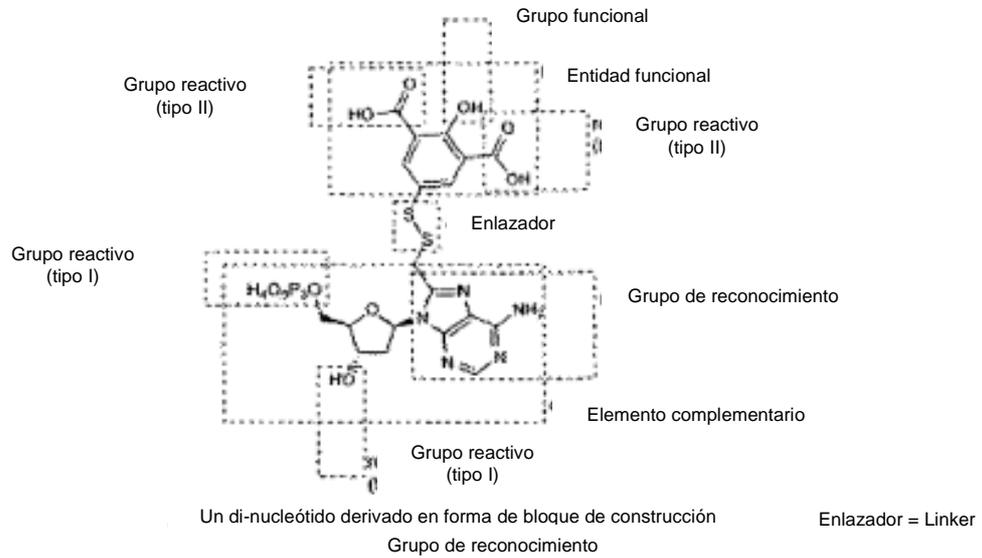


Figura 7. Marcación de la terminal C de un β-peptido-incorporación, polimerización y activación. Un ejemplo

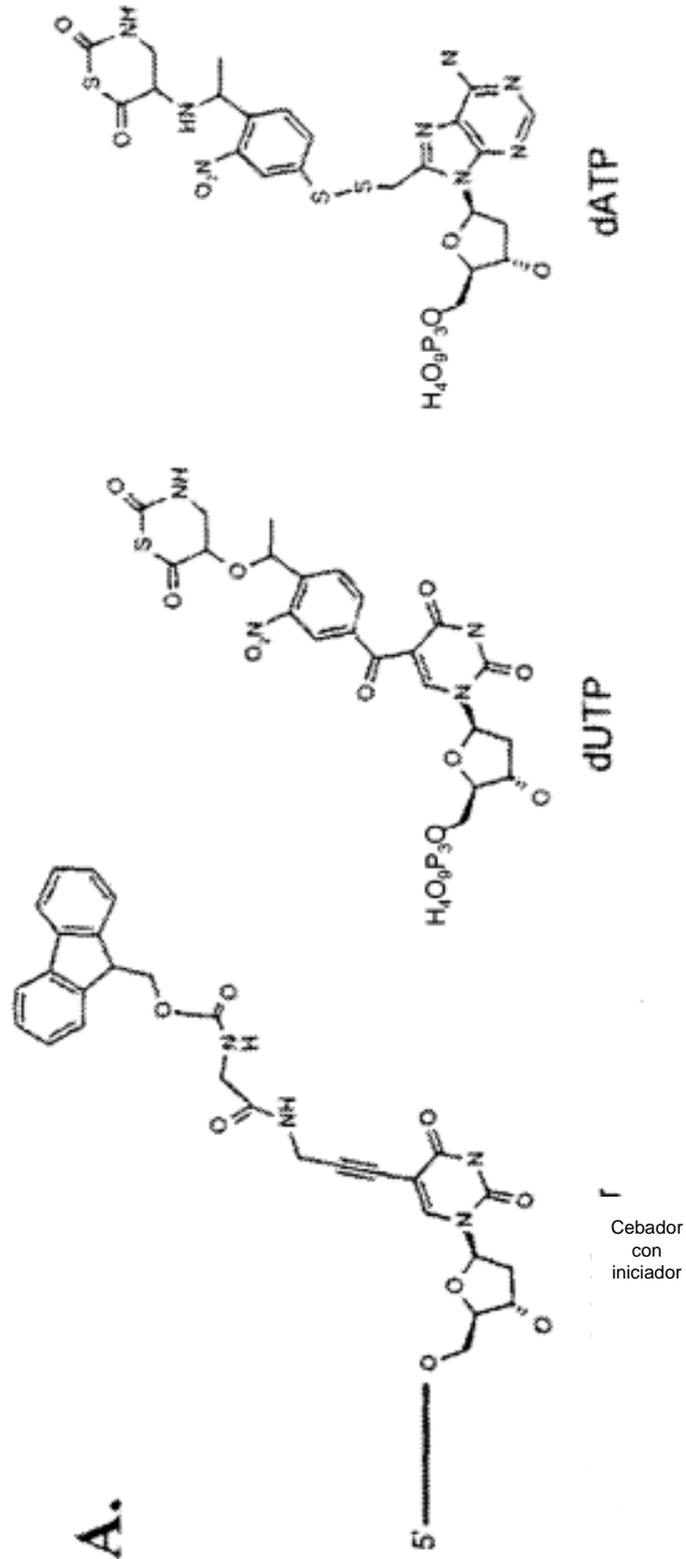
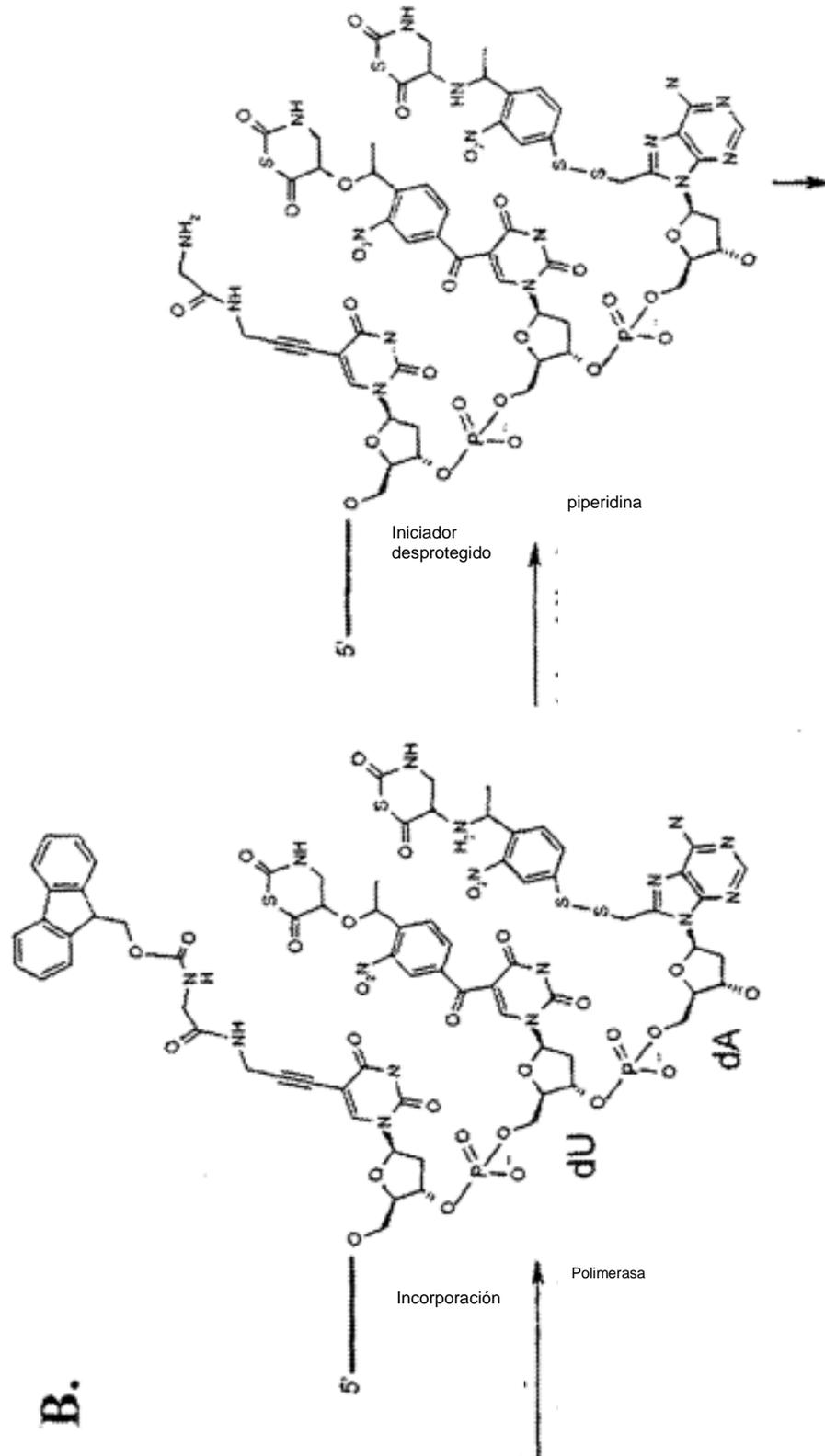


Figura 7. Marcación de la terminal C de un β-peptido-incorporación, polimerización y activación. Un ejemplo



**B.**

Figura 7. Marcación de la terminal C de un  $\beta$ -péptido-incorporación, polimerización y activación. Un ejemplo

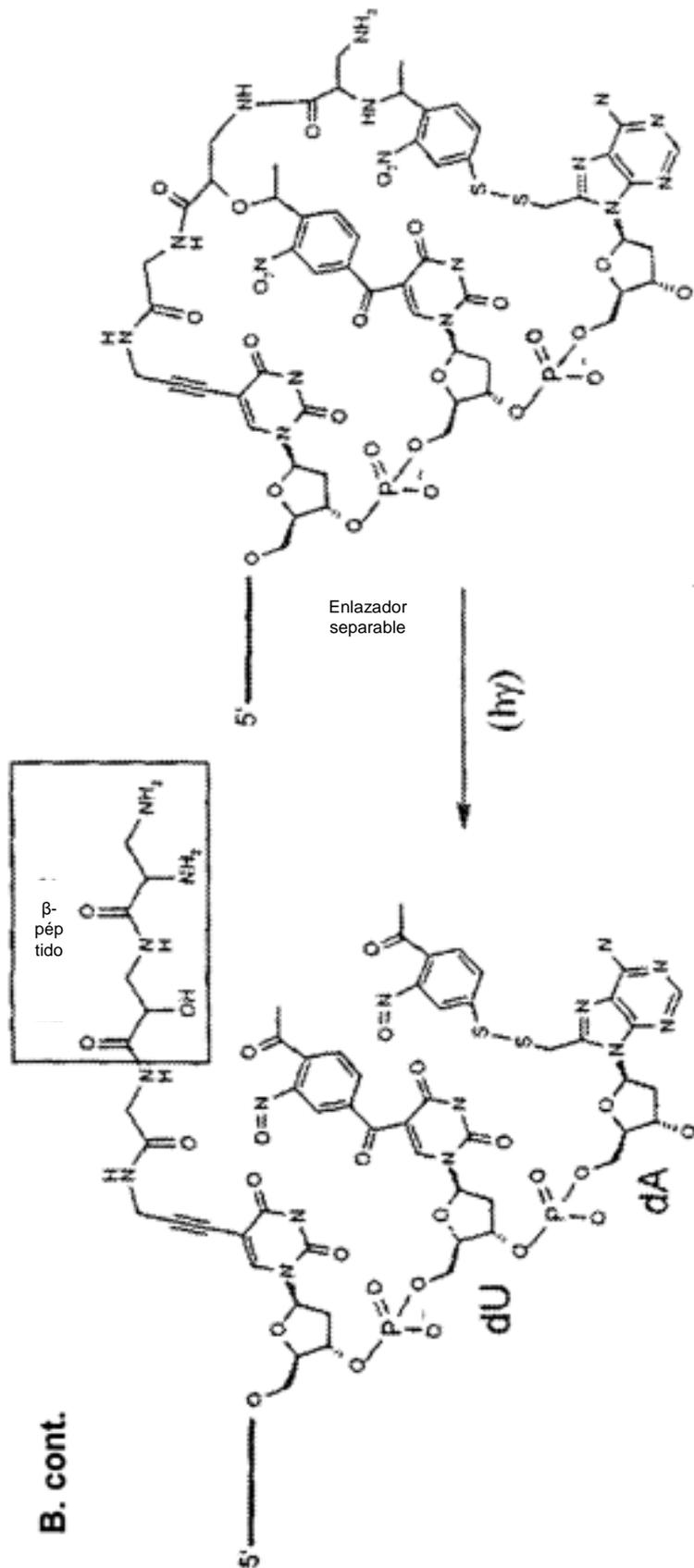


Figura 7. Marcación de la terminal C de un  $\beta$ -péptido-incorporación, polimerización y activación

C.

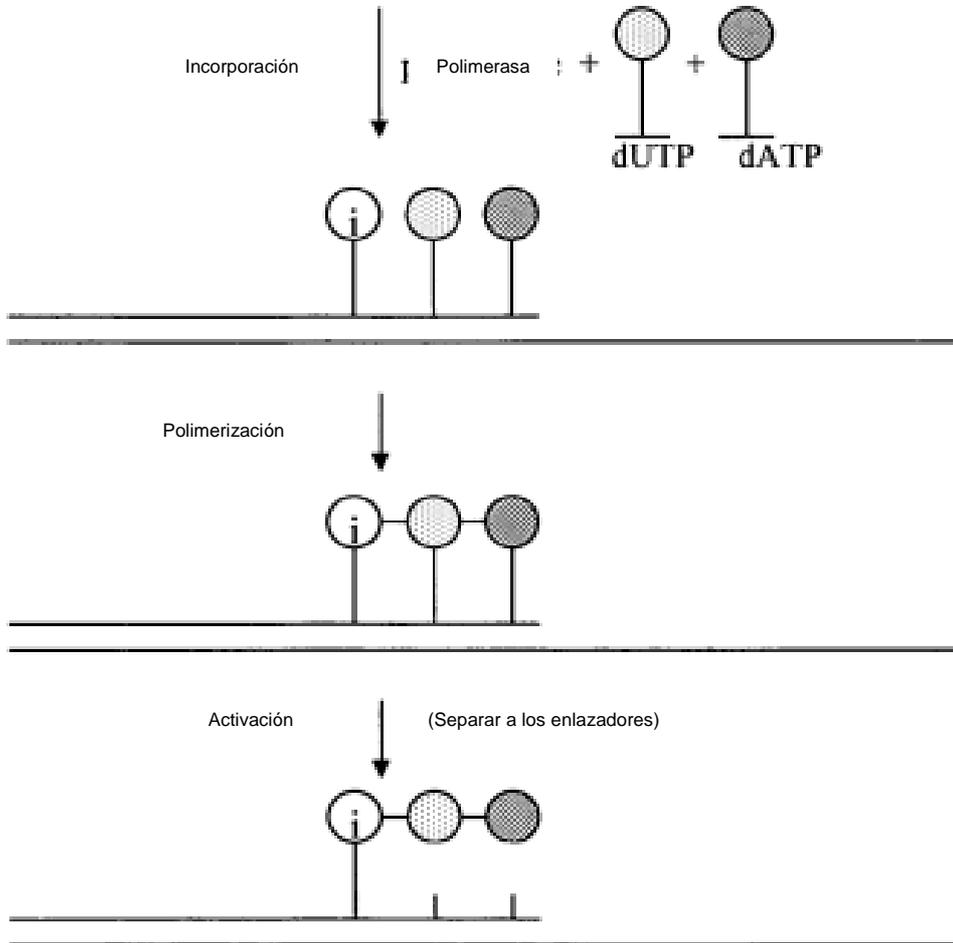


Figura 8. Marcación de la terminal N de un  $\beta$ -dipéptido-incorporación, polimerización y activación

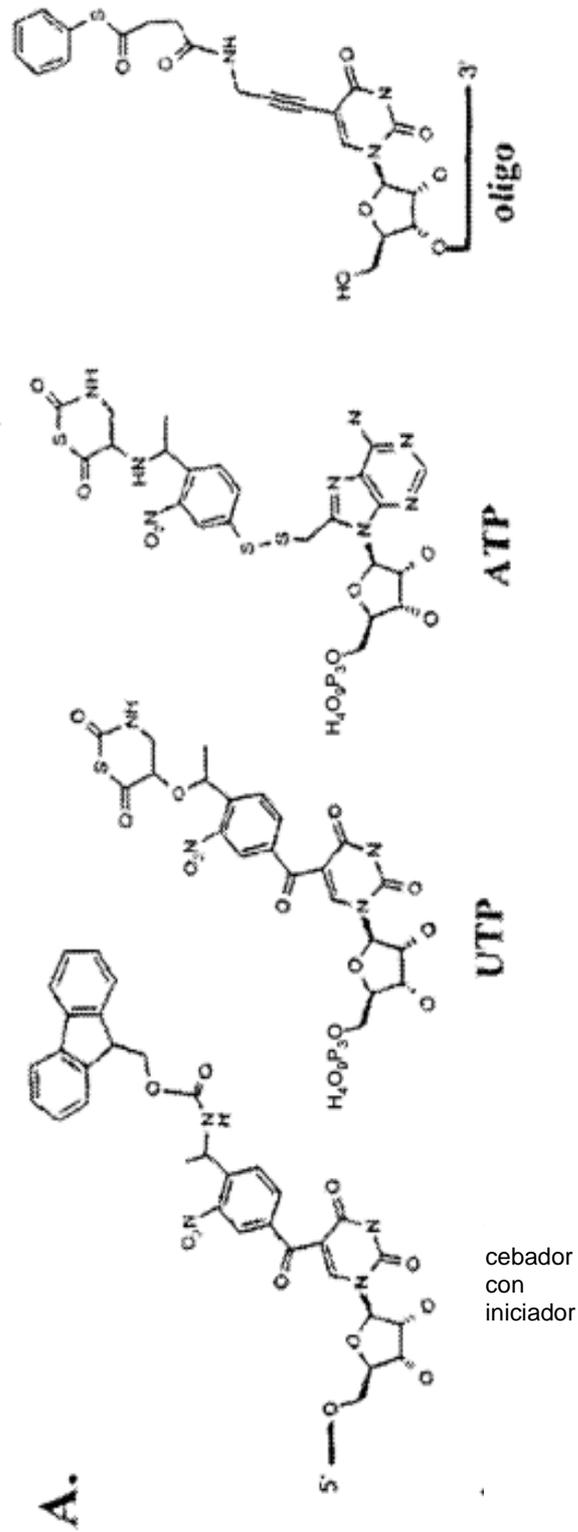


Figura 8. Marcación de la terminal N de un  $\beta$ -dipéptido-incorporación, polimerización y activación.

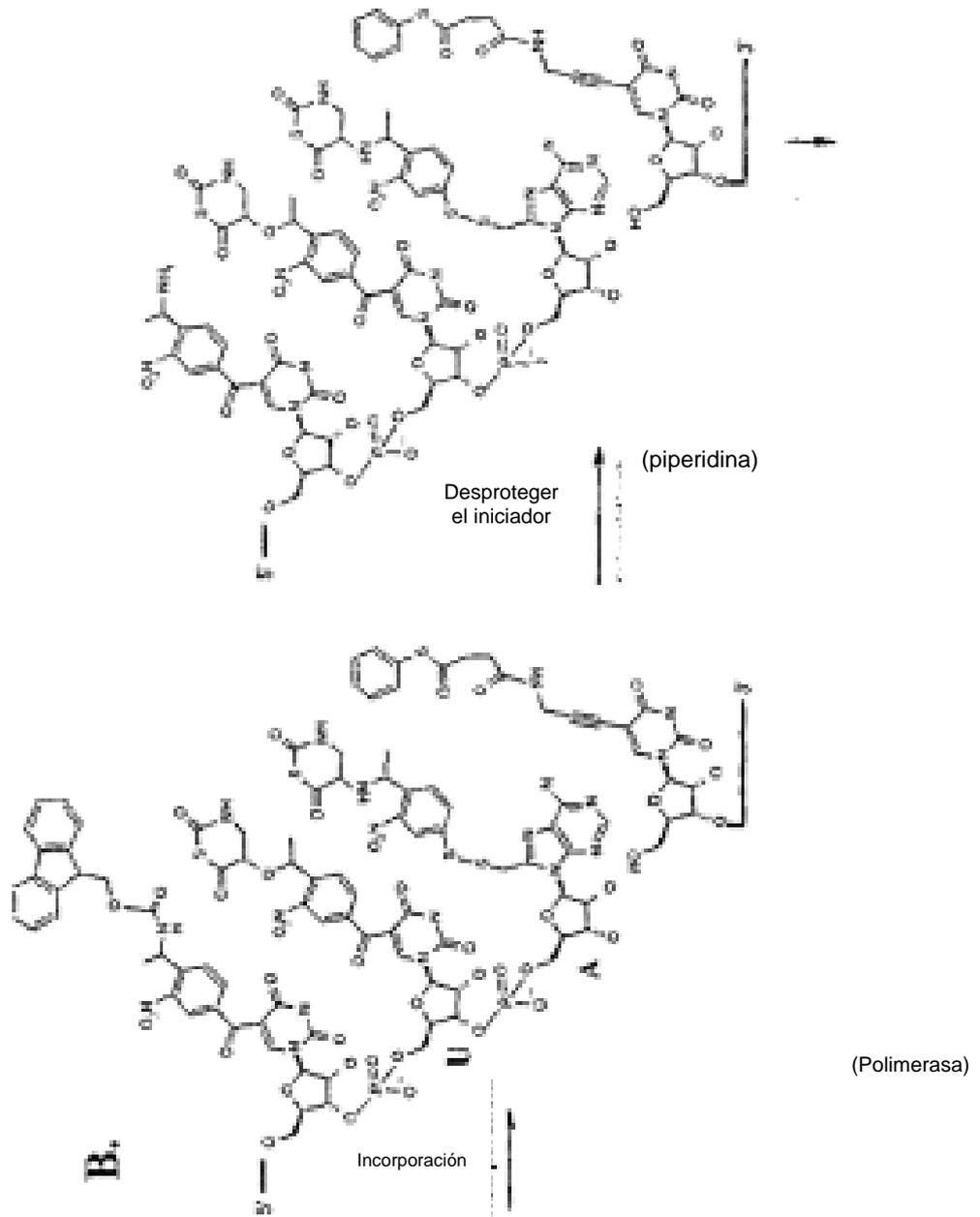


Figura 8. Marcación de la terminal N de un β-dipéptido-incorporación, polimerización y activación.

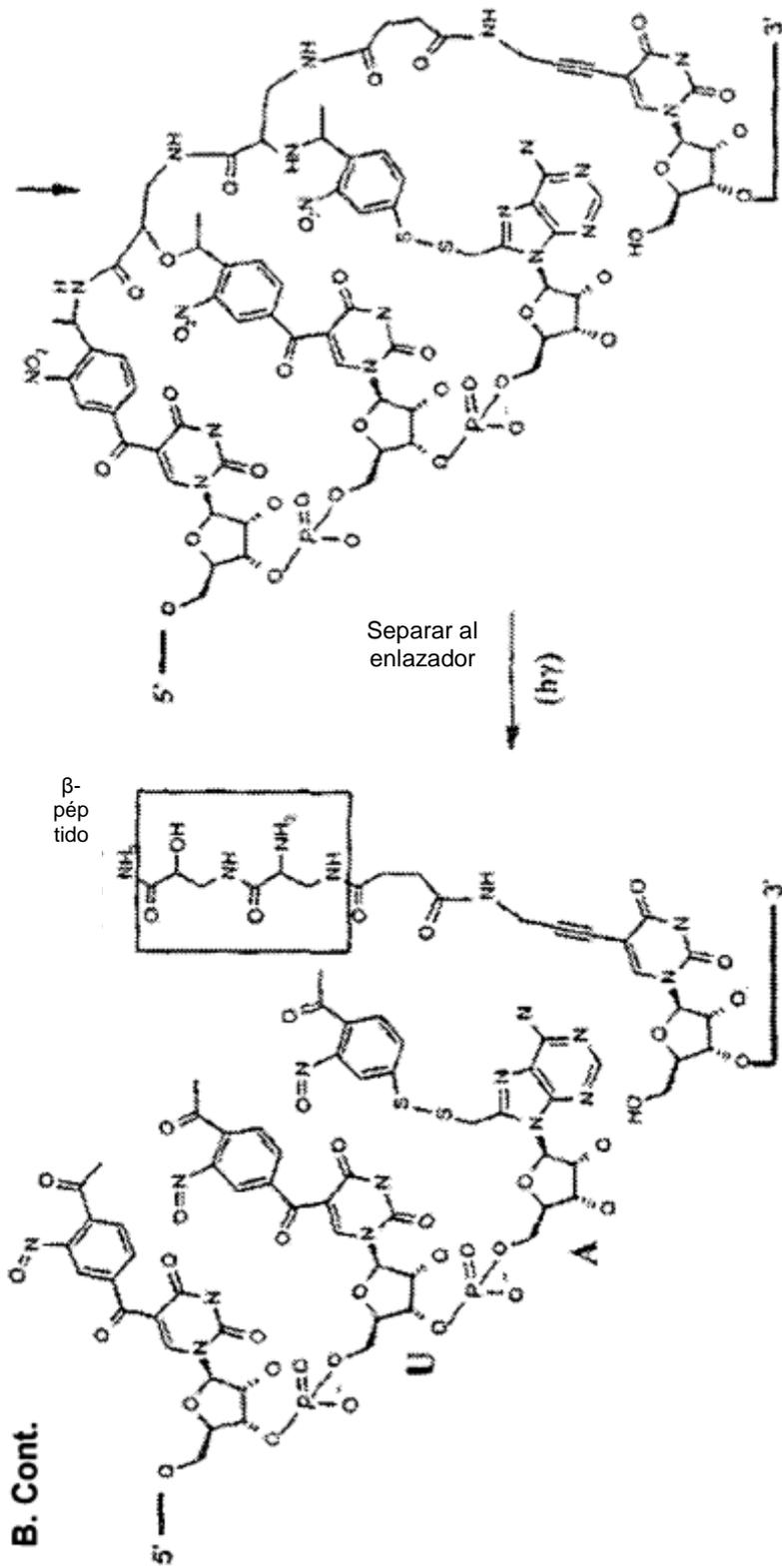


Figura 8. Marcación de la terminal N de  $\beta$ - dipéptidos - incorporación, polimerización y activación

C.

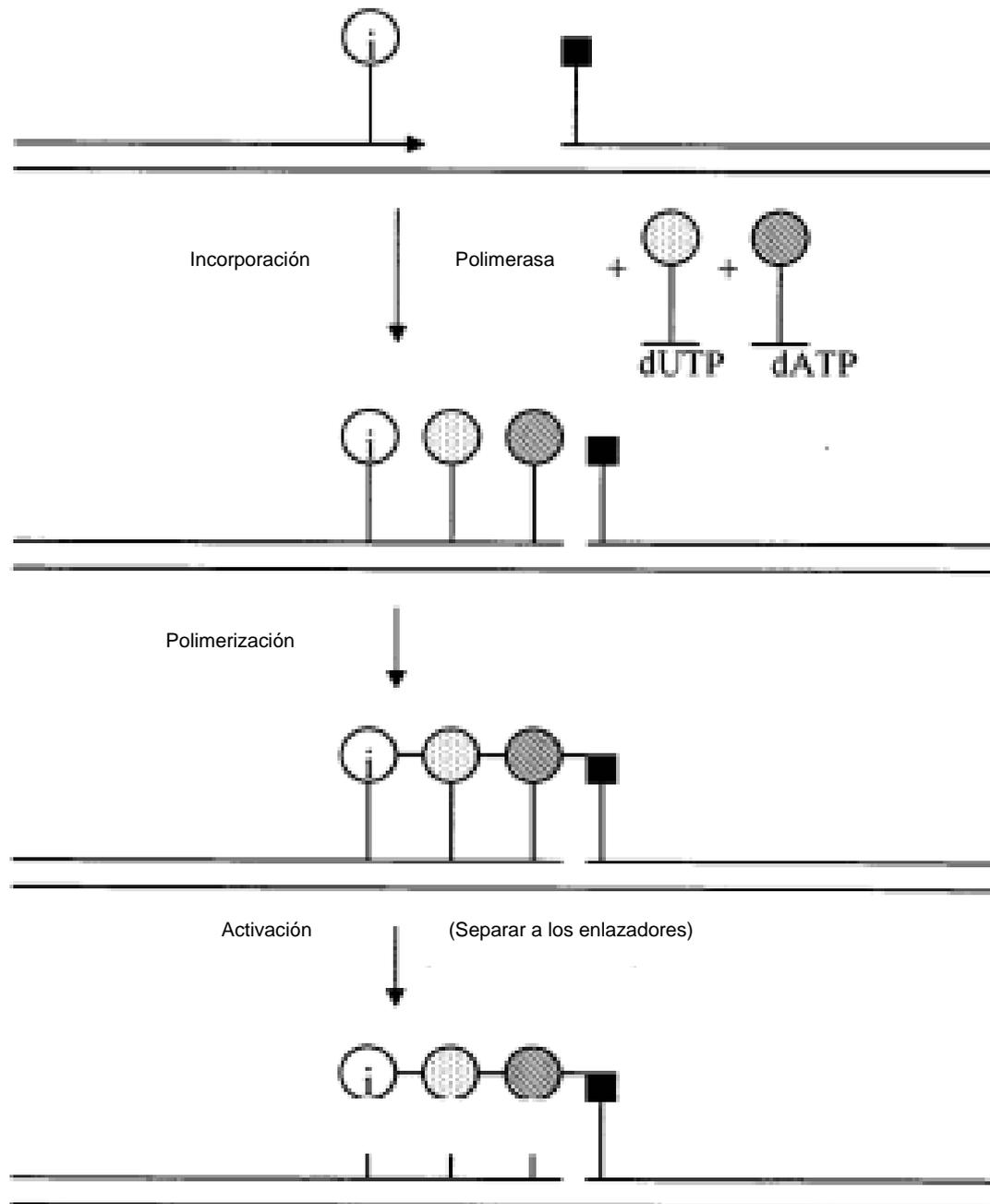
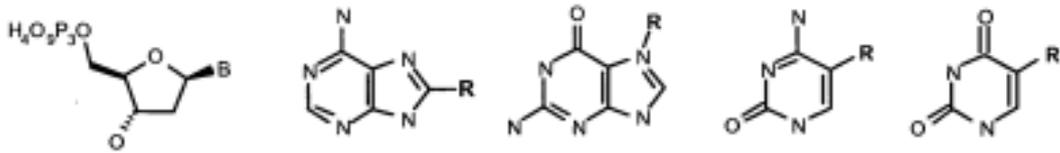


Figura 9. Derivados de nucleótidos que son conocidos por ser incorporados por las polimerasas bases y el lugar de modificación (-R)



Derivados de nucleótidos incorporados y extendidos (-R)

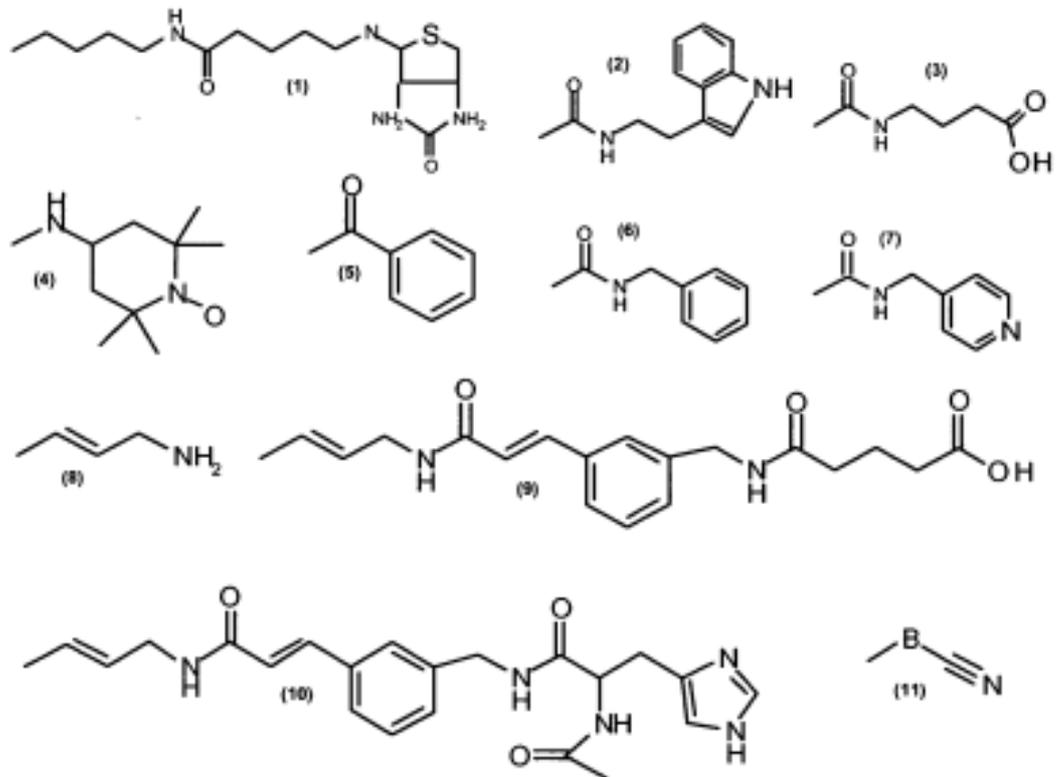


Figura 9. Cont.

Derivados de nucleótidos para la formación de polímeros codificados (-R)

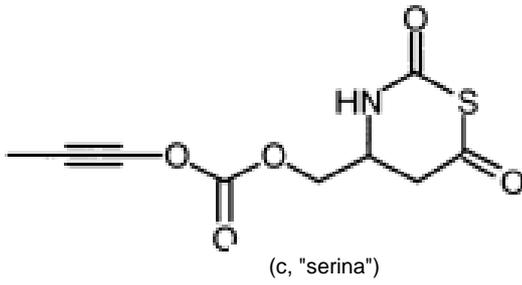
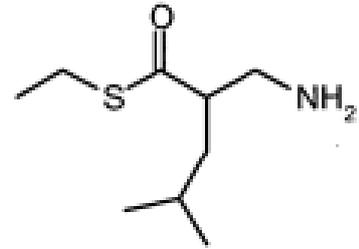
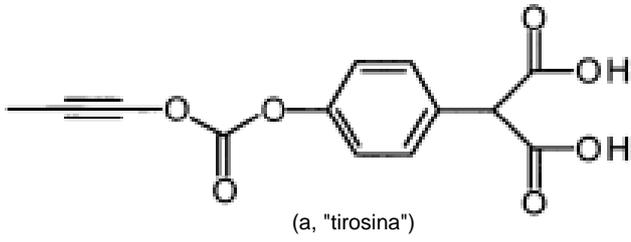
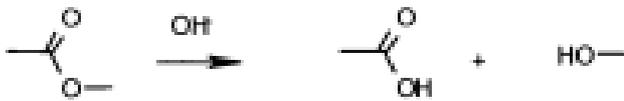


Figura 10. Enlazadores separables y grupos de protección, agentes separadores y productos de separación.



B. Fotoseparación

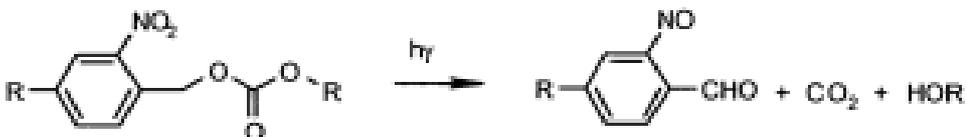


Figura 10. Cont.

B. Agregar una separación

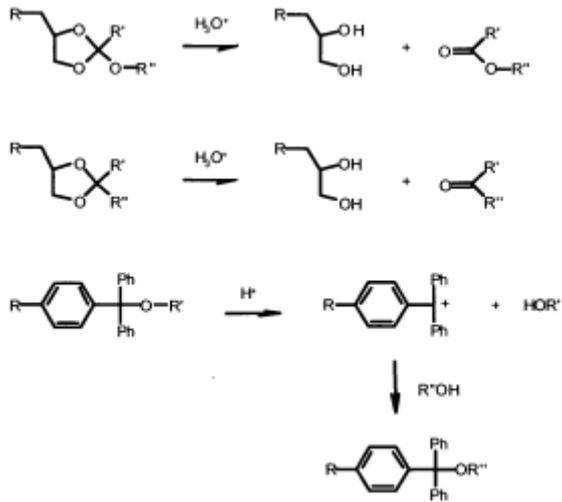
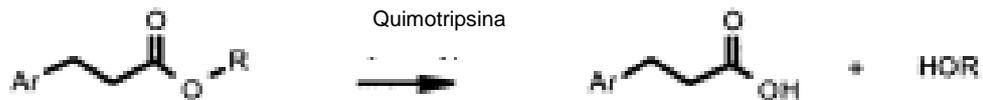
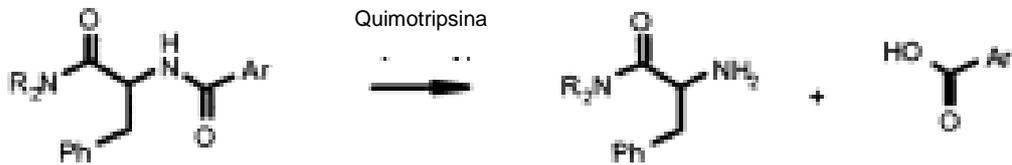


Figura 10. Cont.

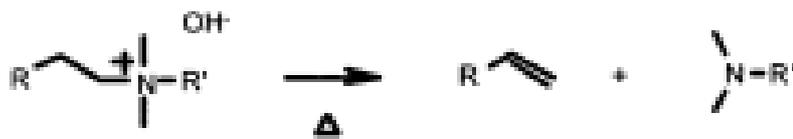
D. separación catalítica



E. Separación enzimática



F. Separación por incremento de temperatura



G. Misceláneo



Figura 11. Polimerización por medio de la reacción entre los grupos reactivos tipo II cercanos

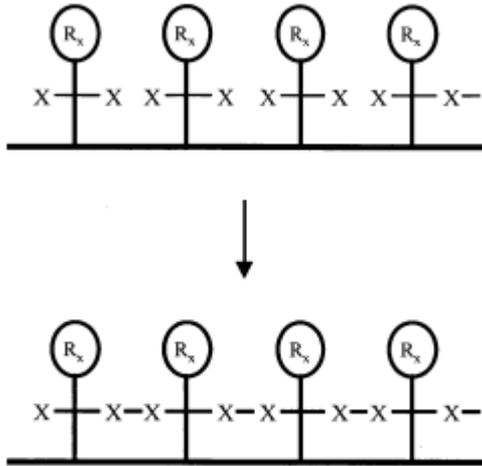


Figura 11, ejemplo 1. Polimerización que se basa en la cumarina

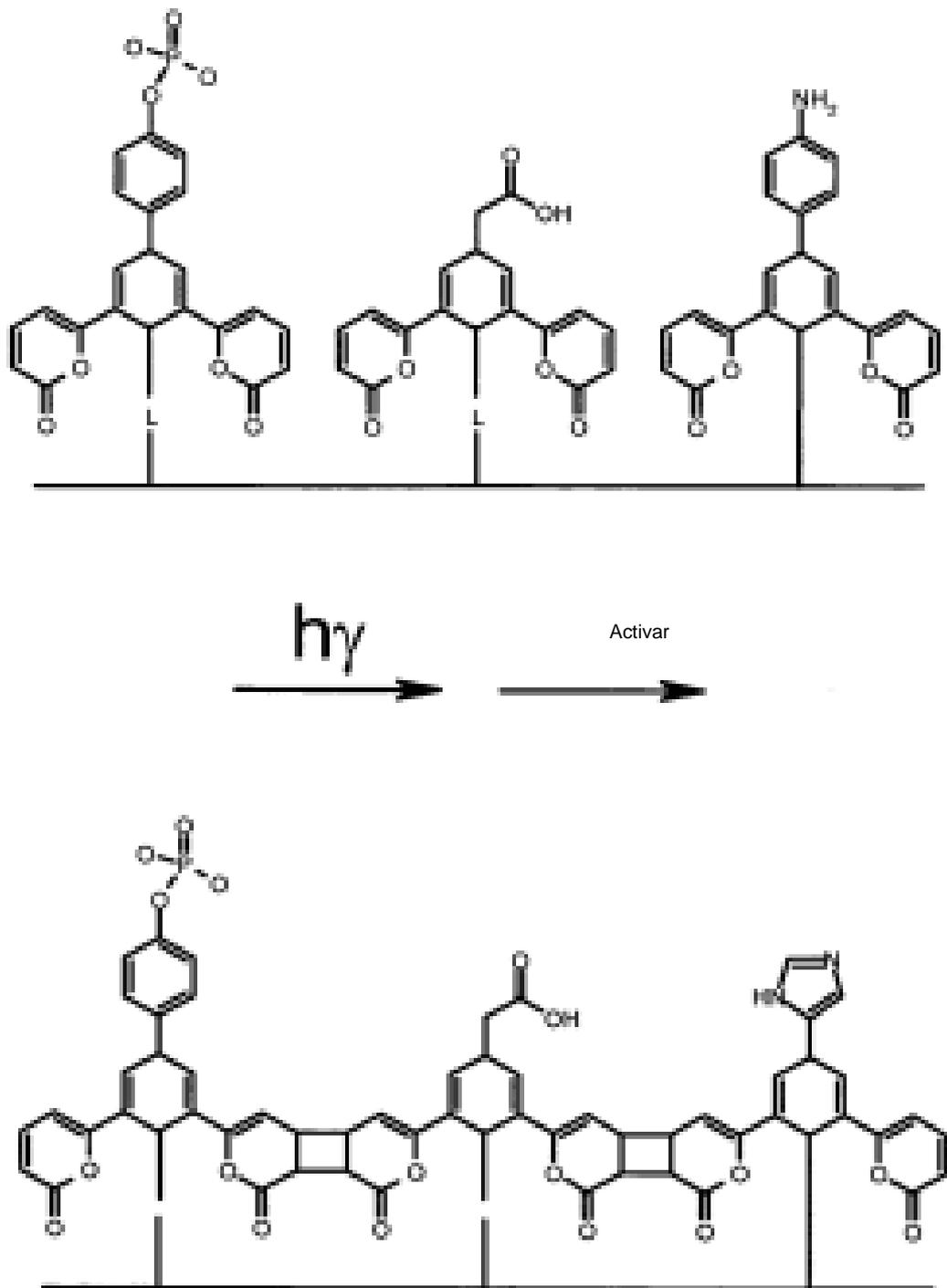


Figura 12. Polimerización entre los grupos reactivos tipo II no idénticos cercanos

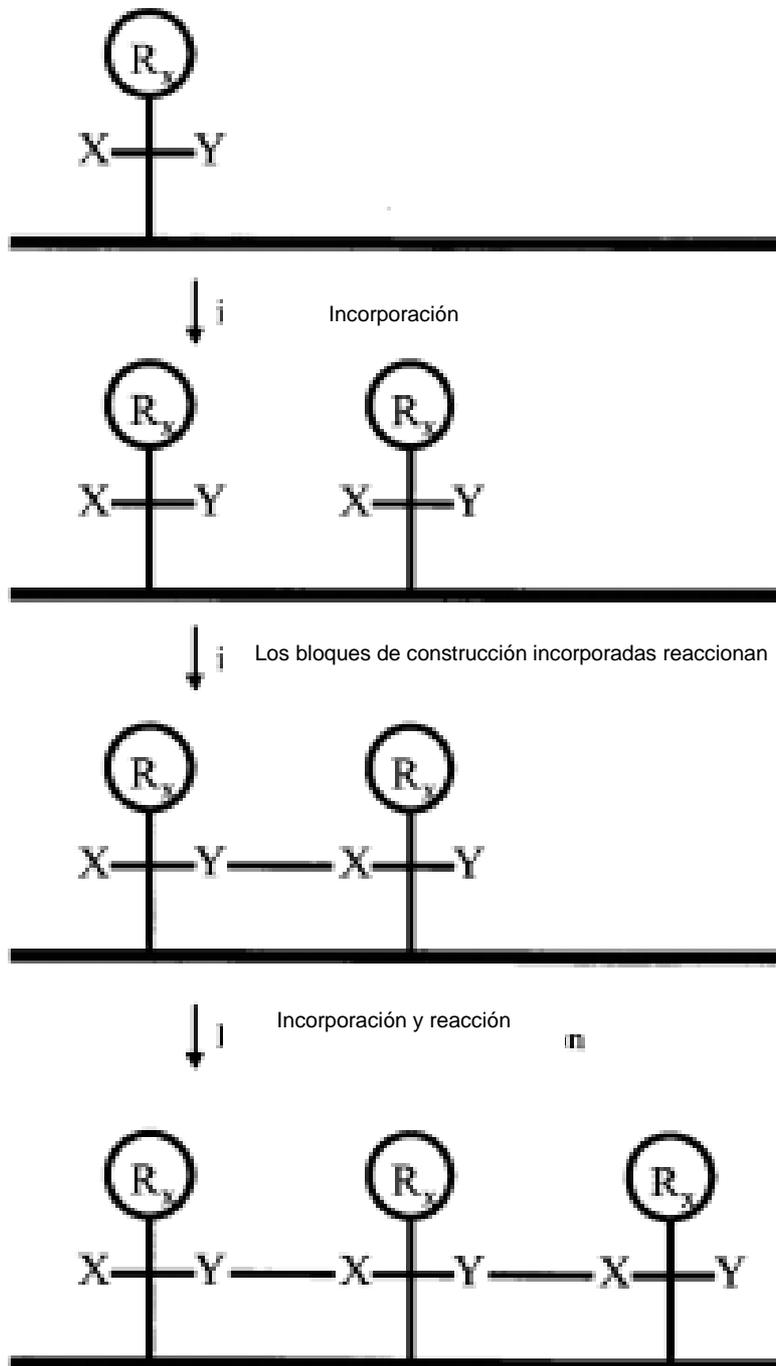


Figura 13. Formación de ordenamientos en la ausencia de una polimerización direccional

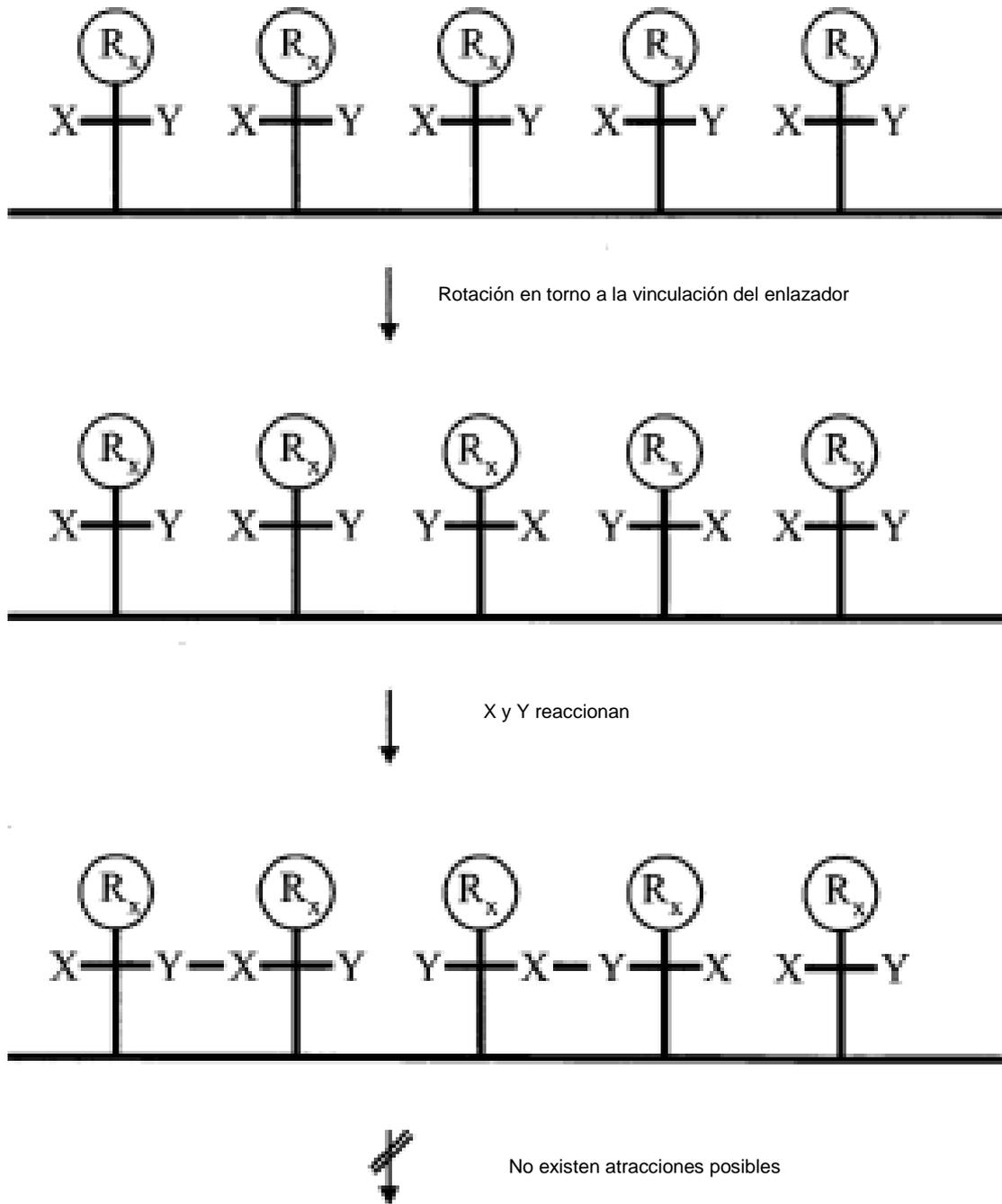


Figura 14. Polimerización por compresión y activación simultánea

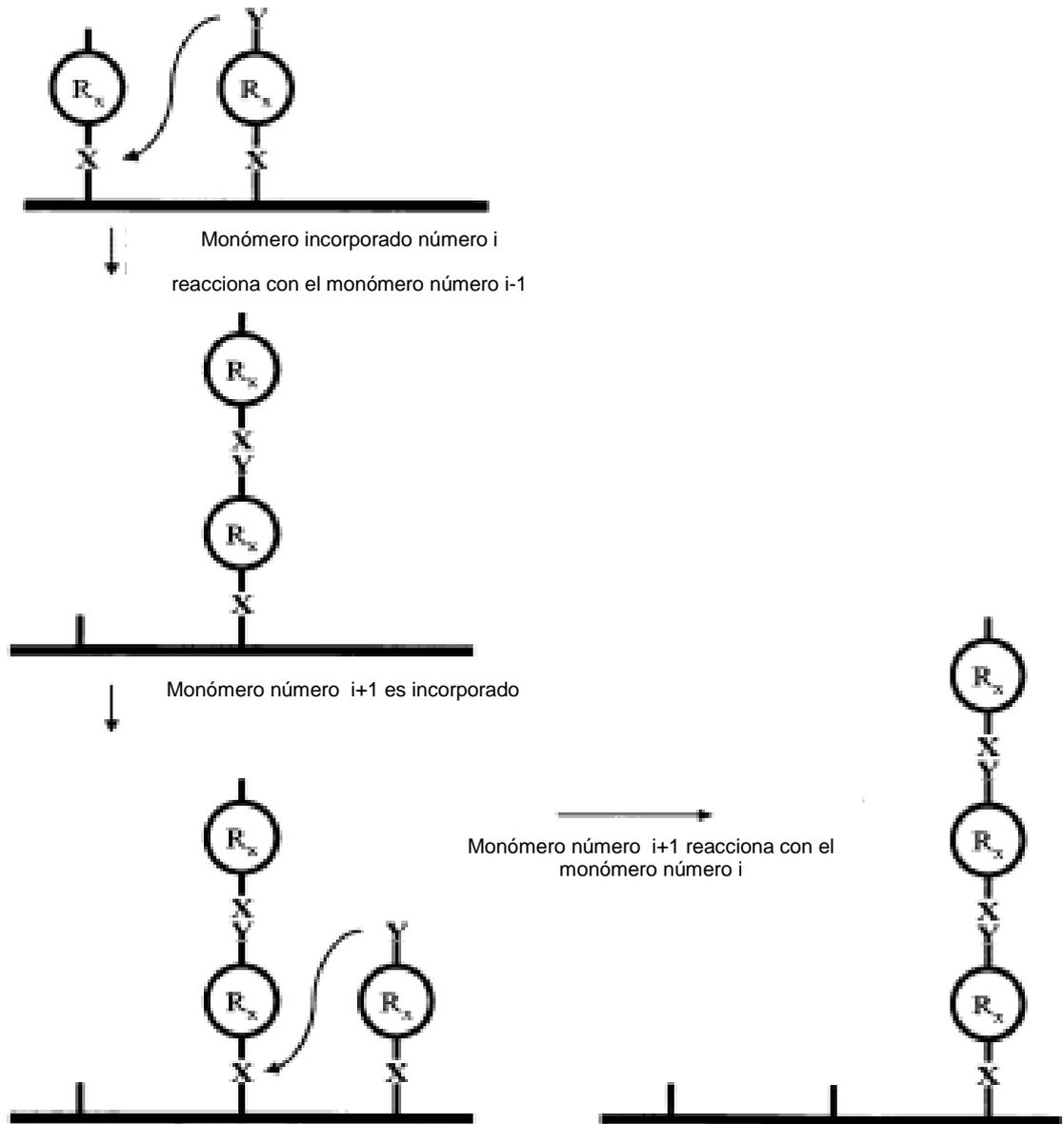


Figura 14, ejemplo 1. Polimerización y activación (tioésteres)

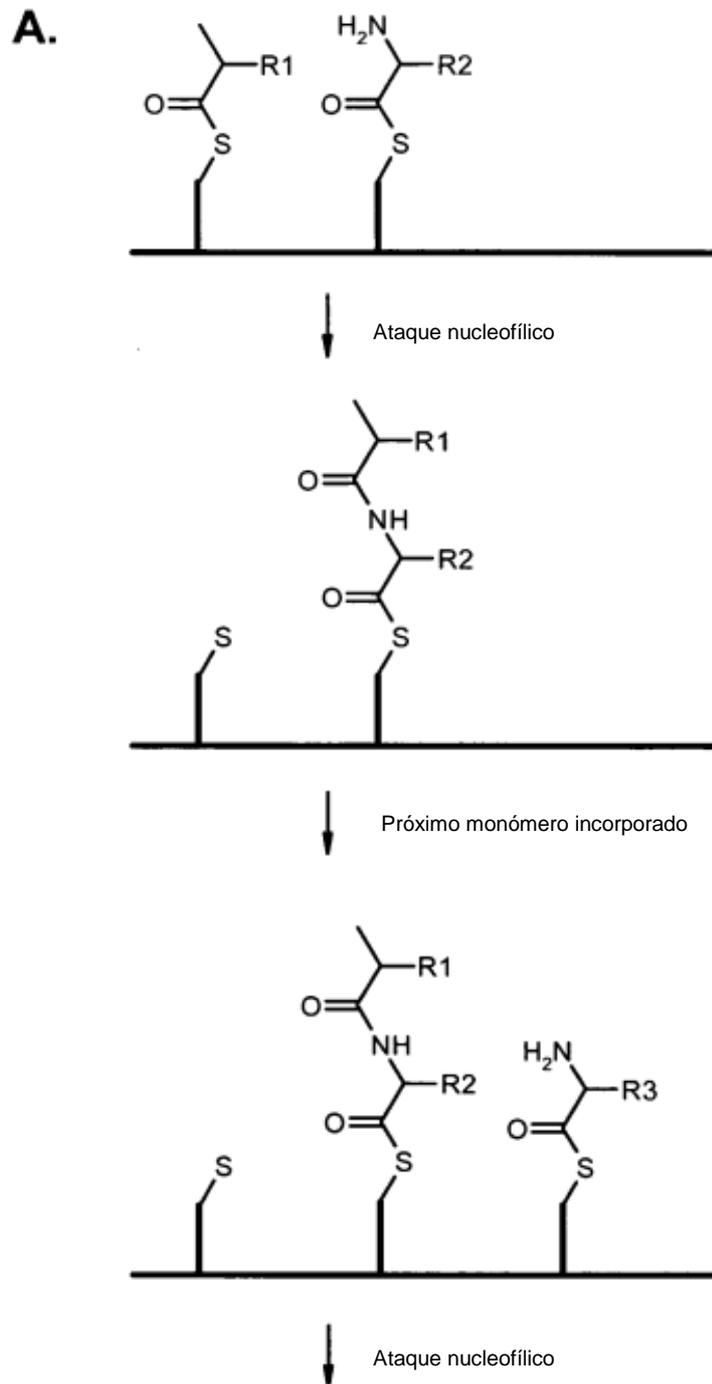
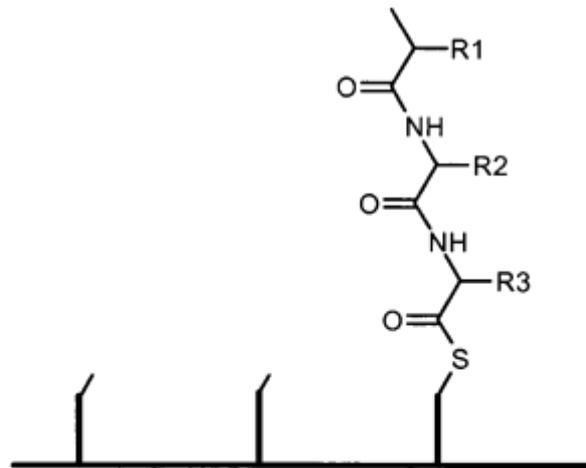


Figura 14 Cont.

**A. Cont.**



**B**

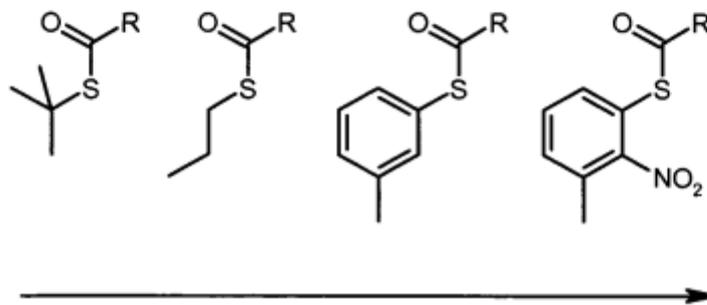


Figura 14, ejemplo 2. Cont.

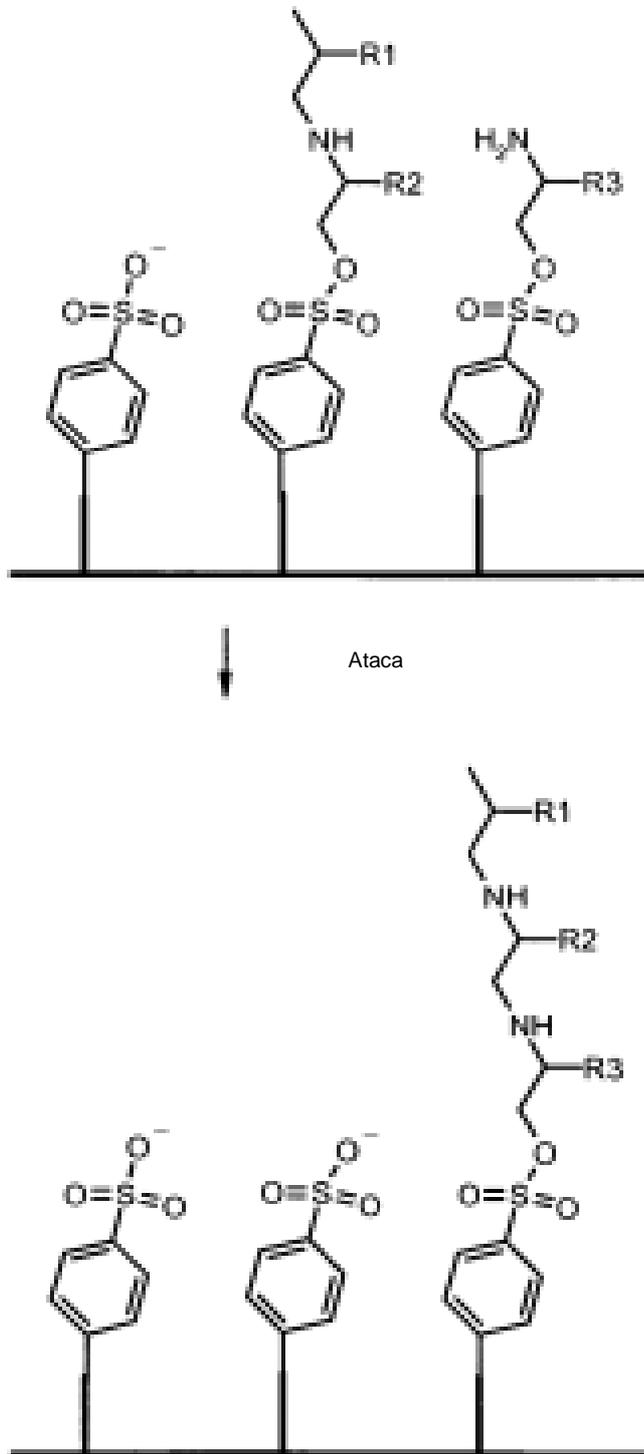


Figura 15. Polimerización de “relleno” (monómeros XX simétricos)

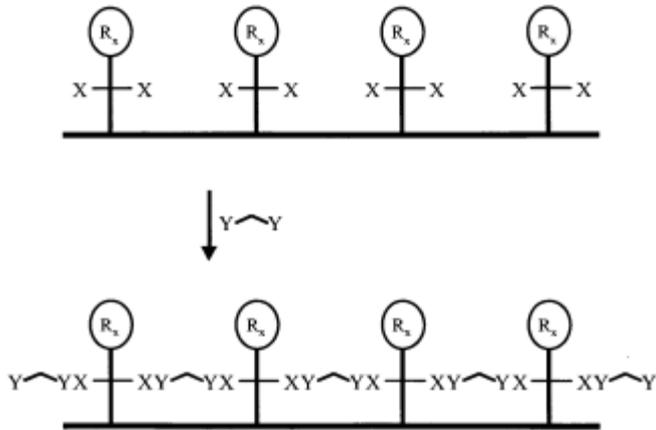


Figura 15, ejemplo 1. Formación de poli-iminas por medio de polimerización de relleno

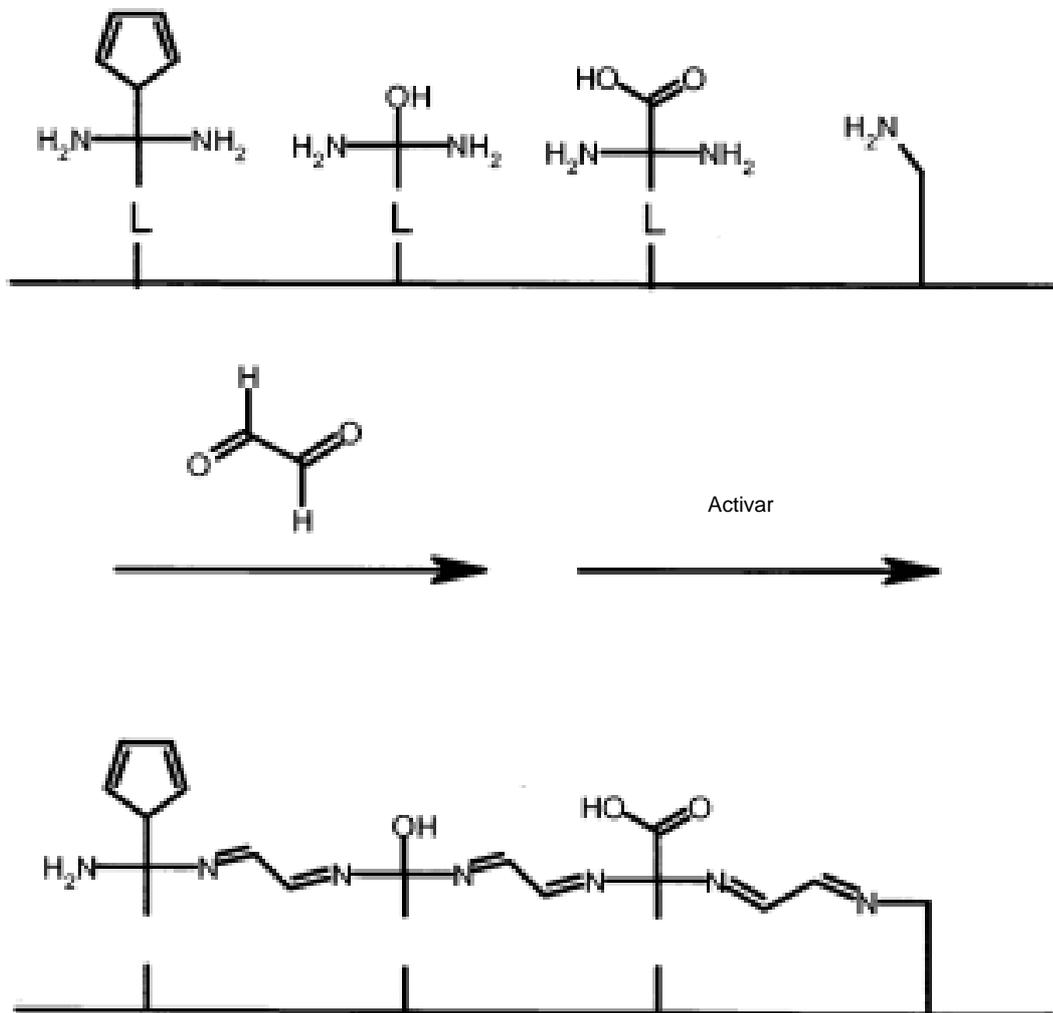


Figura 15, ejemplo 2. Formación de poliamidas

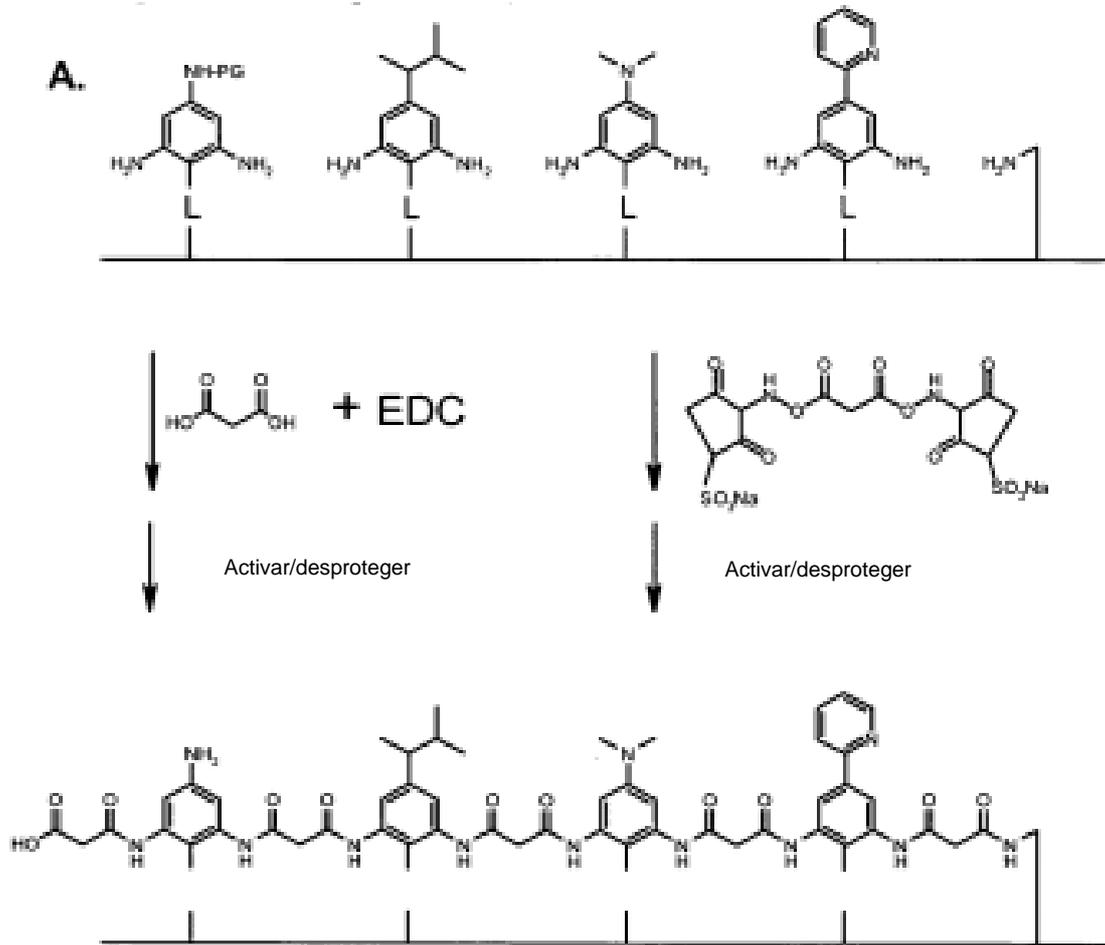


Figura 15, ejemplo 2, cont.

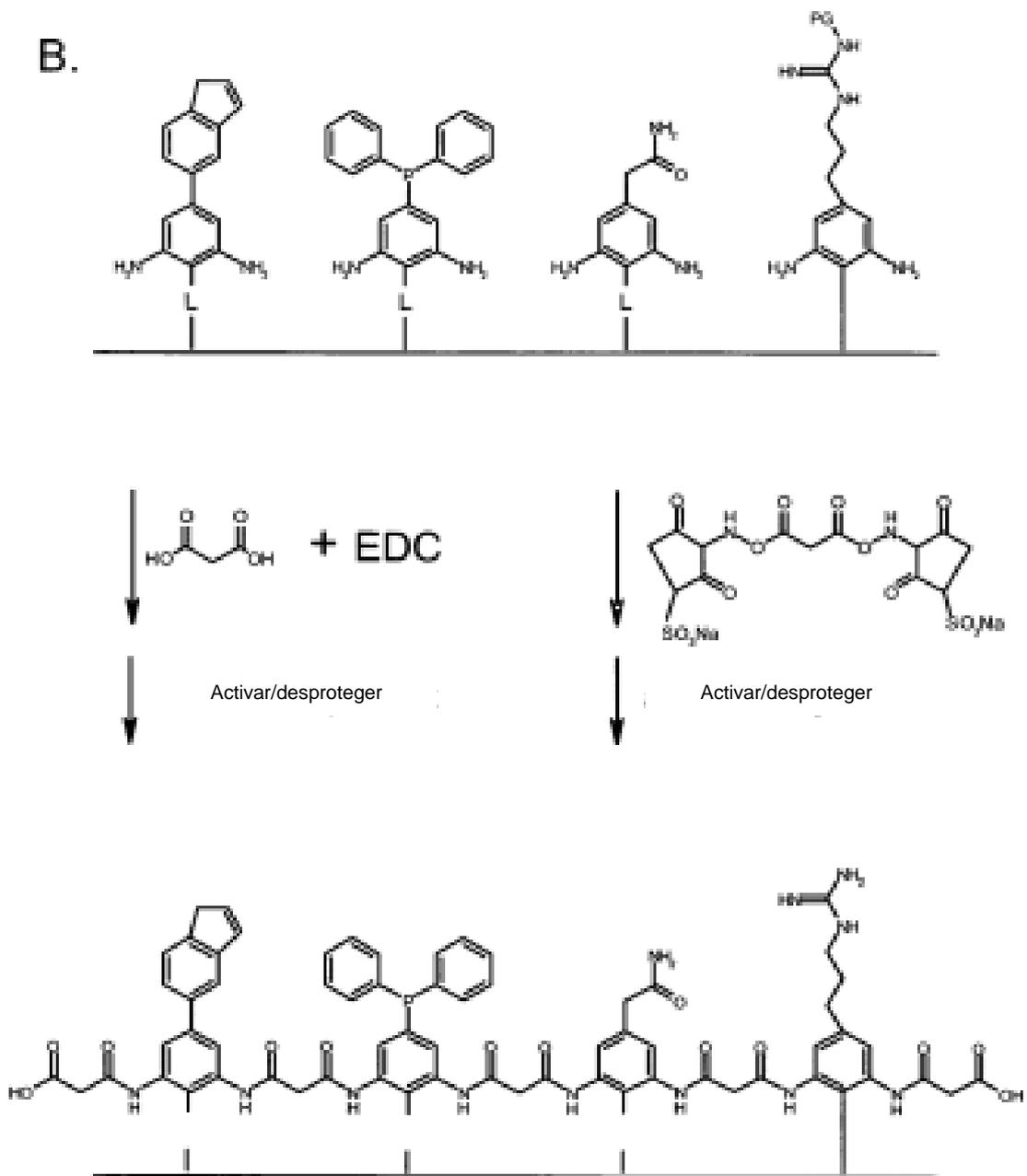


Figura 15, ejemplo 3. Formación de poliureas

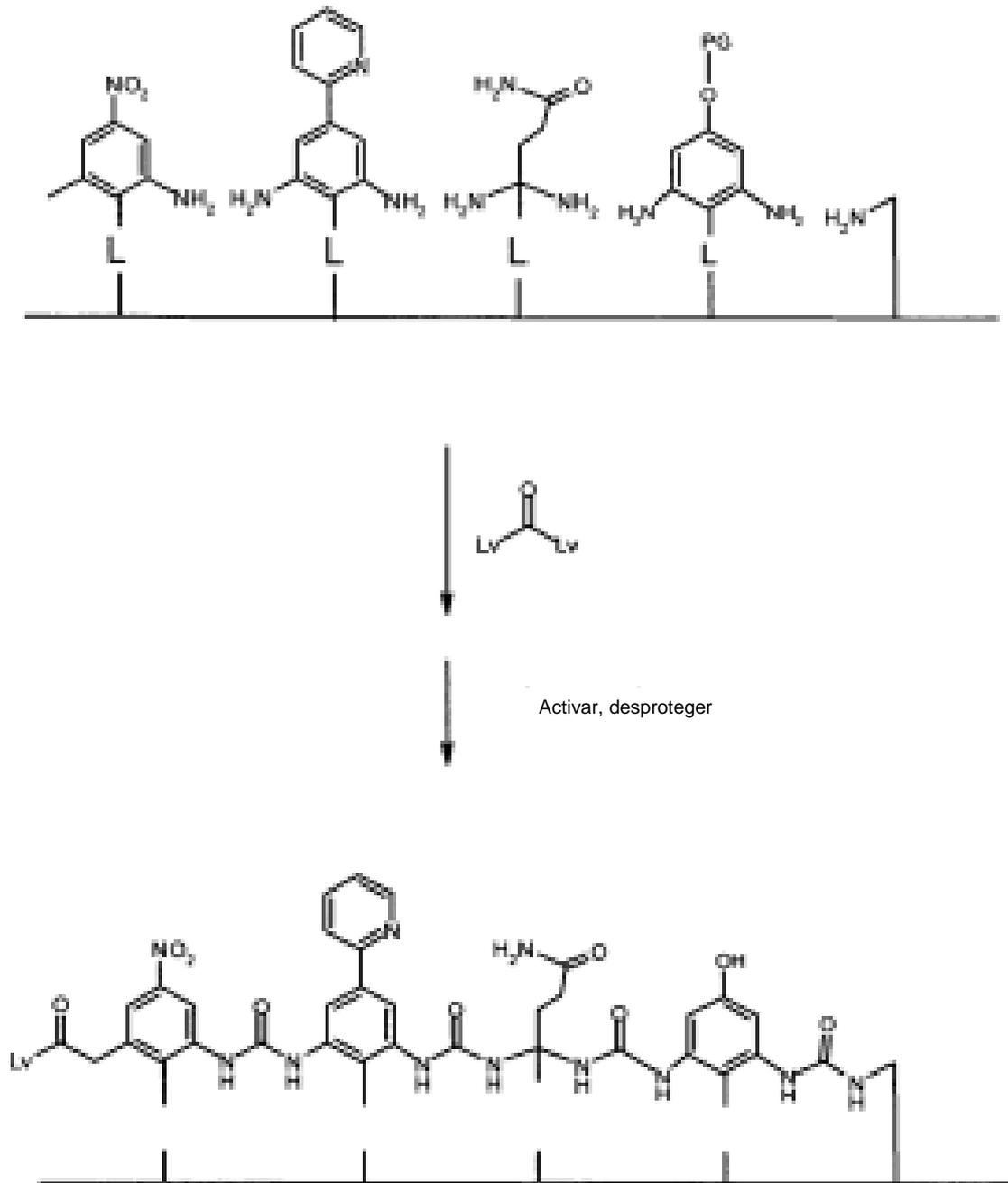




Figura 15, ejemplo 4. Cont.

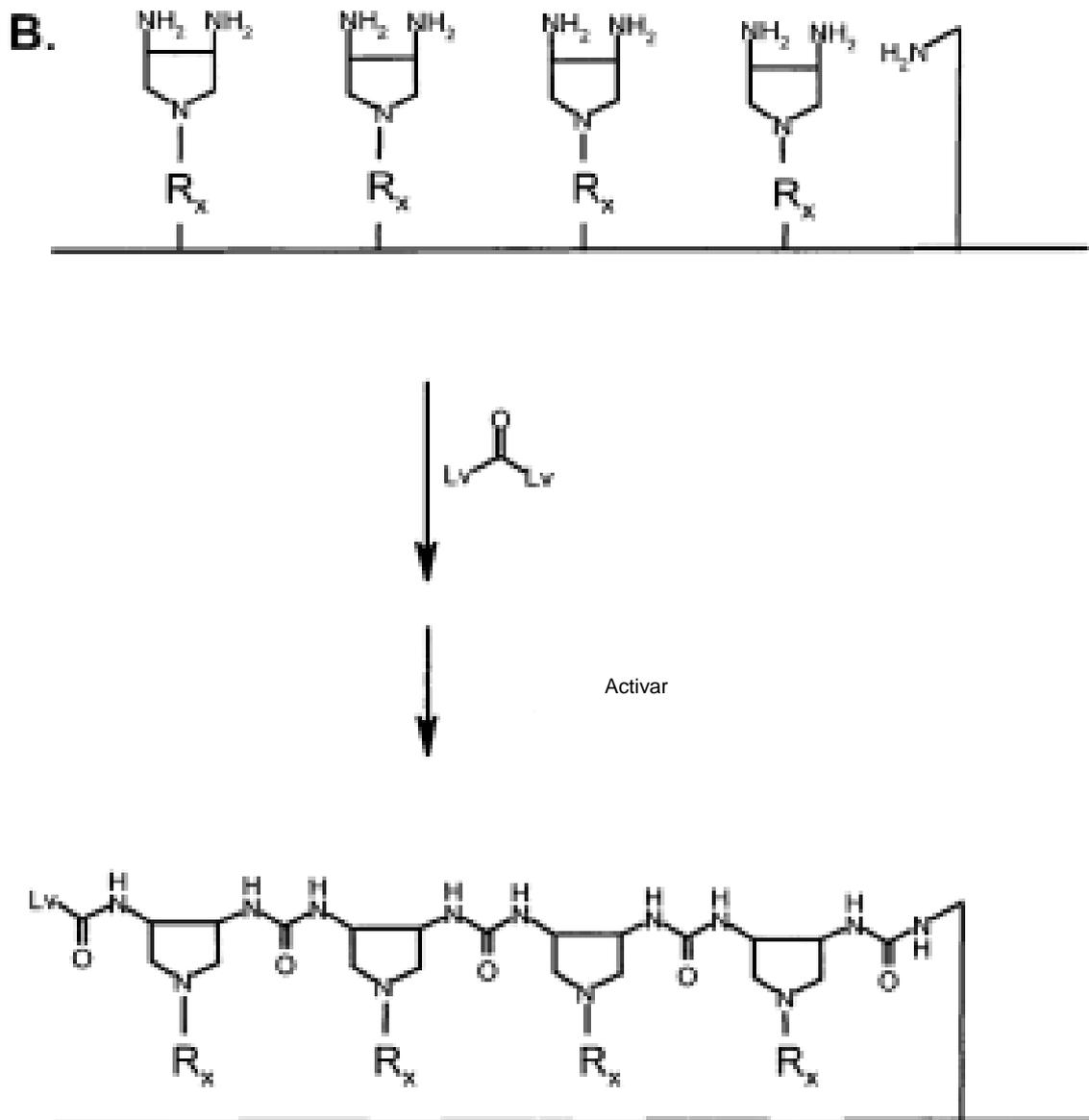


Figura 15, ejemplo 5. Formación de polifosfodiésteres

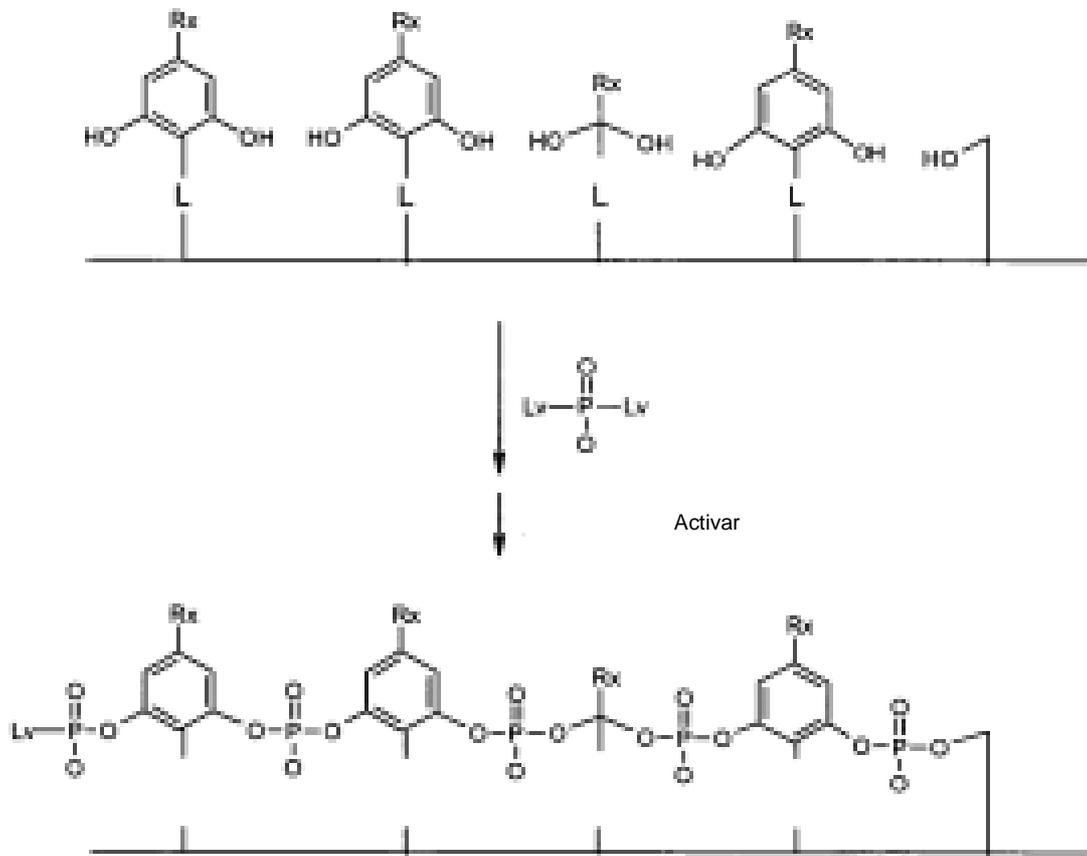


Figura 15, ejemplo 6. Formación de polifosodiésteres con un grupo reactivo en cada bloque monomérico

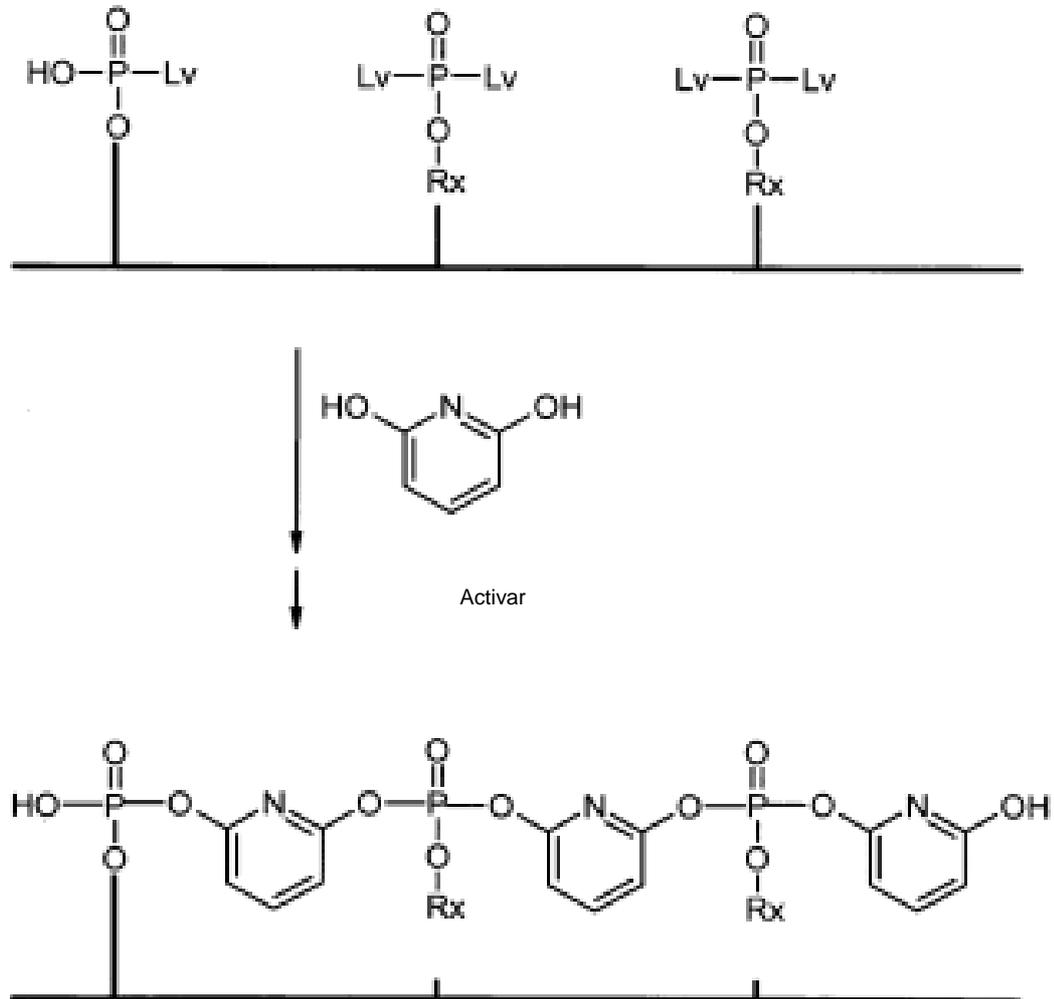


Figura 15, ejemplo 7. Pericíclico, polimerización de "relleno"

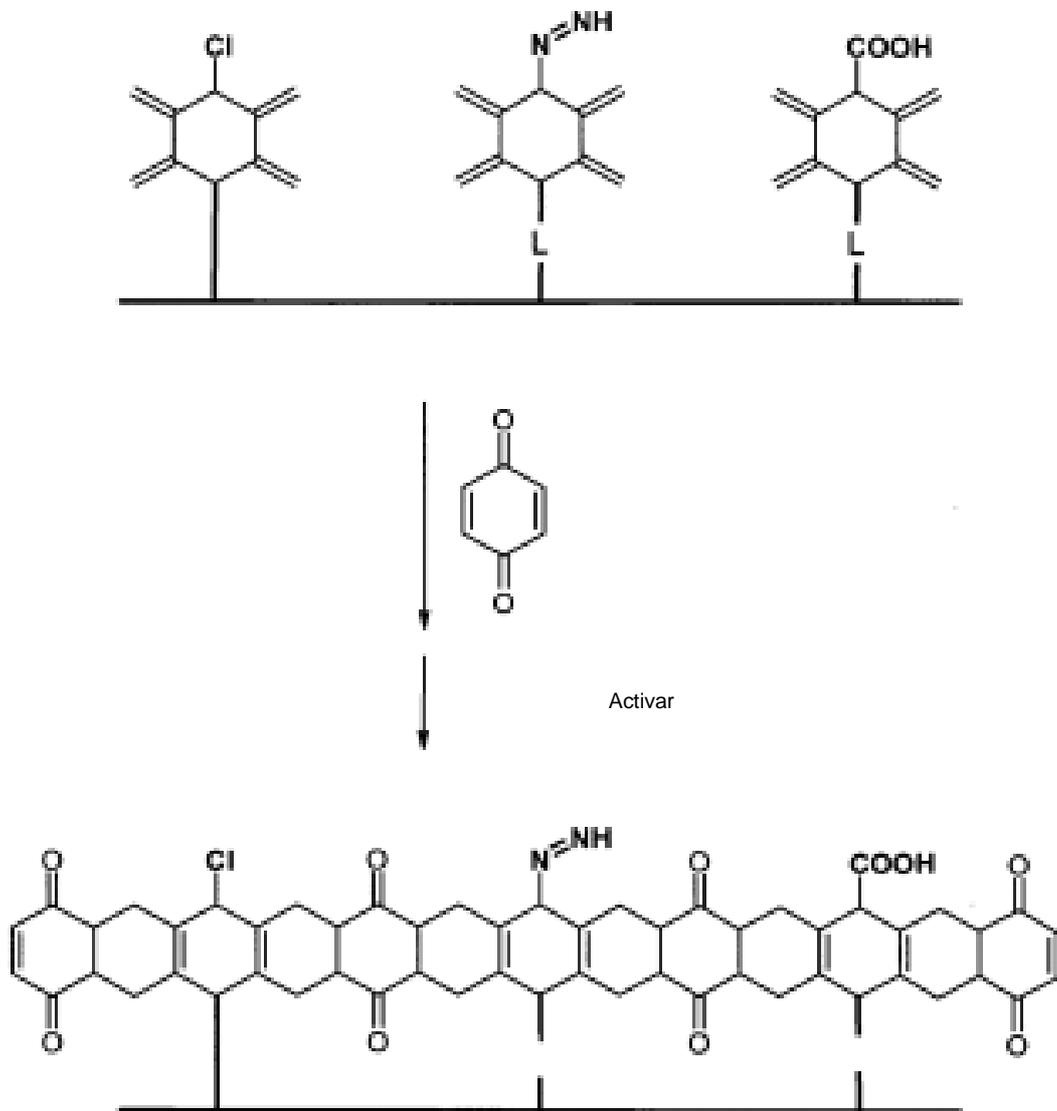


Figura 16. Relleno codificado

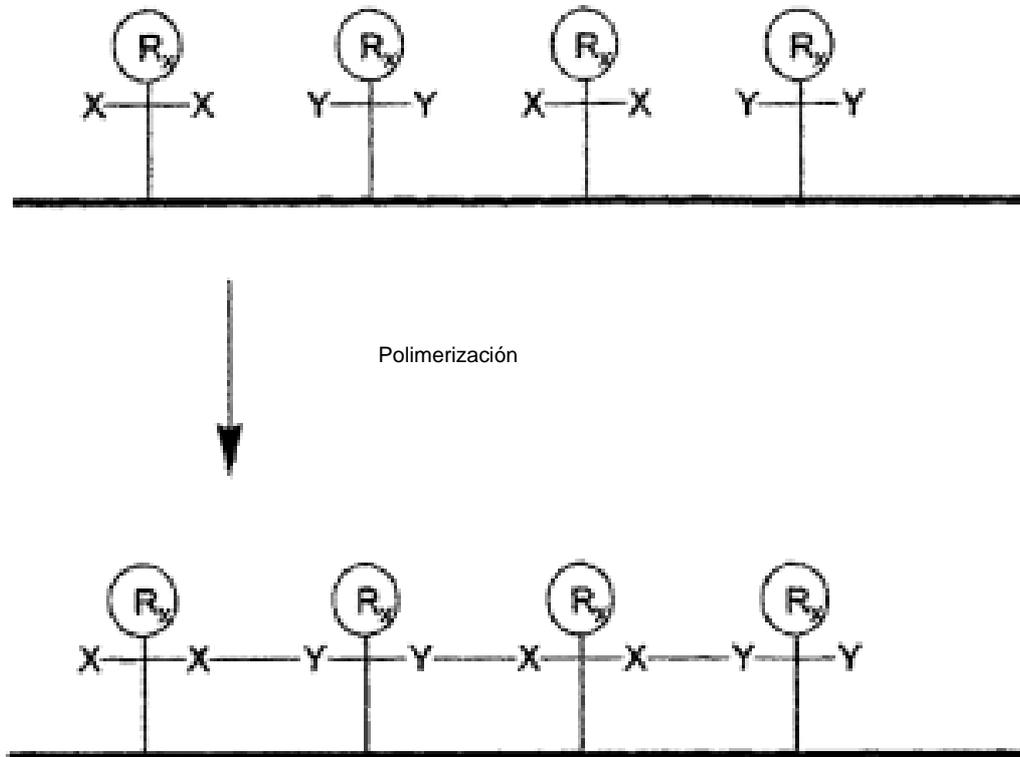


Figura 17. Polimerización de “relleno” (monómeros XS asimétricos).

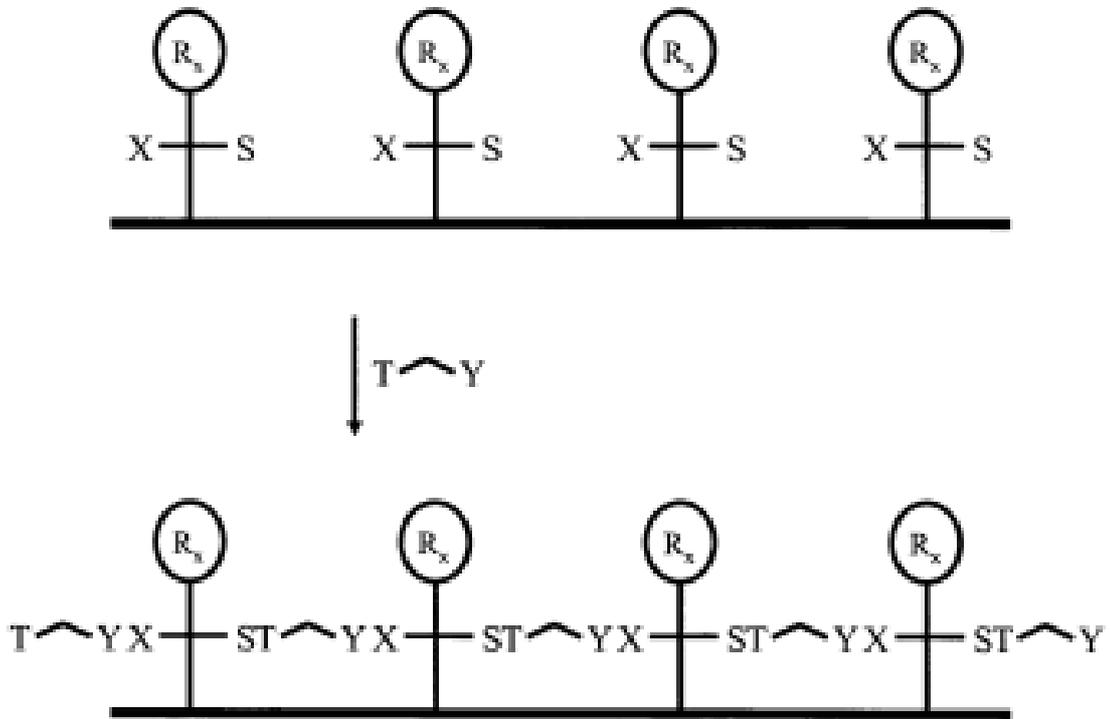


Figura 17, ejemplo 1. Polimerización de relleno por medio de una reacción de acetona-hidracida

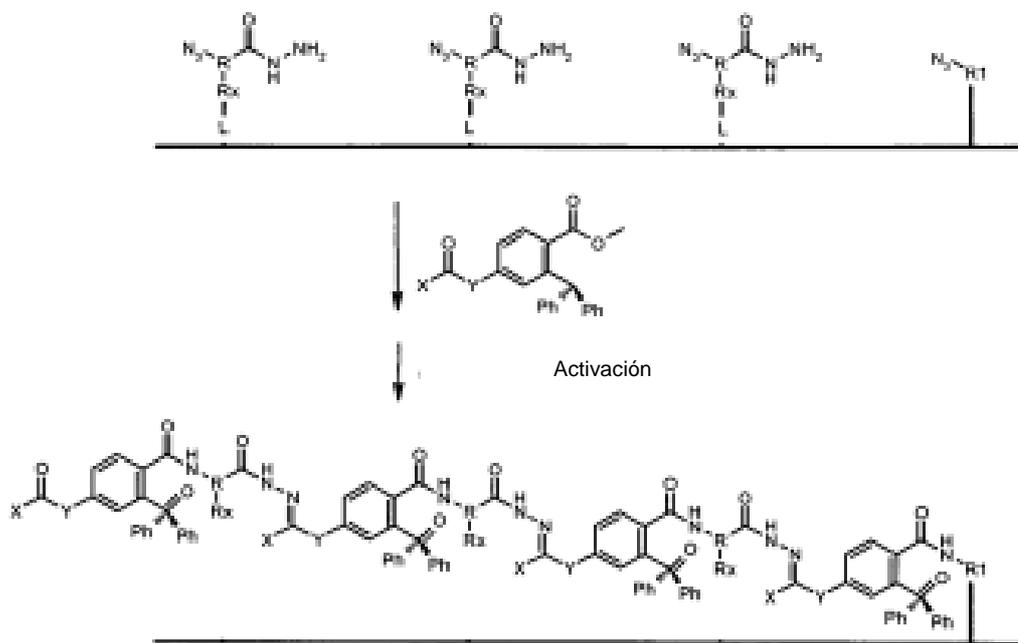


Figura 18. Polimerización de “compresión”

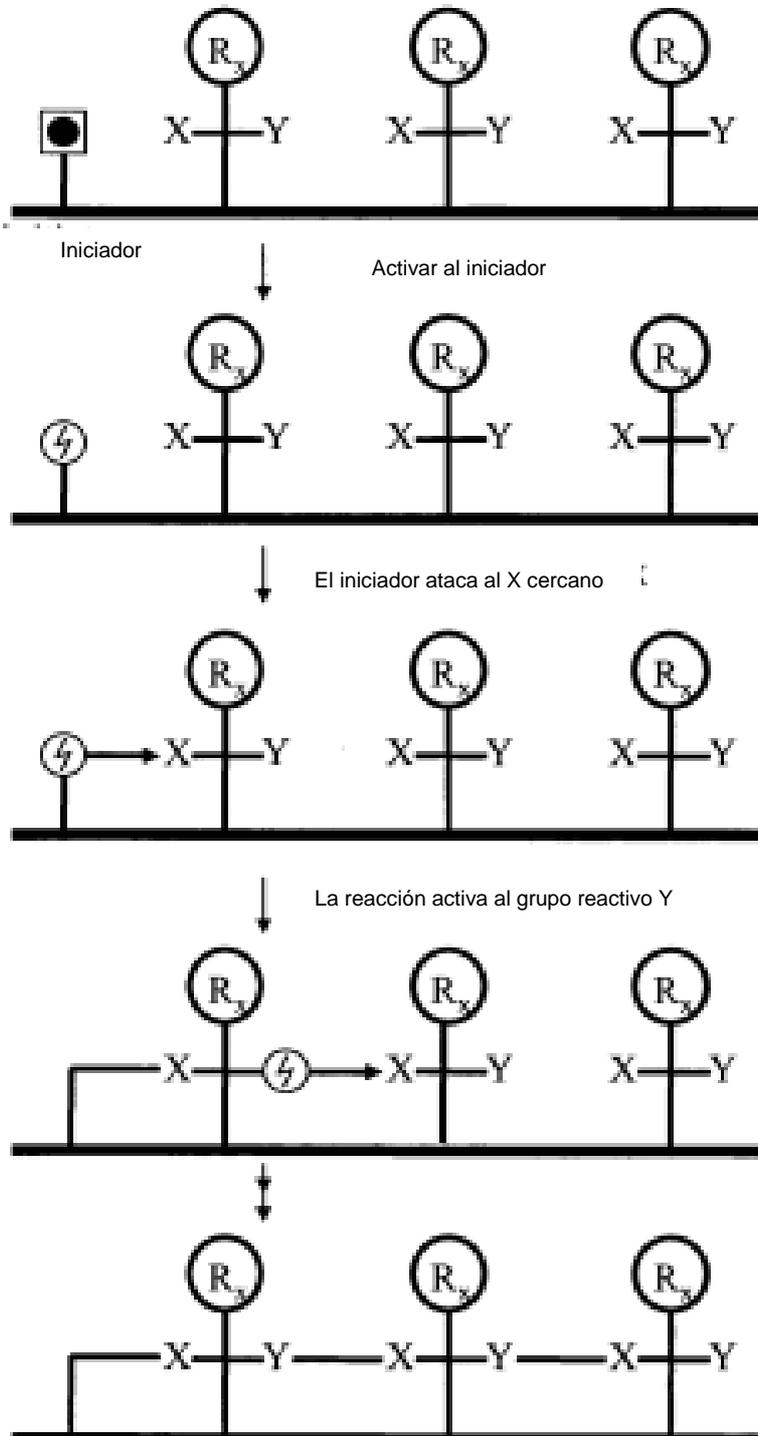


Figura 18, ejemplo 1. Polimerización radical

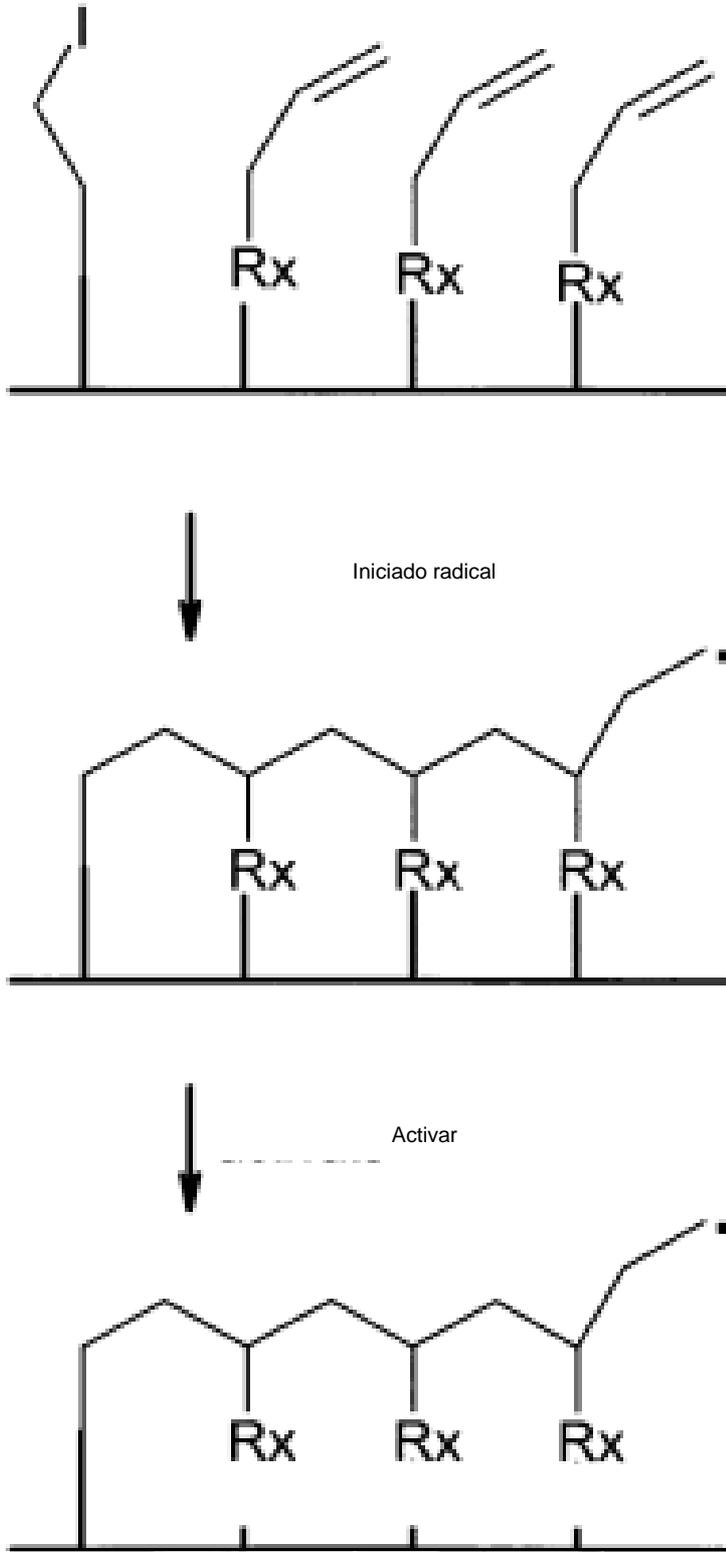


Figura 18, ejemplo 2. Polimerización catiónica

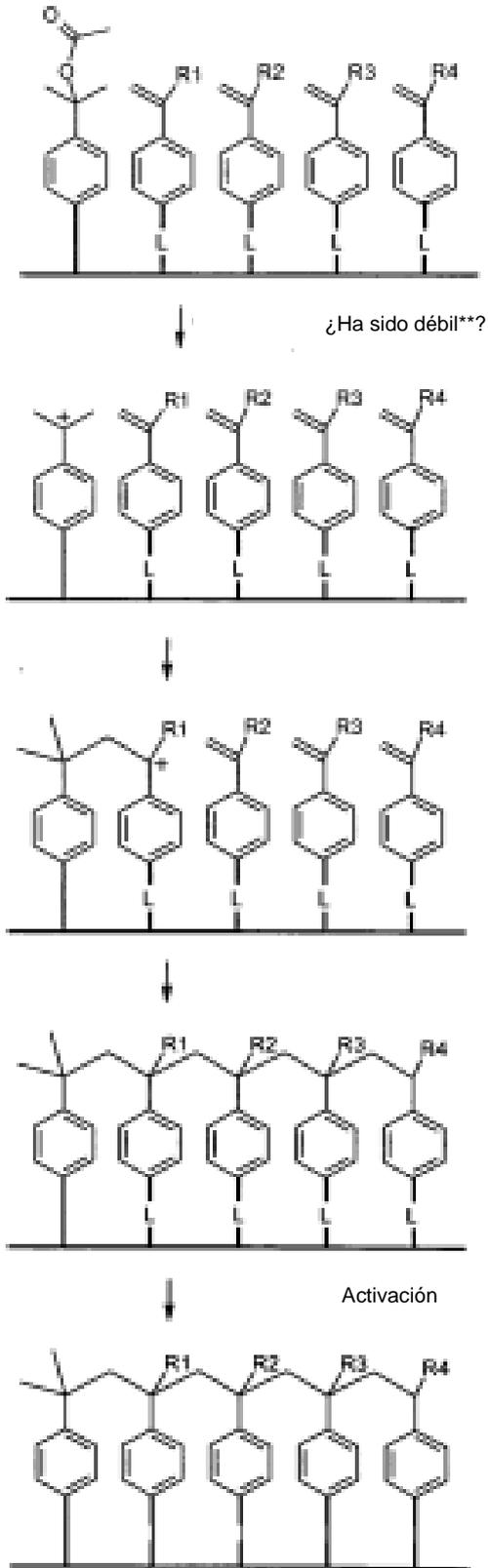


Figura 19. Polimerización por compresión por medio de apertura nula

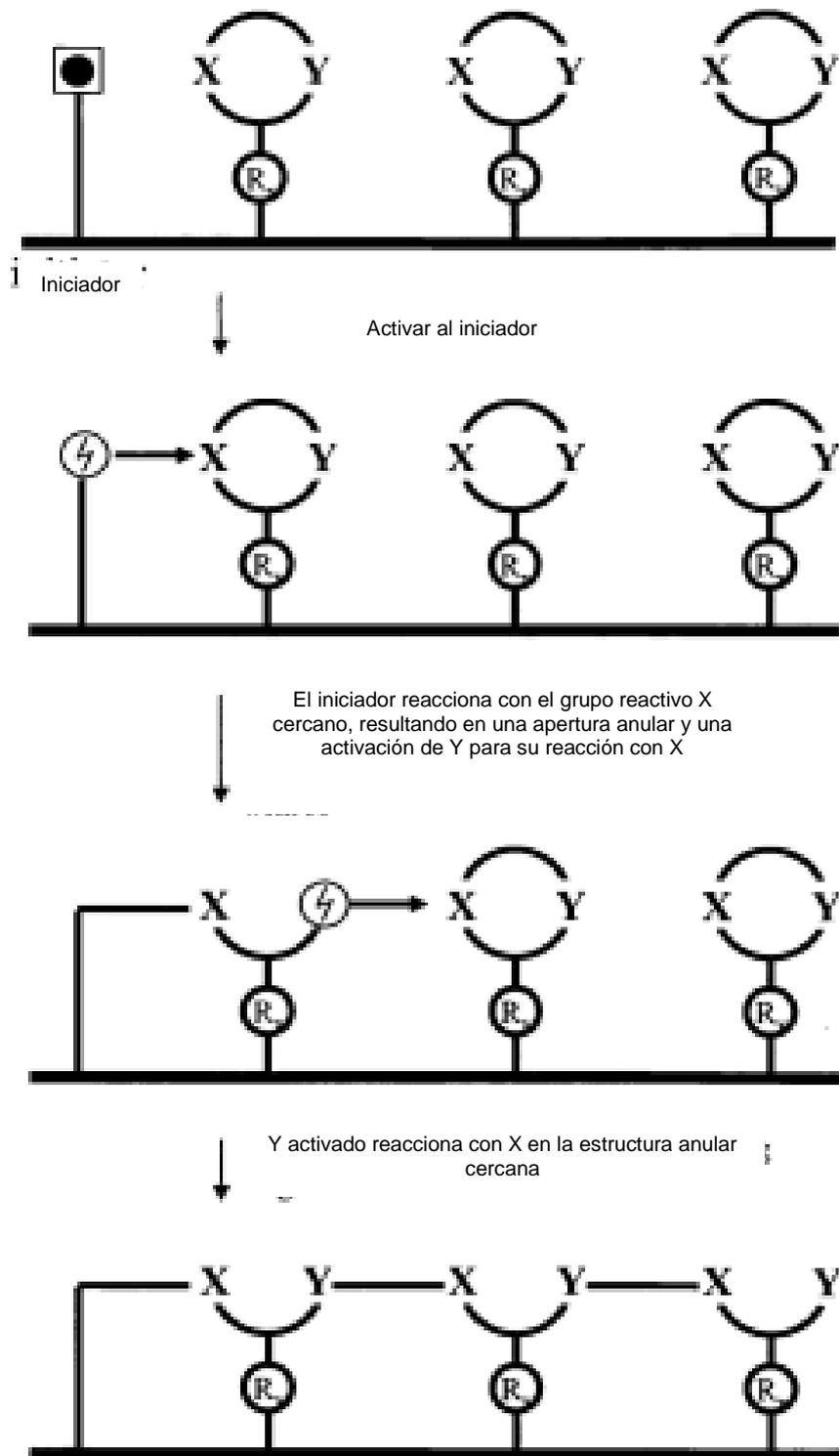


Figura 19, ejemplo 1. Polimerización por "compresión" de N-tiocarboxianídridos, para formar  $\beta$ -péptidos

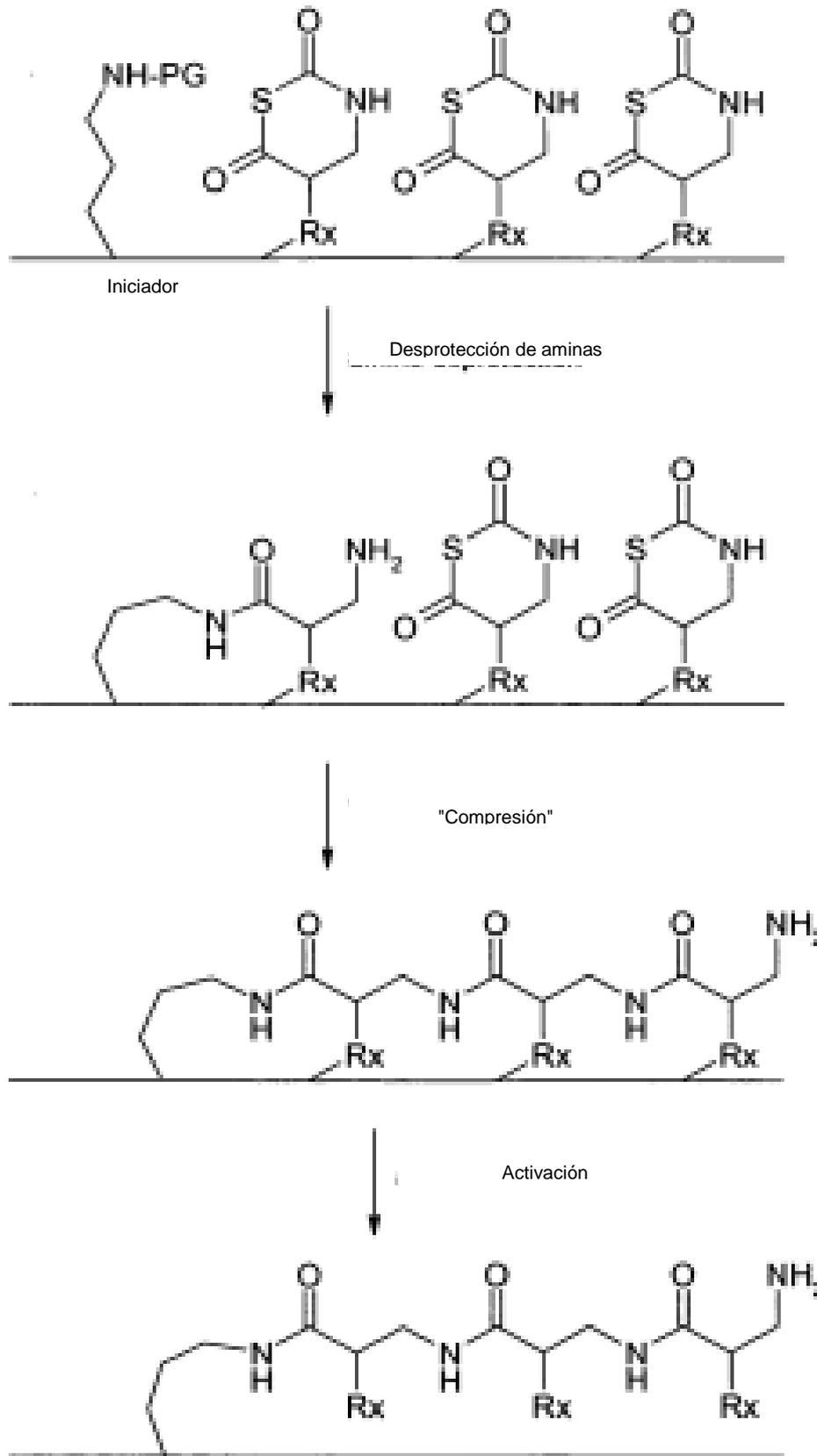


Figura 19, ejemplo 2. Polimerización de “compresión” de unidades de 2,2-difeniltiacinonona para formar  $\beta$ - péptidos

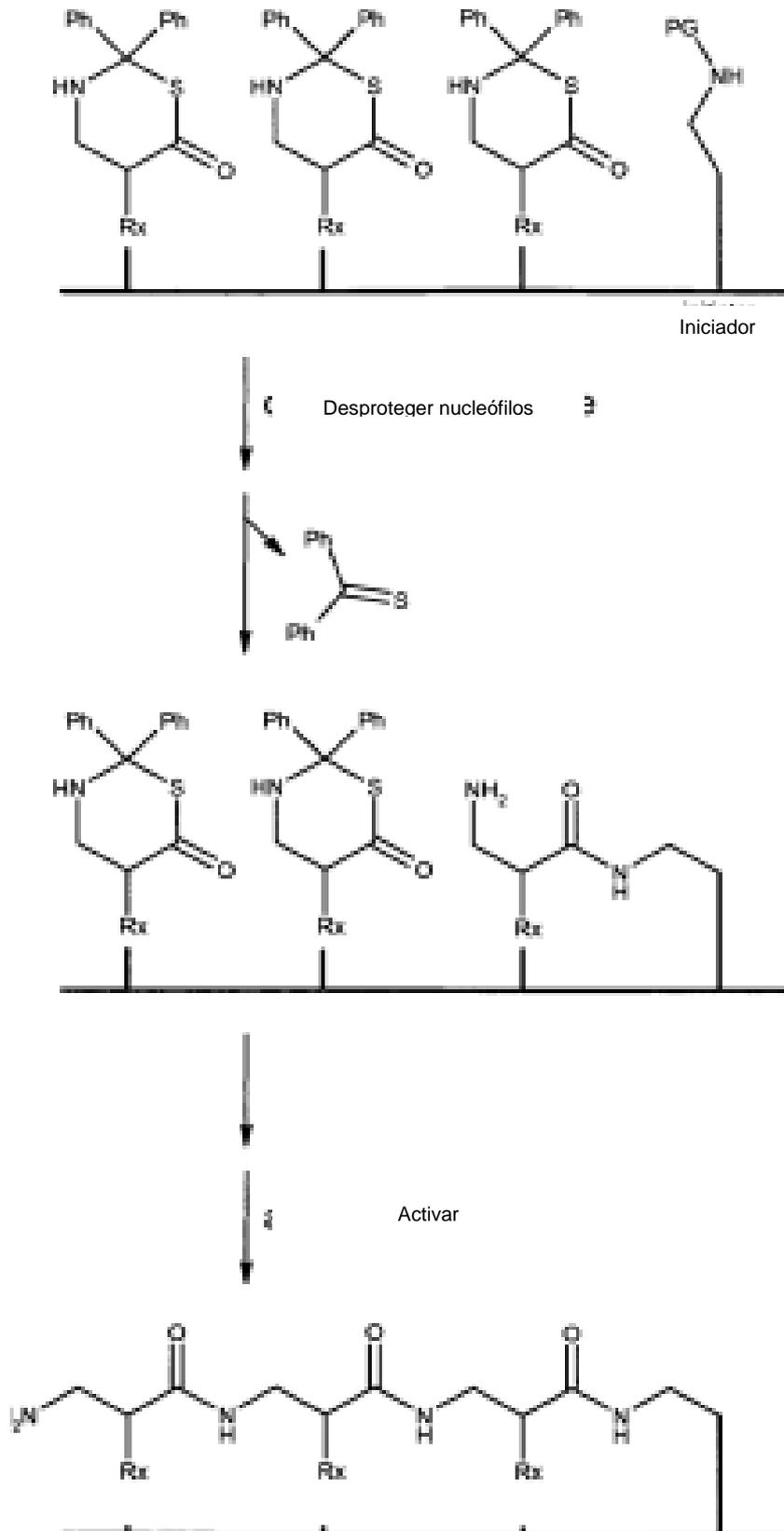


Figura 19, ejemplo 3. Formación de poliéster por medio de polimerización de apertura anular

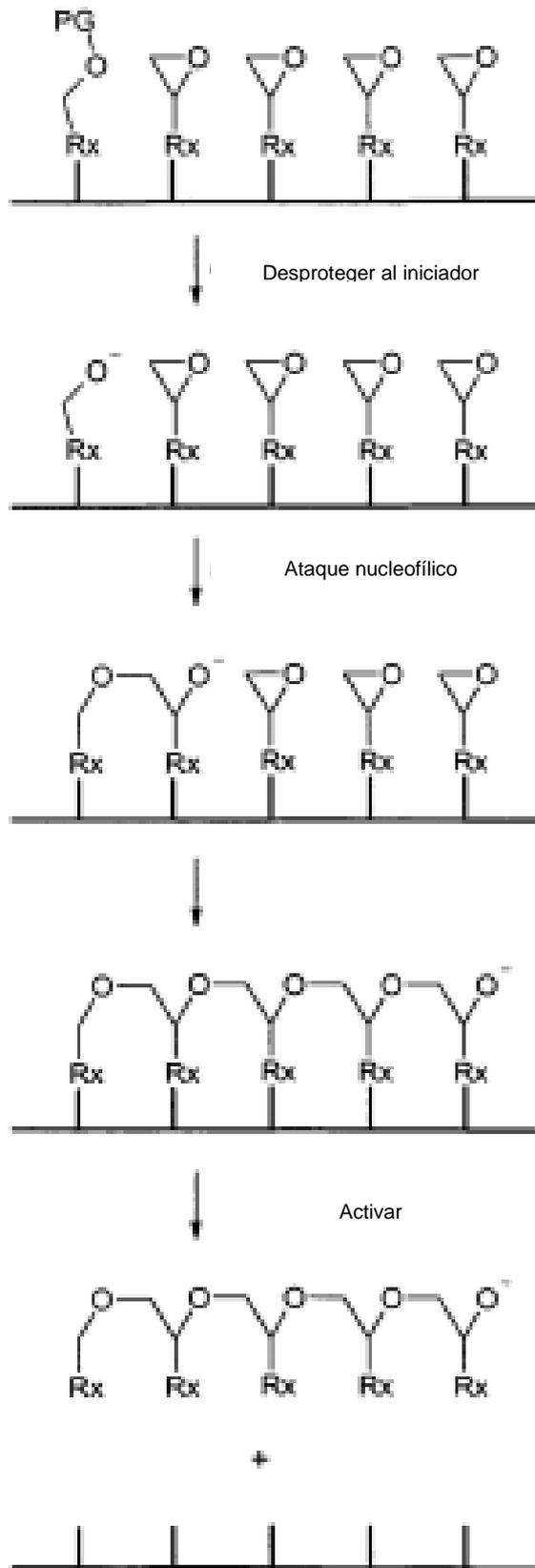


Figura 20. Polimerización por compresión y activación por reorganización

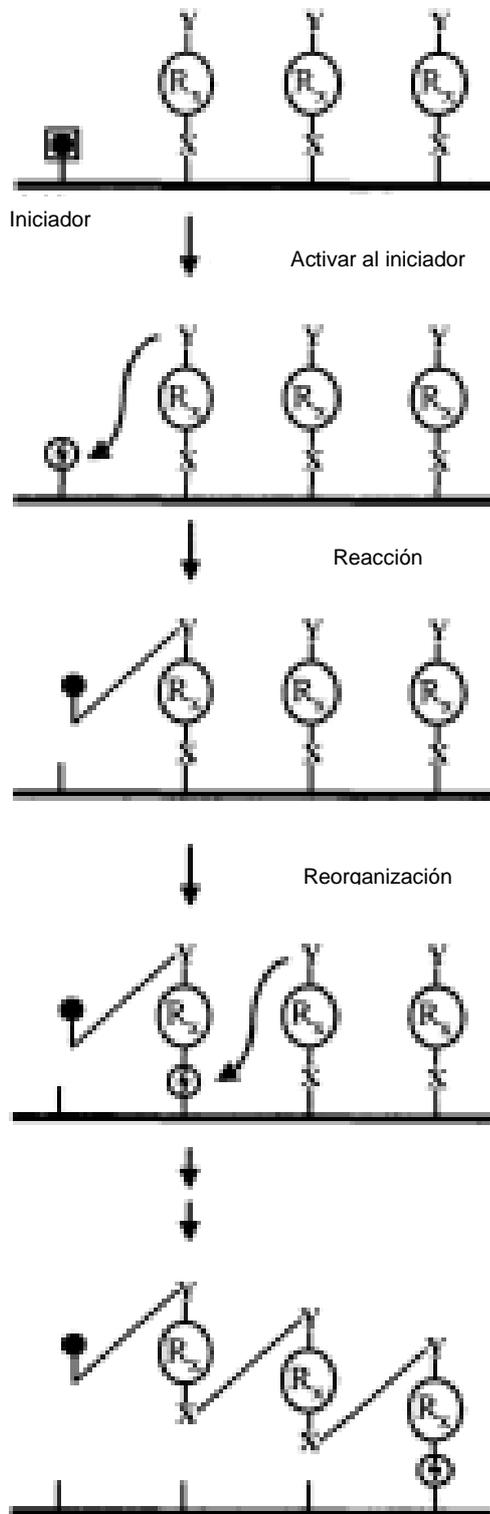


Figura 21. Polimerización por compresión y activación por medio de apertura anular

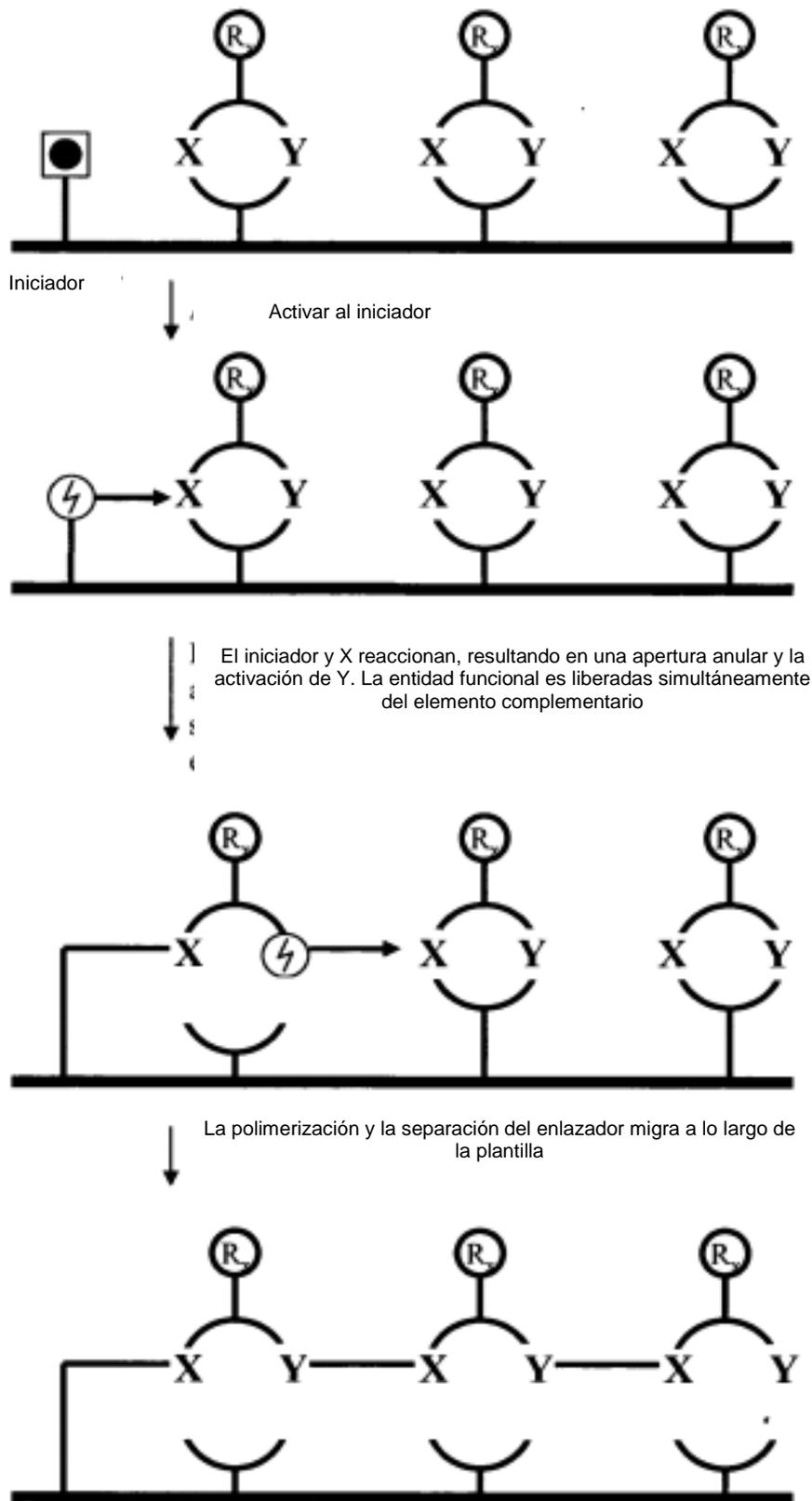
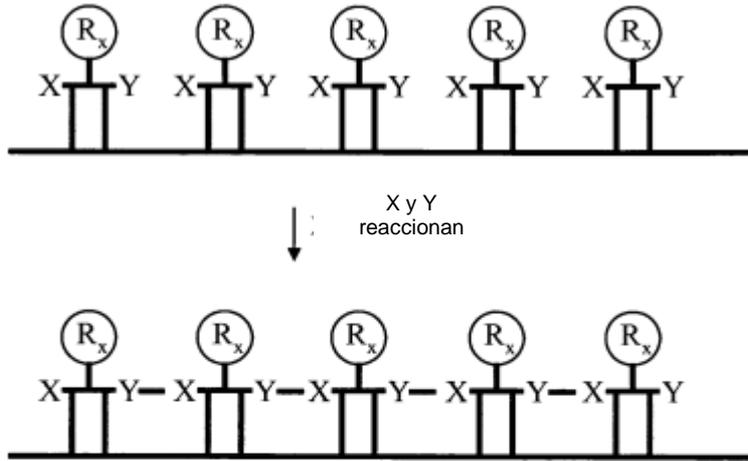
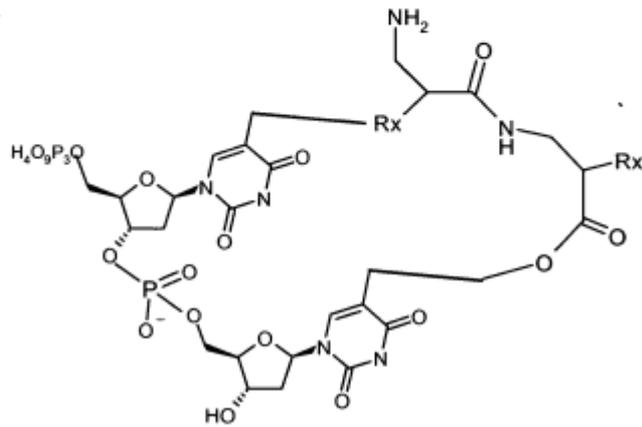


Figura 22. Formación direccional de polímeros utilizando unidades funcionales fijas

A.



B.



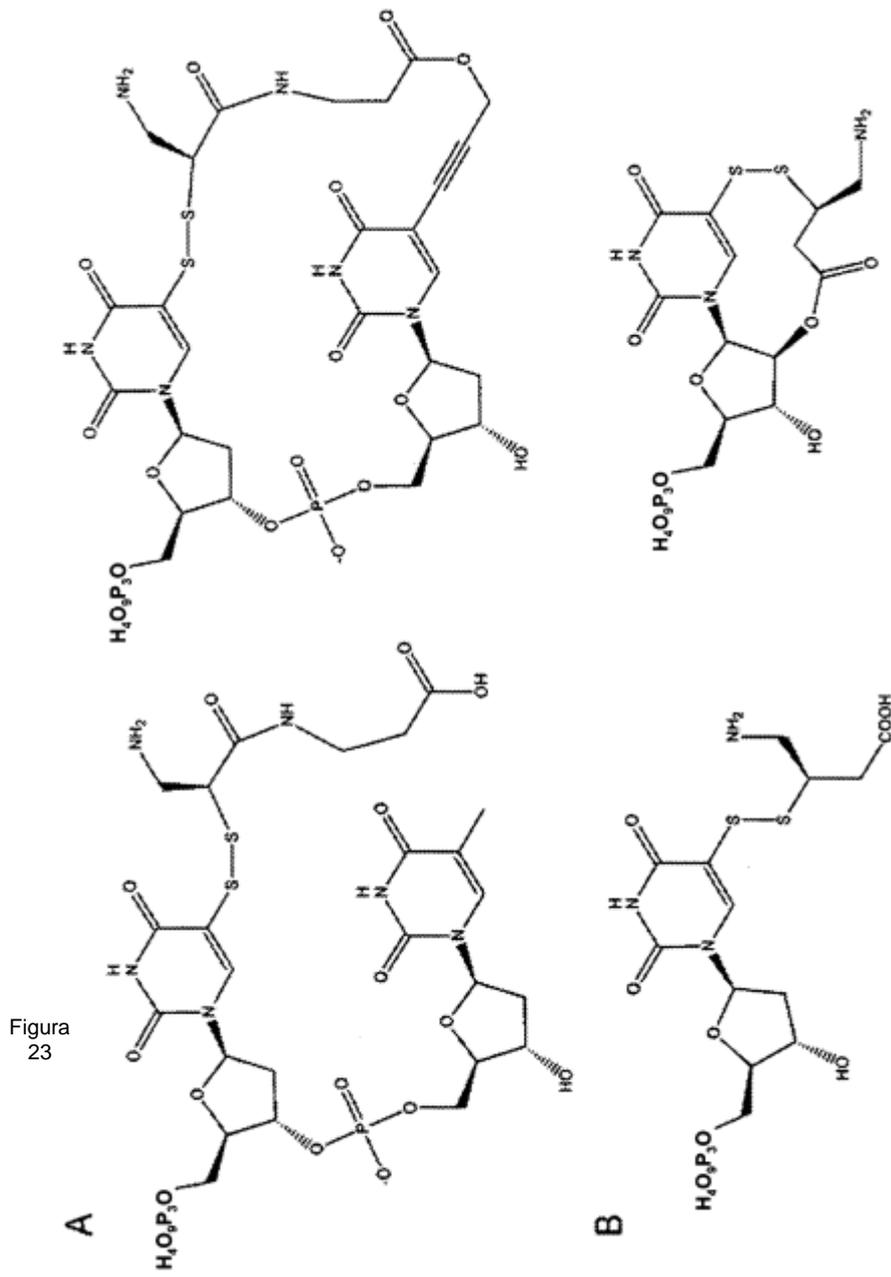


Figura 23 cont.

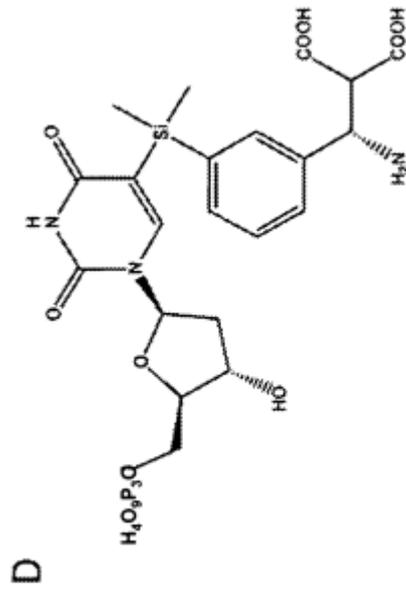
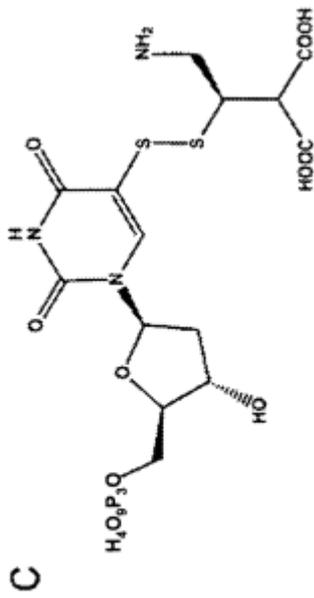
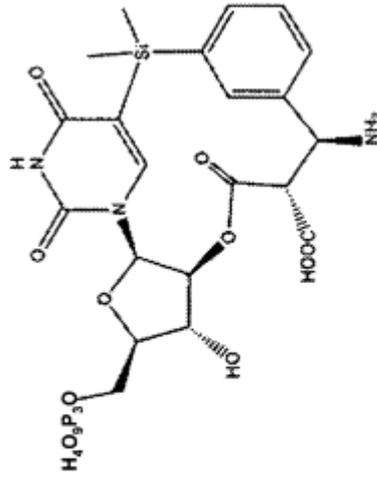
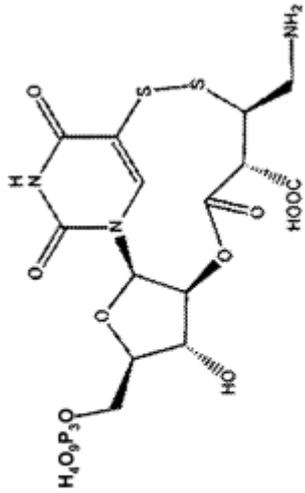


Figura 24

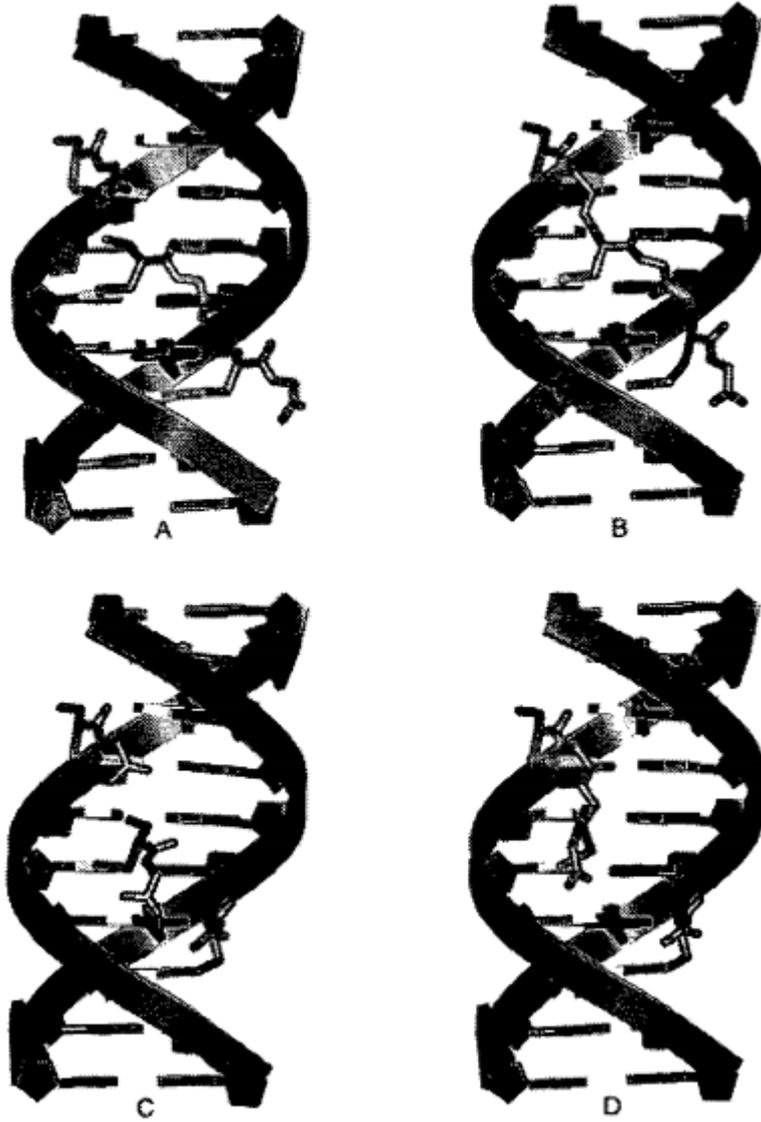


Figura 24 cont.

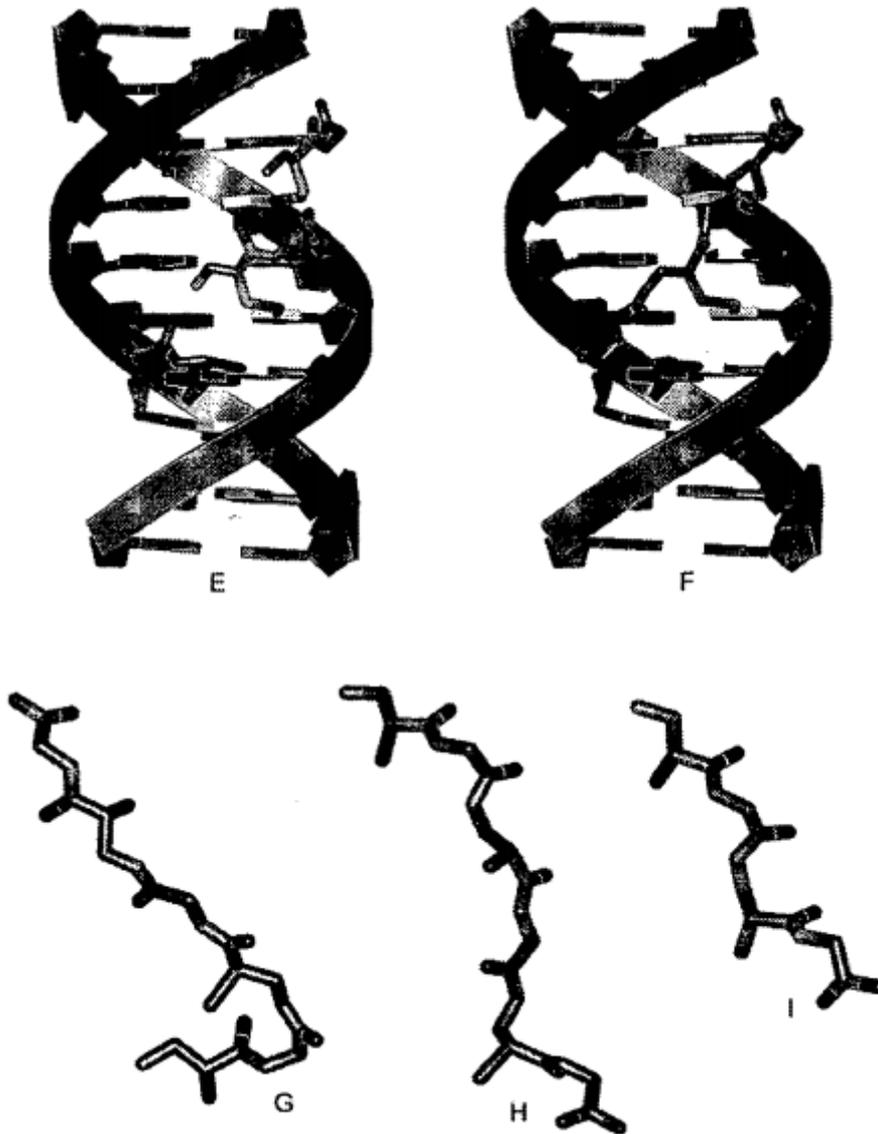


Figura 25

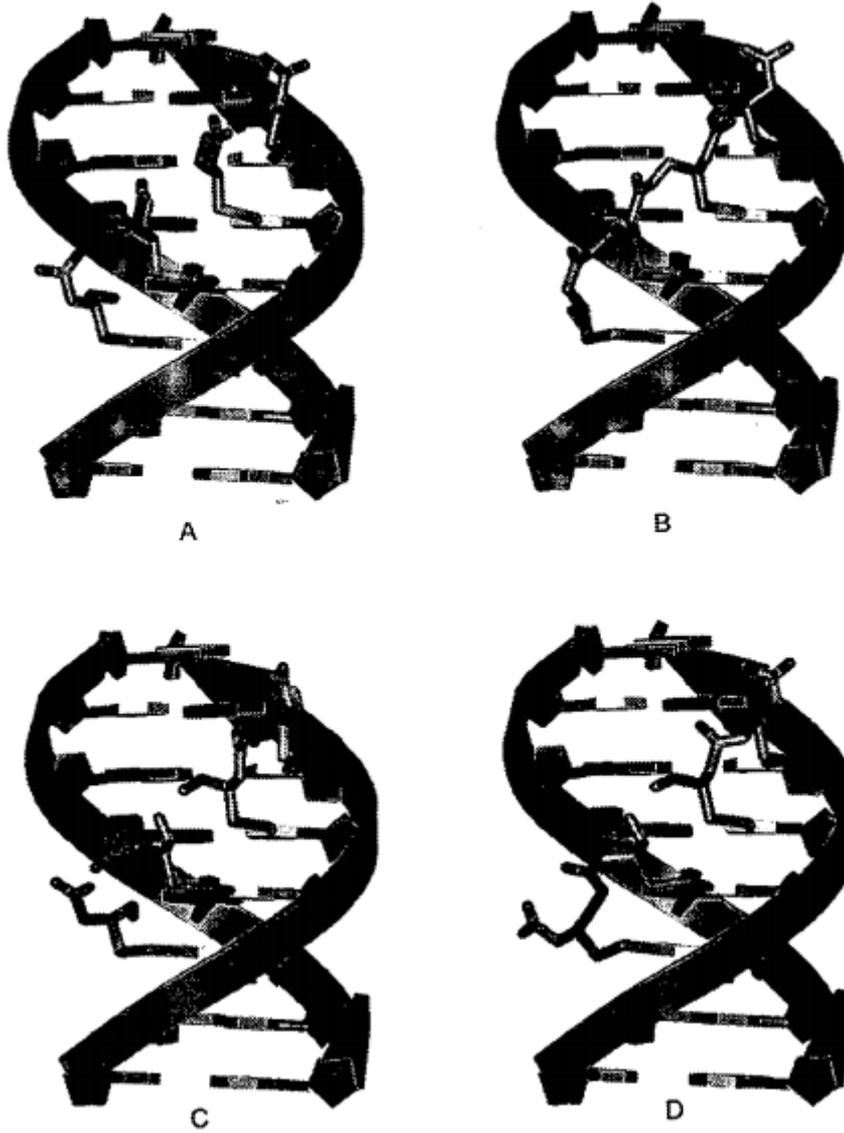


Figura 25 cont.

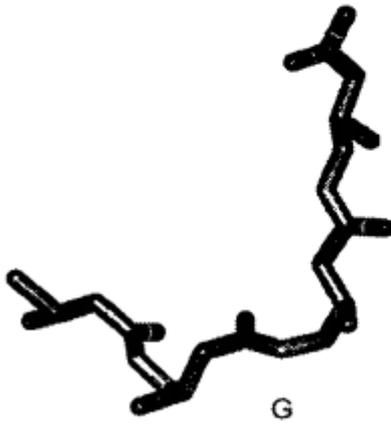


Figura 26. Presentación química-principio

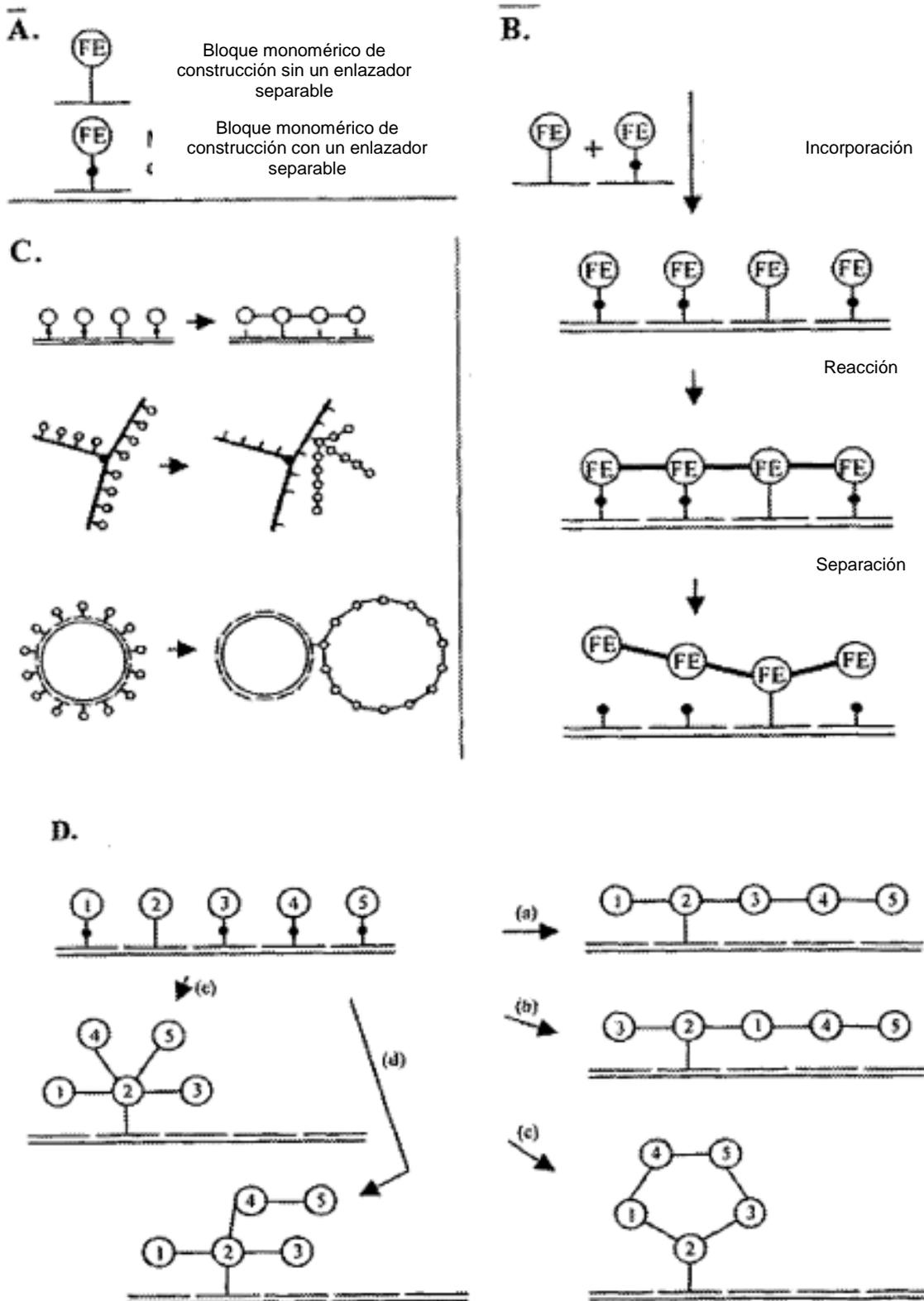


Figura 27. El número de grupos reactivos (X) puede ser más alto, igual a, o más bajo que, el número de grupos reactivos (Y). Cuando el número de (X) y (Y) son diferentes, existen resultados mezclados.

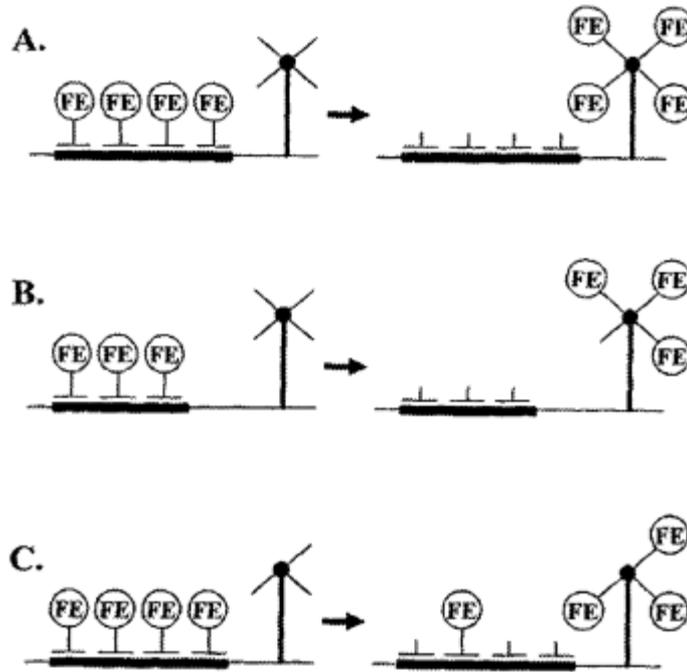


Figura 28. Bloques monoméricos de construcción

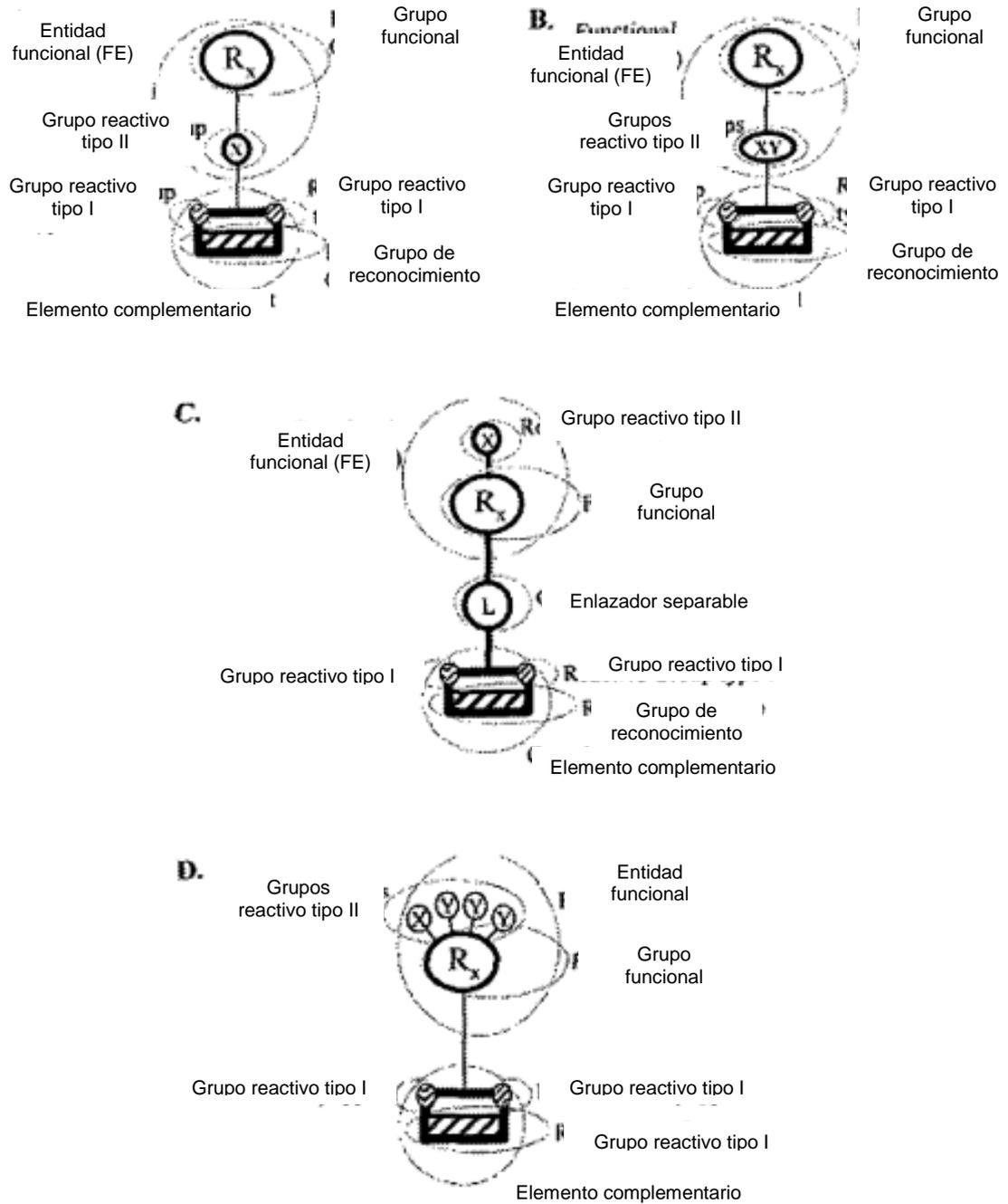


Figura 29. Modelación involucrando una reacción y activación simultáneas

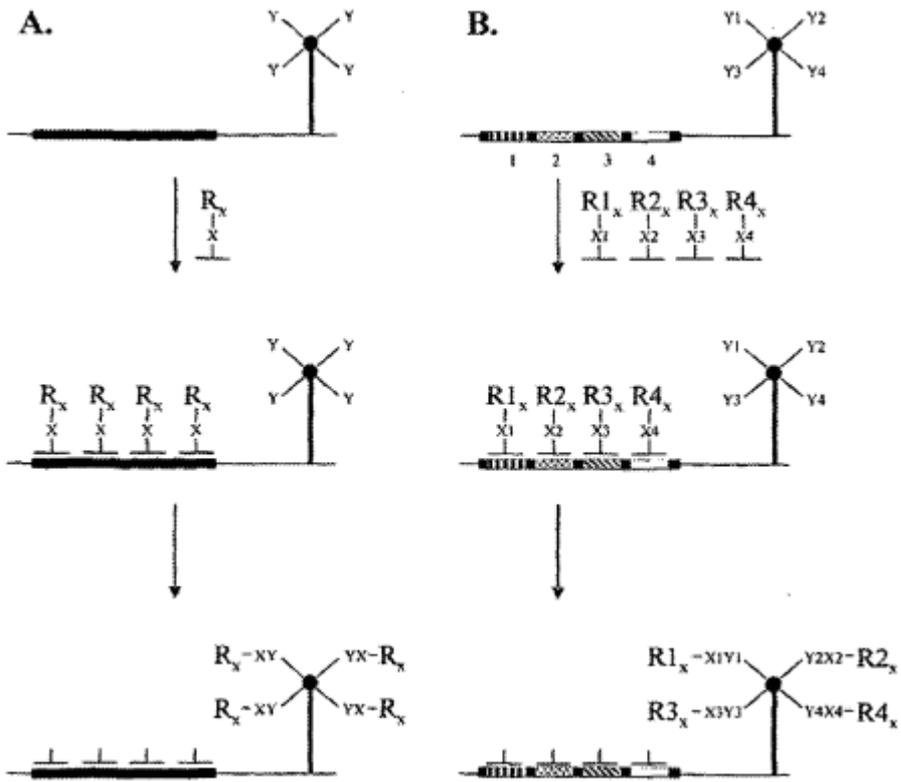
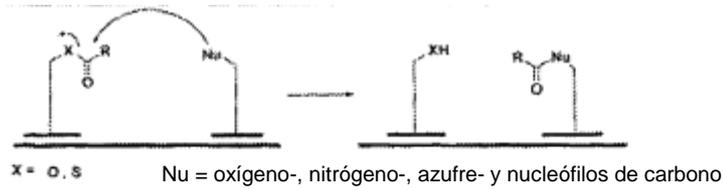
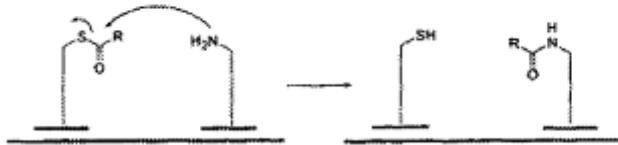


Figura 30. Tipos de reacciones que permiten una reacción y una activación simultáneas sustitución nucleofílica utilizando la activación de electrófilos



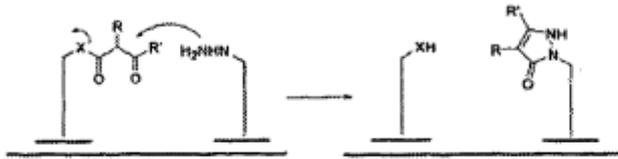
B. Acilación

formación de amidas por medio de la reacción de aminas con ésteres



C. Acilación

formación de pirazolonas por medio de la reacción de hidracinas con  $\beta$ -cetoésteres



D. Acilación

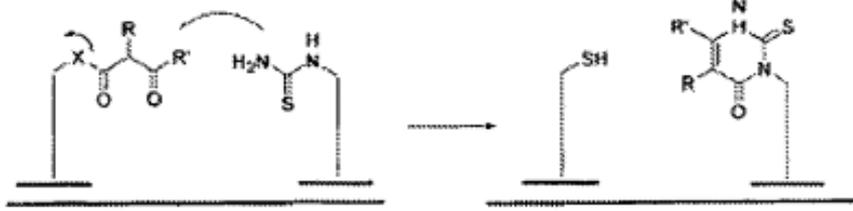
formación de isoxazolona por medio de la reacción de hidroxilaminas con  $\beta$ -cetoésteres



E. Acilación

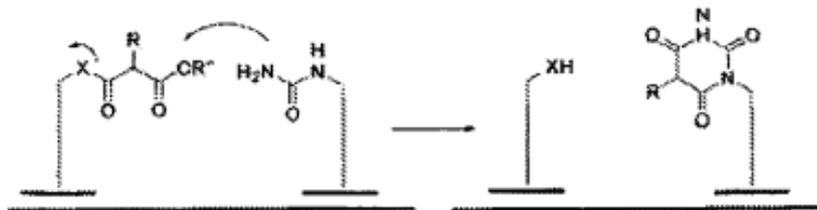
formación de pirimidinas por medio de la reacción de tioureas con  $\beta$ -cetoésteres

5



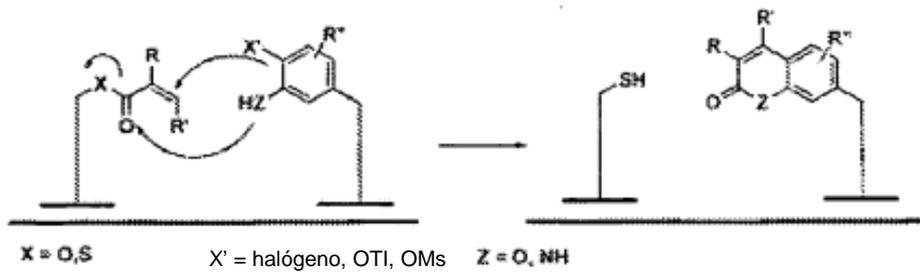
F. Acilación

formación de pirimidinas por medio de la reacción de ureas con Malonatos



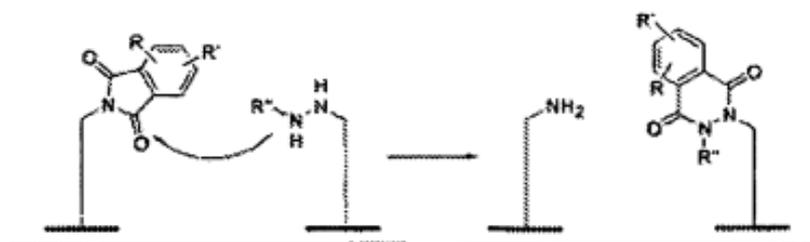
G. Acilación

formación de cumarina o quinolinona por medio de una reacción de Heck seguido por una sustitución nucleofílica



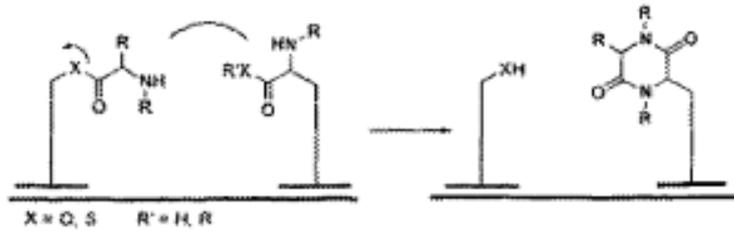
H. Acilación

formación de Ftalhidricidas por medio de la reacción de hidracina as y ftalmidas



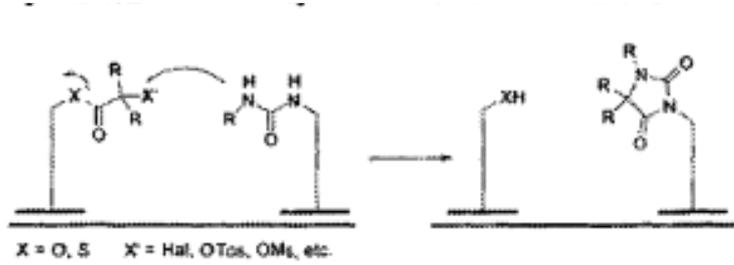
I. Acilación

formación de dicetopiperacina por medio de la reacción de ésteres de aminoácidos



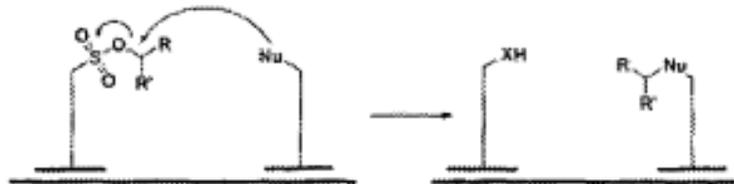
J. Acilación

formación de hidantoína por medio de la reacción de urea y ésteres  $\alpha$ -sustituidos

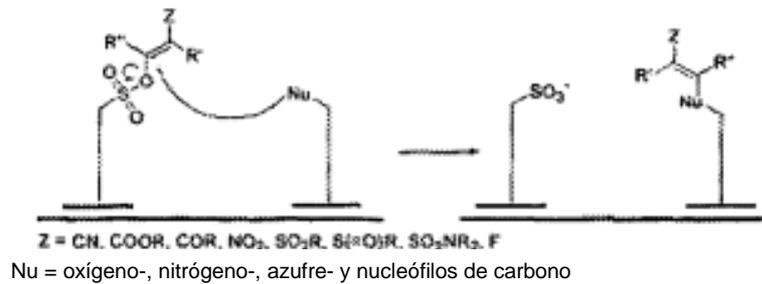


K. Alquilación de bloques monoméricos de construcción-principio

compuestos alquilados por medio de la reacción de sulfonatos y nucleófilos

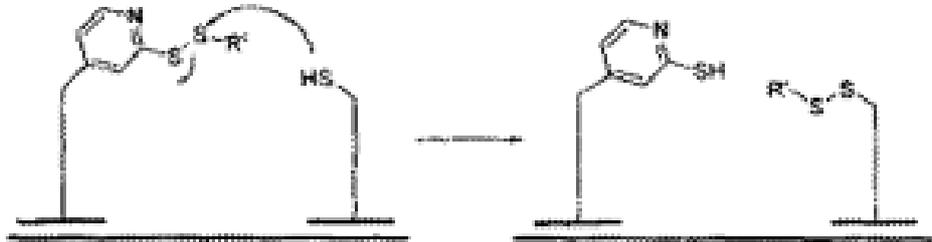


L. Vinilación de bloques monoméricos de construcción-principio



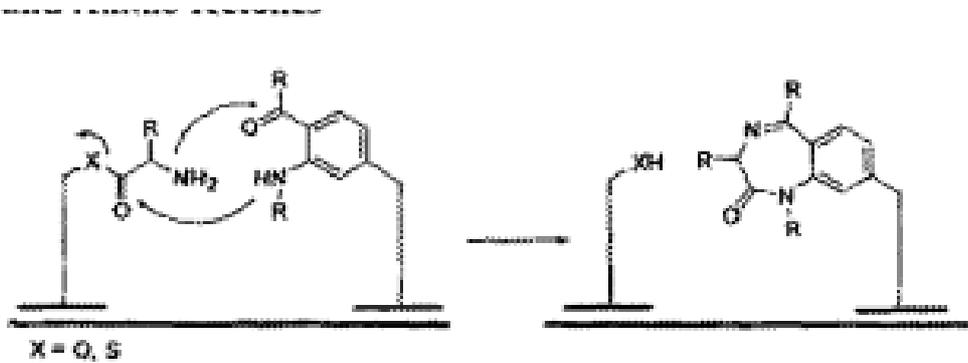
M. electrófilos de heteroátomos

formación de disulfuros por medio de la reacción de disulfuros de piridilo con mercaptanos



N. -acilación

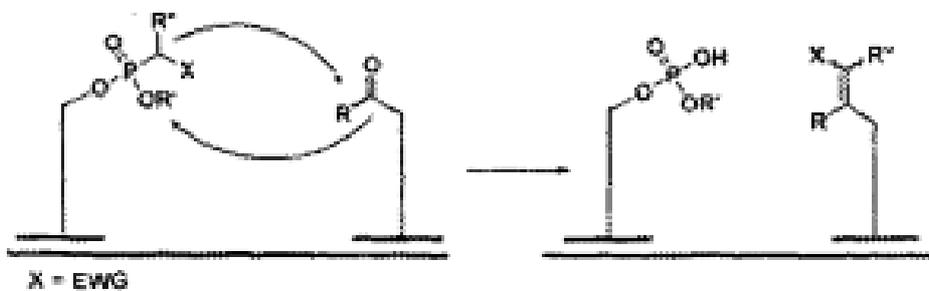
formación de benzodiazepinonas por medio de la reacción de ésteres de aminoácidos y amino cetonas



Adición de enlaces múltiples de carbono-hetero

O. Reactivos Wittig/Horner – Wittig-Emmons

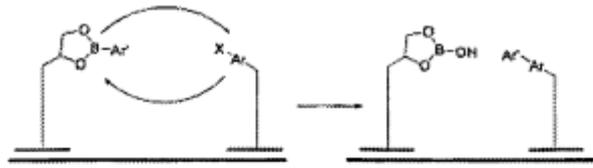
formación de alquenos sustituidos por medio de la reacción de fosfonatos con aldehídos o cetonas



Reacciones catalizadas de metales de transición

P. Arilación

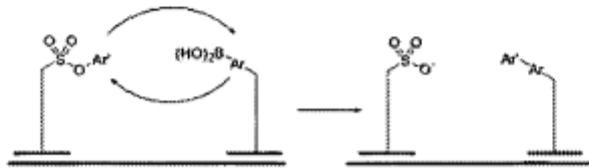
formación de biarilos por medio de la reacción de boronatos con arilo o heteroarilos



X = Halógeno, OMs, OTt, OTos, etc.

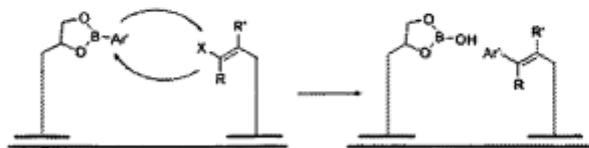
Q. Arilación

formación de biarilos por medio de la reacción de boronatos con arilos o heteroarilos



R. Arilación

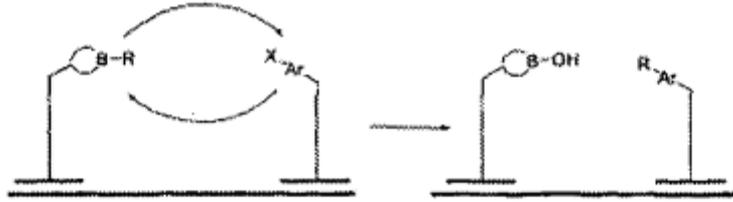
formación de vinilarenos por medio de la reacción de alquenos con arilos o heteroarilos



X = Halógeno, OMs, OTt, OTos, etc.

S. Alquilación

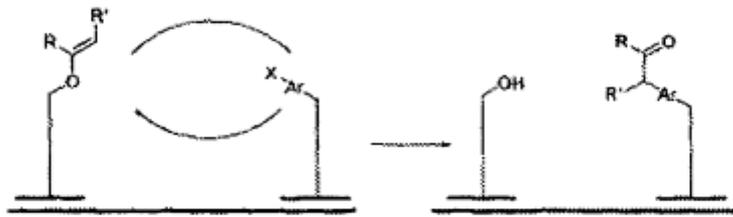
alquilación de arenos/hetarenos por medio de la reacción de boronatos de alquilo



X = Halógeno, OMs, OTt, OTos, etc.

T. Alquilación

alquilación de arenos / hetarenos por medio de la reacción con enoléteres

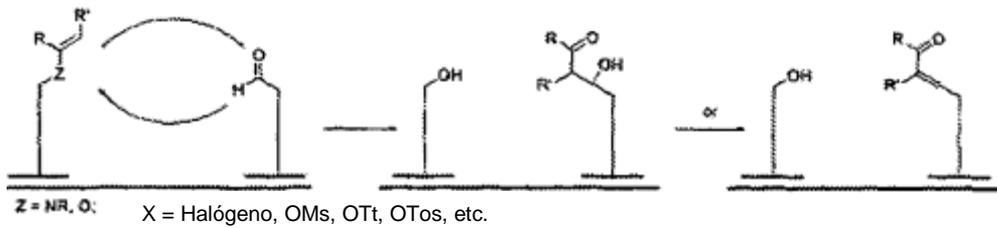


X = Halógeno, OMs, OTt, OTos, etc.

Sustitución nucleofílica utilizando la activación de nucleófilos

U. Condensaciones

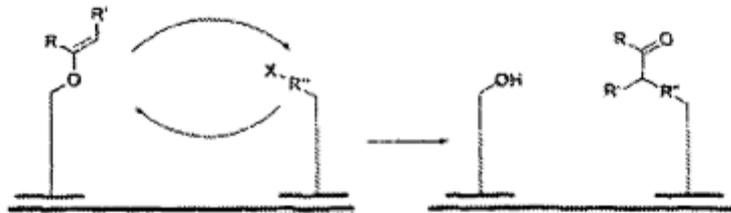
alquilación de aldehídos con enoléteres o enaminas



Z = NR, O; X = Halógeno, OMs, OTt, OTos, etc.

V. alquilación

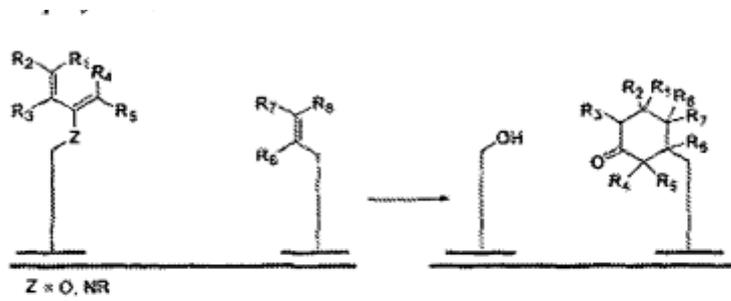
alquilación de haluros o tosilatos alifáticos con enoléteres o enaminas



X = Halógeno, OMs, OTt, OTos, etc.

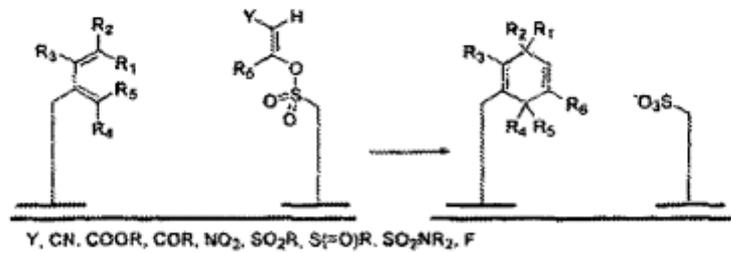
Cicloadiciones

W. [2 + 4] Cicloadiciones



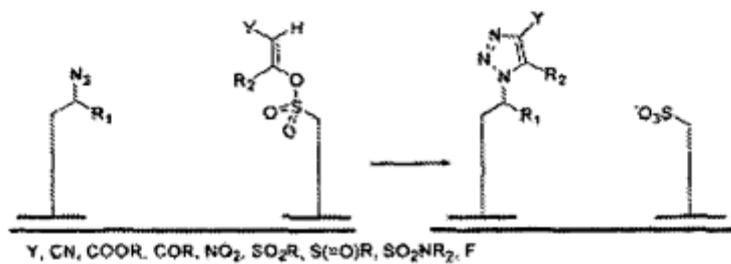
Z = O, NR

X. [2 + 4] Cicloadiciones



Y, CN, COOR, COR, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>R, S(=O)R, SO<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>, F

Y. [3 + 2] Cicloadiciones



Y, CN, COOR, COR, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>R, S(=O)R, SO<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>, F

Z. [3 + 2] cicloadiciones

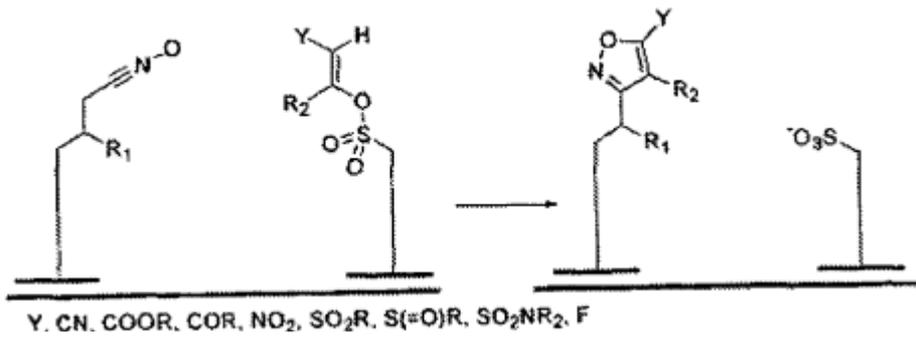


Figura 31. Modelación que involucra a una reacción de activación que no es simultánea

5

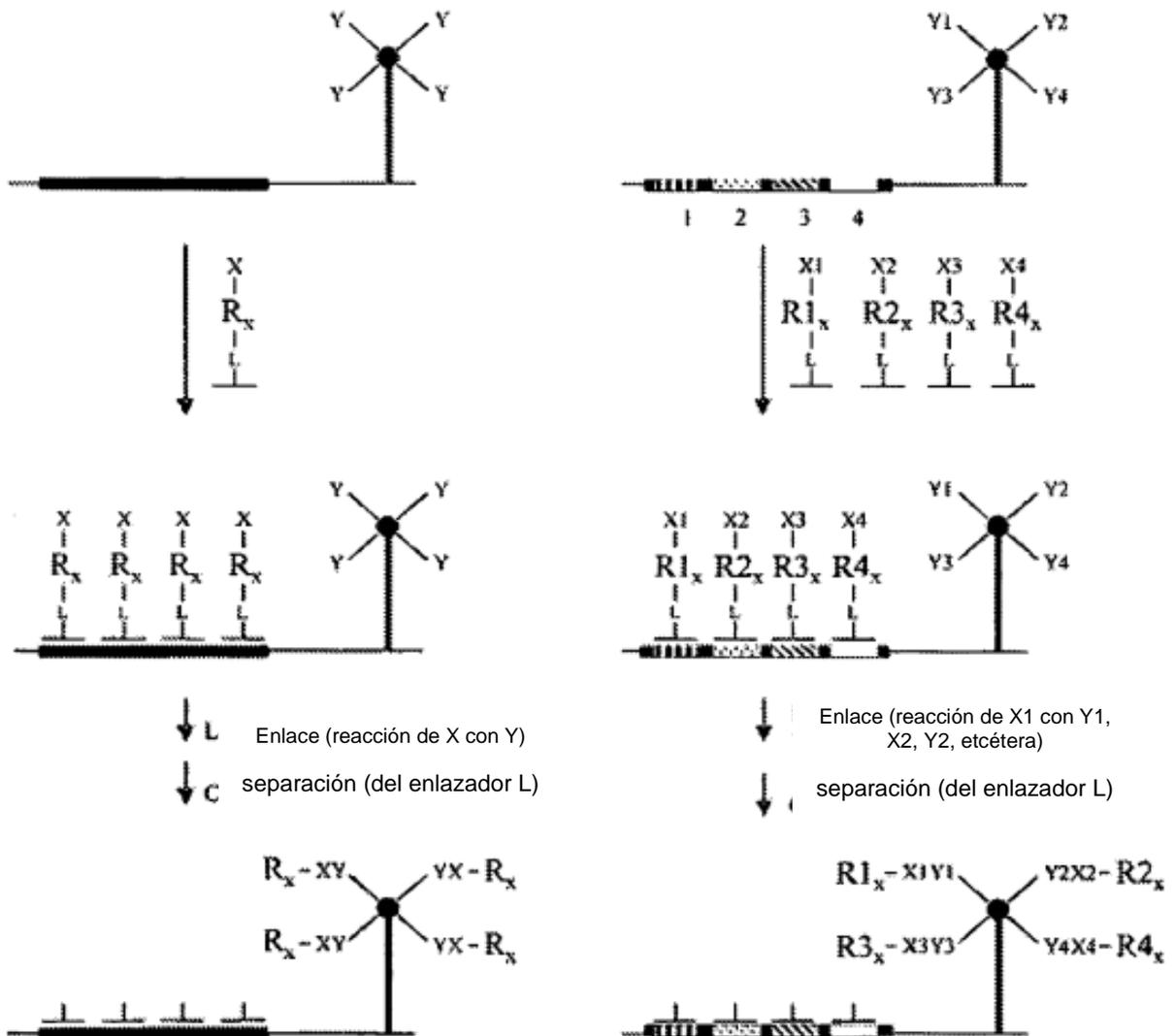
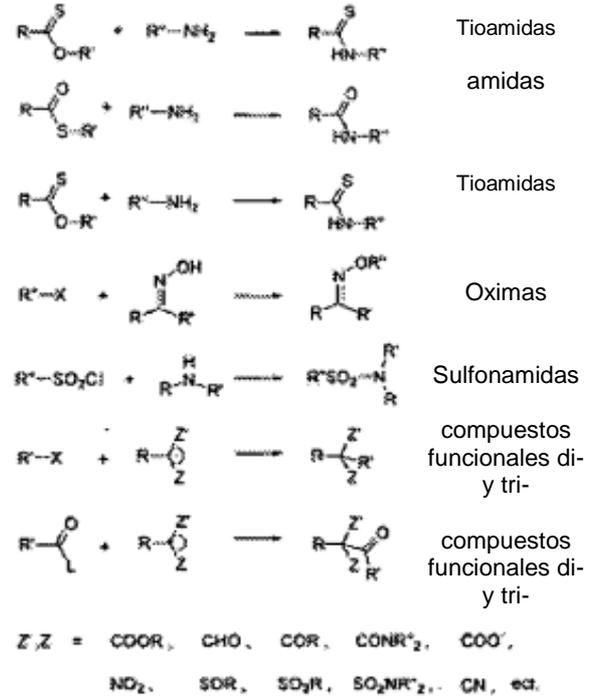
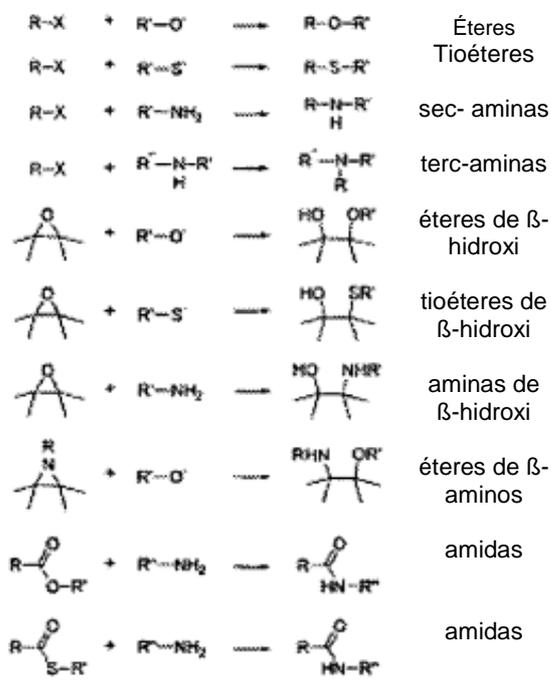


Figura 32. Parejas de grupos reactivos X, Y y el enlace resultante XY.

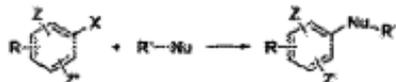
Reacción de sustitución nucleofílica

5



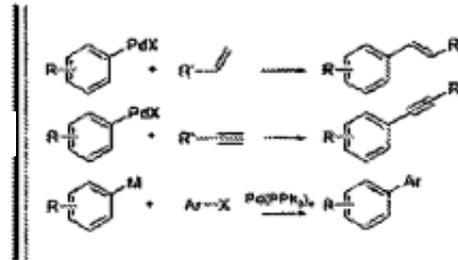
Sustitución nucleofílica aromática

Compuestos aromáticos sustituidos



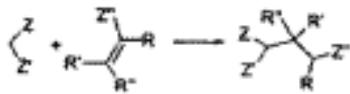
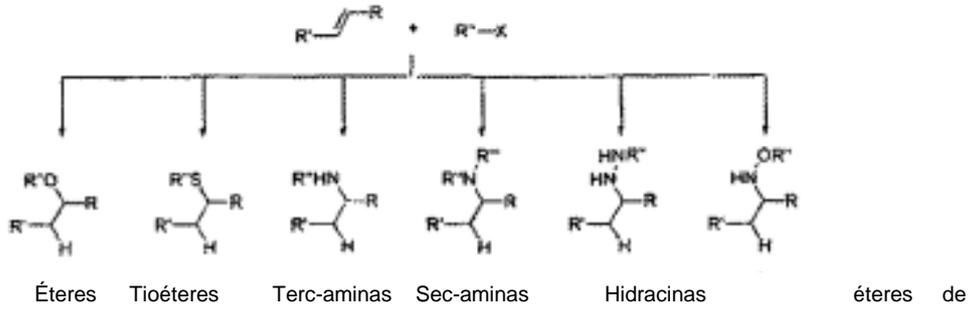
Un = nucleósidos de oxígeno-, nitrógeno-, azufre- y carbono-  
 X = F, Cl, Br, I, OSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, OSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, OSO<sub>2</sub>TOL... etc.  
 Z, Z' = COOR, CHO, COR, CONR<sub>2</sub>, COO', CN, NO<sub>2</sub>, SOR, SO<sub>2</sub>R, SO<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>... etc.

reacciones de transición catalizadas con metales



Compuestos aromáticos sustituidos con vinilo  
 Compuestos aromáticos sustituidos con alquino  
 Compuestos β-arilos

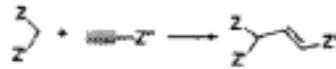
Adición a enlaces múltiples carbono-carbono



Z = H, Alkyl, Z', Ar  
 Z' = COOR, CHO, COR, CONR<sub>2</sub>, CN, NO<sub>2</sub>, SOR, SO<sub>2</sub>R, SO<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>, etc.  
 Z = Z' R = R', ≠ R'', = Z

Compuestos multi funcionales

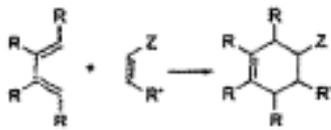
Alkyl = alquilo



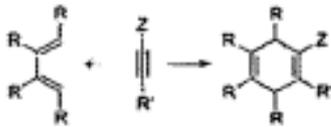
Z = H, Alkyl, Ar.  
 Z' = Z', Alkyl, Ar.  
 Z = COOR, CHO, COR, CONR<sub>2</sub>, CN, NO<sub>2</sub>, SOR, SO<sub>2</sub>R, SO<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>, etc.

Alquenos di- y tri- funcionales

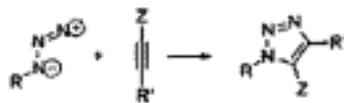
Cicloadición a enlaces múltiples



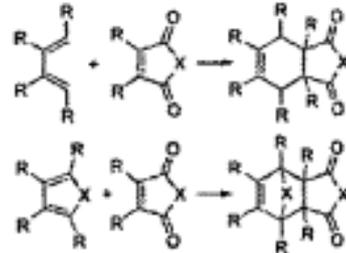
Cicloalquenos sustituidos



Ciclodienos sustituidos



Uno,2,3-triazoles sustituidos

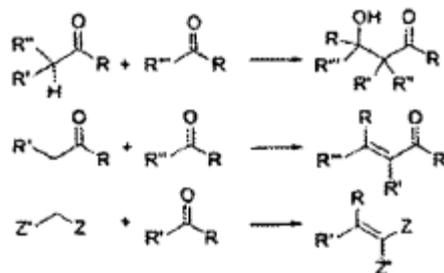


Cicloalquenos sustituidos

Z = COOR, CHO, COR, COOH, COAr, CN, NO<sub>2</sub>, Ar, CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CN, SOR, SO<sub>2</sub>R etc.  
 R = H, Alkyl, Ar, Z X = O, NR, CR<sub>2</sub>, S,

Cicloalquenos sustituidos

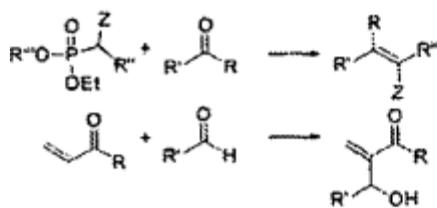
Adición a enlaces múltiples carbono-hetero



Cetonas de β-hidroxis  
aldehídos de β-hidroxis

cetonas de vinilo  
aldehído de vinilo

Alquenos sustituidos



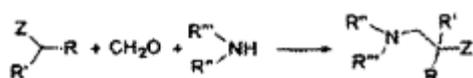
Alquenos  
sustituidos

Alquenos  
sustituidos

Z, Z' = COOR, CHO, COR, CONR''<sub>2</sub>, CN, NO<sub>2</sub>, SOR,  
SO<sub>2</sub>R, SO<sub>2</sub>NR''<sub>2</sub>, ect. R'' = H, Alkyl, Aryl

Alkyl = alquilo

Aryl = Arilo



Aminas  
sustituidas

Z = COOR, CHO, COR, SOR, SO<sub>2</sub>R, CN, NO<sub>2</sub>, ect.

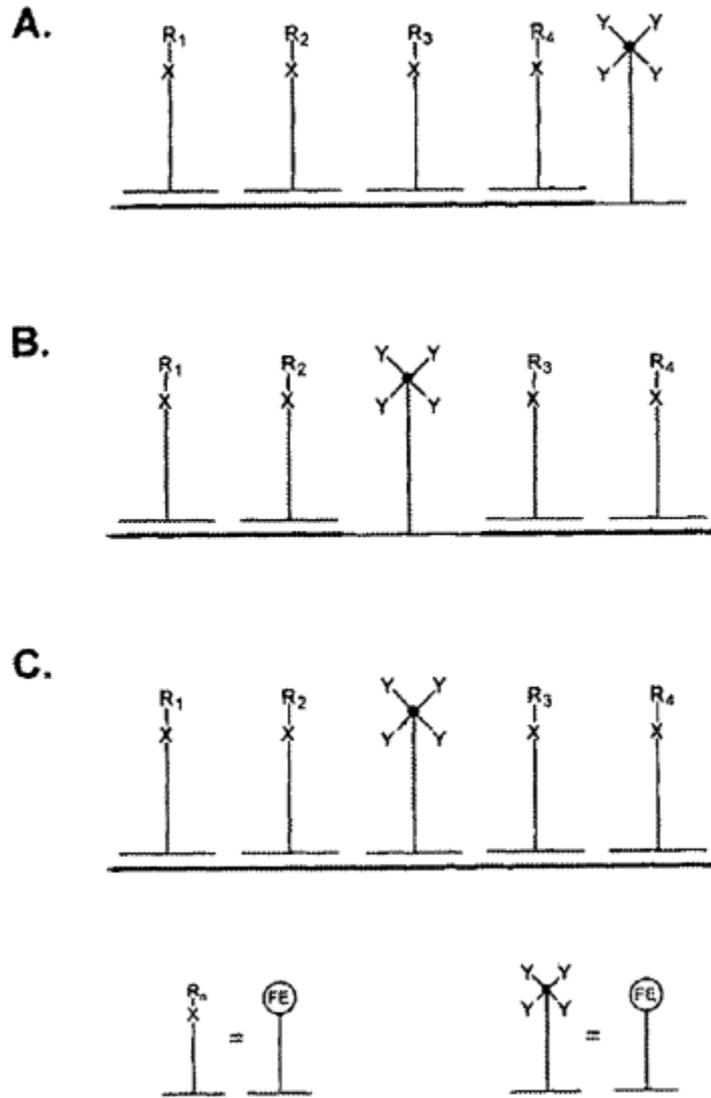
R = R', H, Alkyl, Ar.



Aminas  
sustituidas

R'' = R'', H, Alkyl, COR,

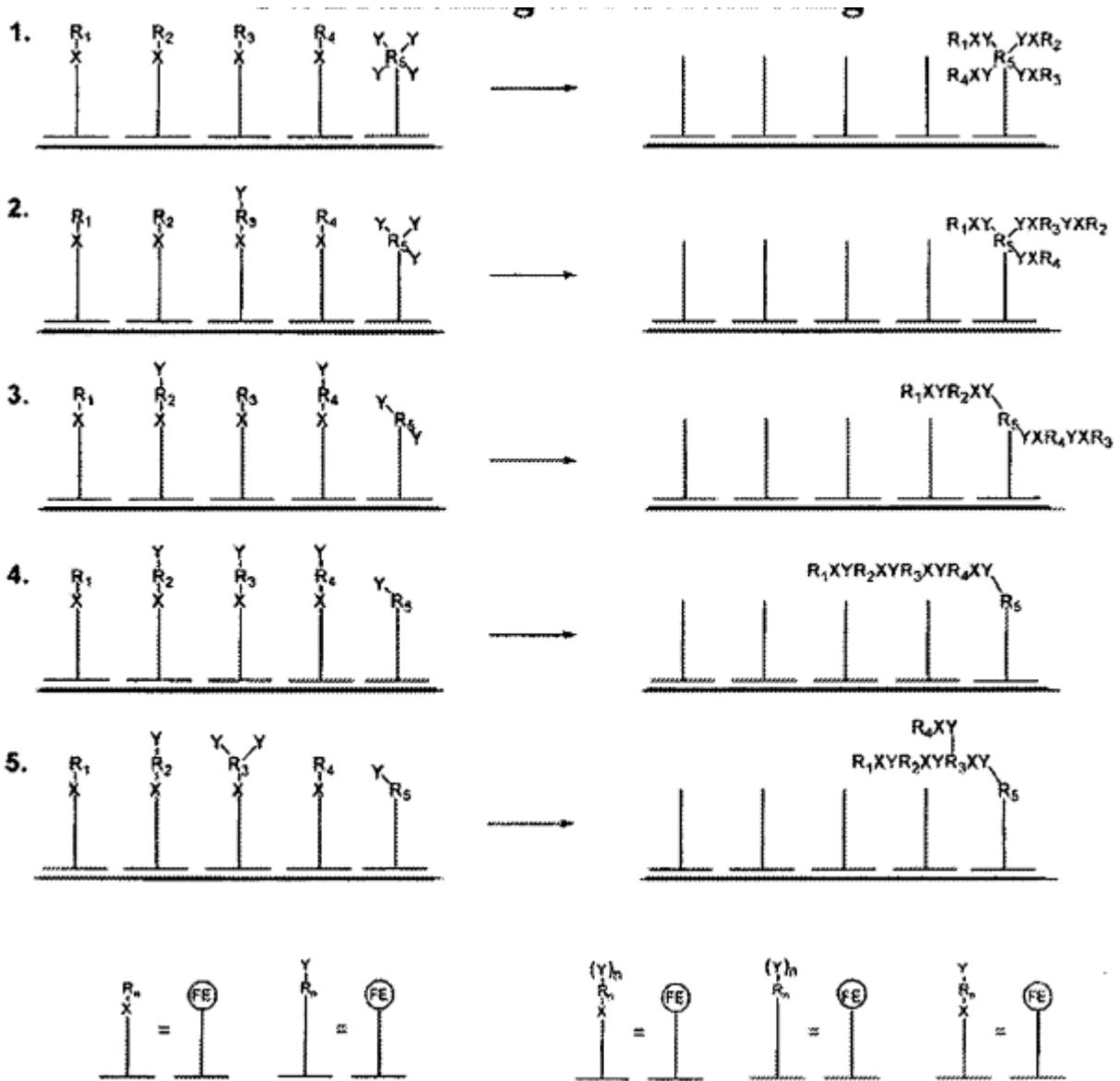
33. Anclaje-ejemplos



Bloques monoméricos de construcción tipo I

bloques monoméricos de construcción tipo II

34. Ramificaciones y mezclas



Bloques monoméricos de construcción tipo I

bloques monoméricos de construcción tipo II

35. Bloques Monoméricos de Construcción, ejemplos de diseño de enlazadores

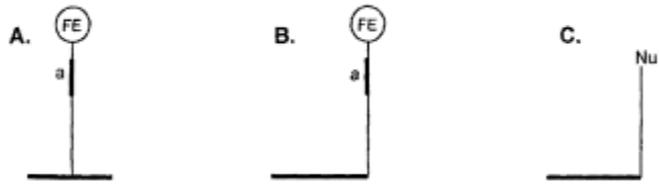
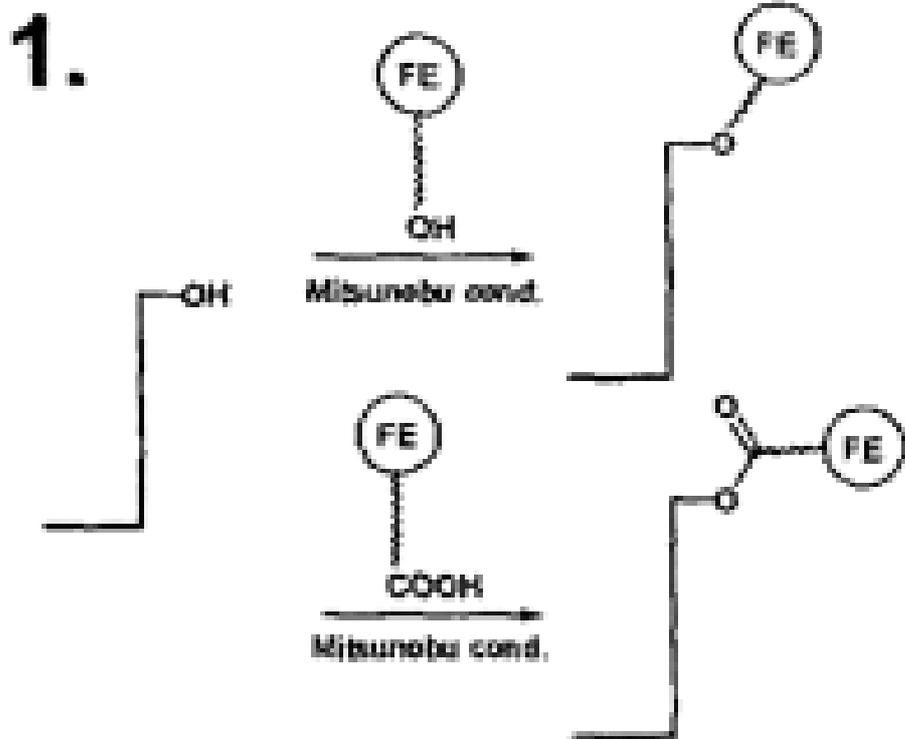


Figura 36. Formación de bloques monomérico de construcción-ejemplos



**2.**

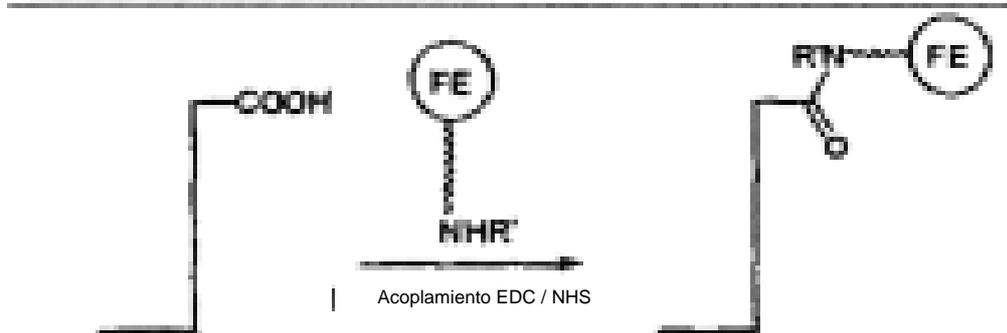


Figura 36. Cont.

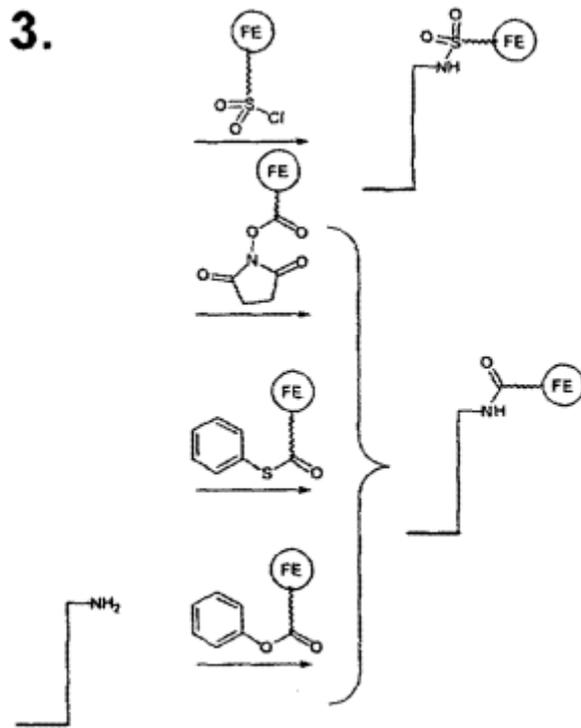
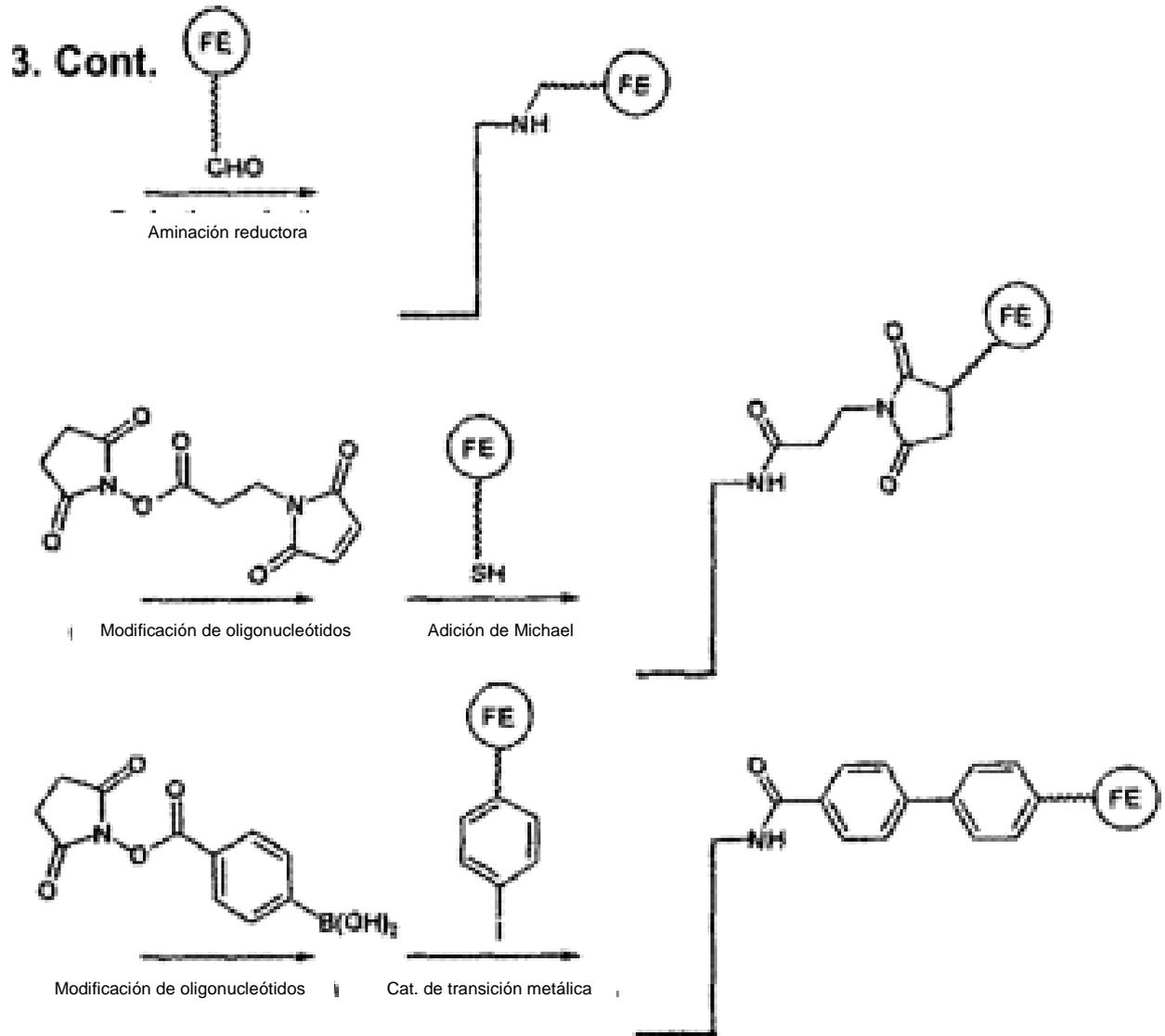
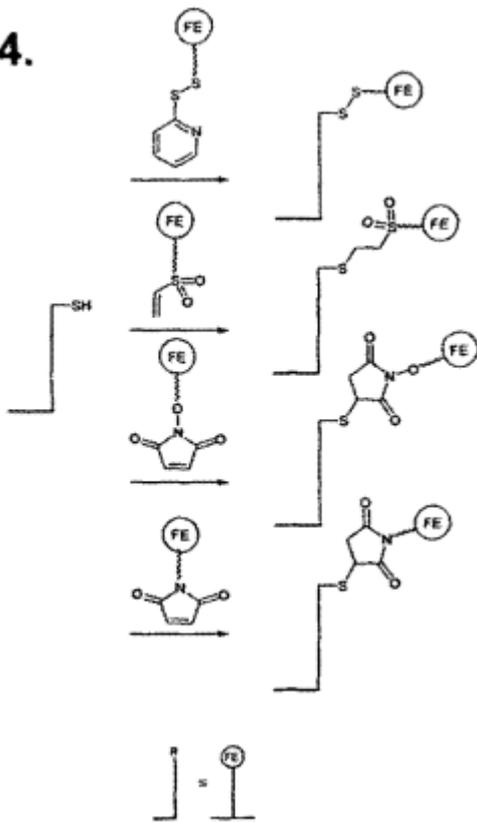


Figura 36. Cont.



Fibra 36. Cont.

4.



bloques monomérico de construcción

Figura 36. Cont.

5.

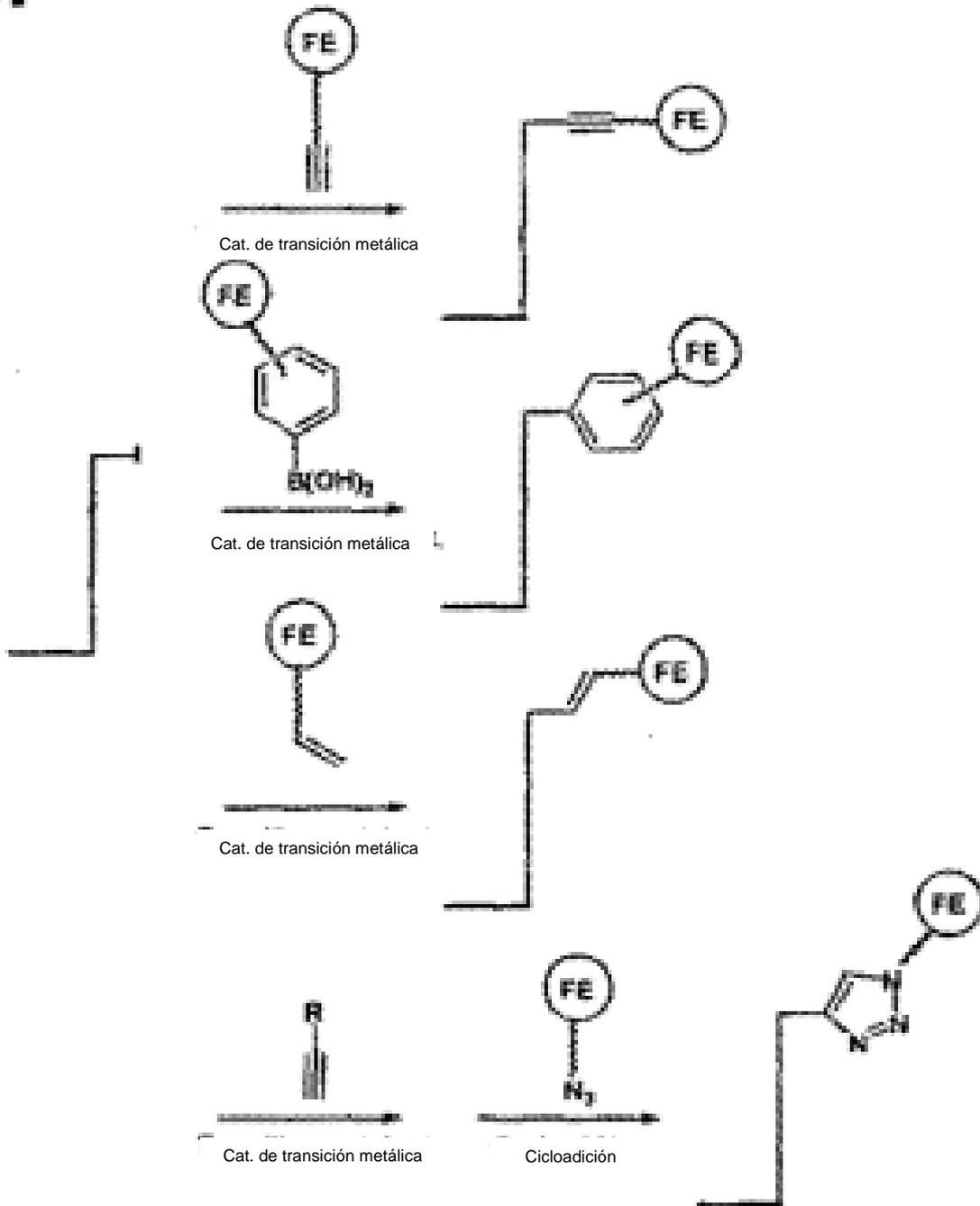
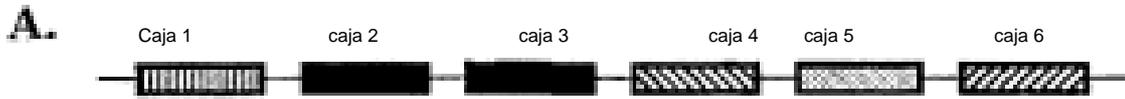




Figura 38. Un bloque monomérico de construcción que se basa en oligonucleótidos. Ejemplo de cómo complementar a diseño del elemento, permitiendo una diversidad monomérica alta.



Caja	secuencia	diversidad monomérica
1	XXXXXATATTXXXXX	1024
2	XXXATTTTAXXXXXXX	1024
3	XXXATTTTAXXXXXXX	1024
4	XXATXXATXXATXXX	1024
5	GCCCGATTAAAXCCG	4
6	XAXATTTTXXXGGG	128

X = G o C

**B.**

Elemento codificador (caja 1)	GCCCGATATTTGGGCC
Elemento complementario	CGCGCTATAAACCCGG
Elemento codificador (caja 6)	GAGAGTTCTTCGCGGG
elemento complementario	CTCTCAAGAAGCGCCC

Figura 38, continuación.

C.

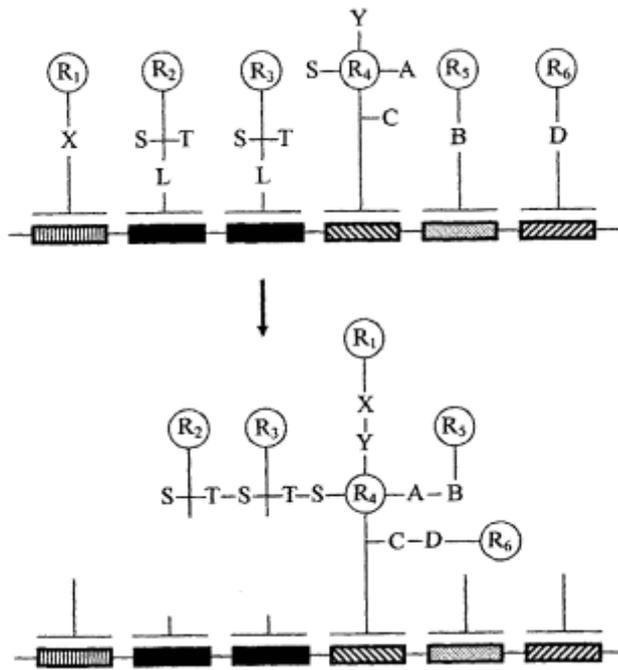


Figura 39. Un protocolo típico de visualización panorámica para seleccionar las moléculas modeladas

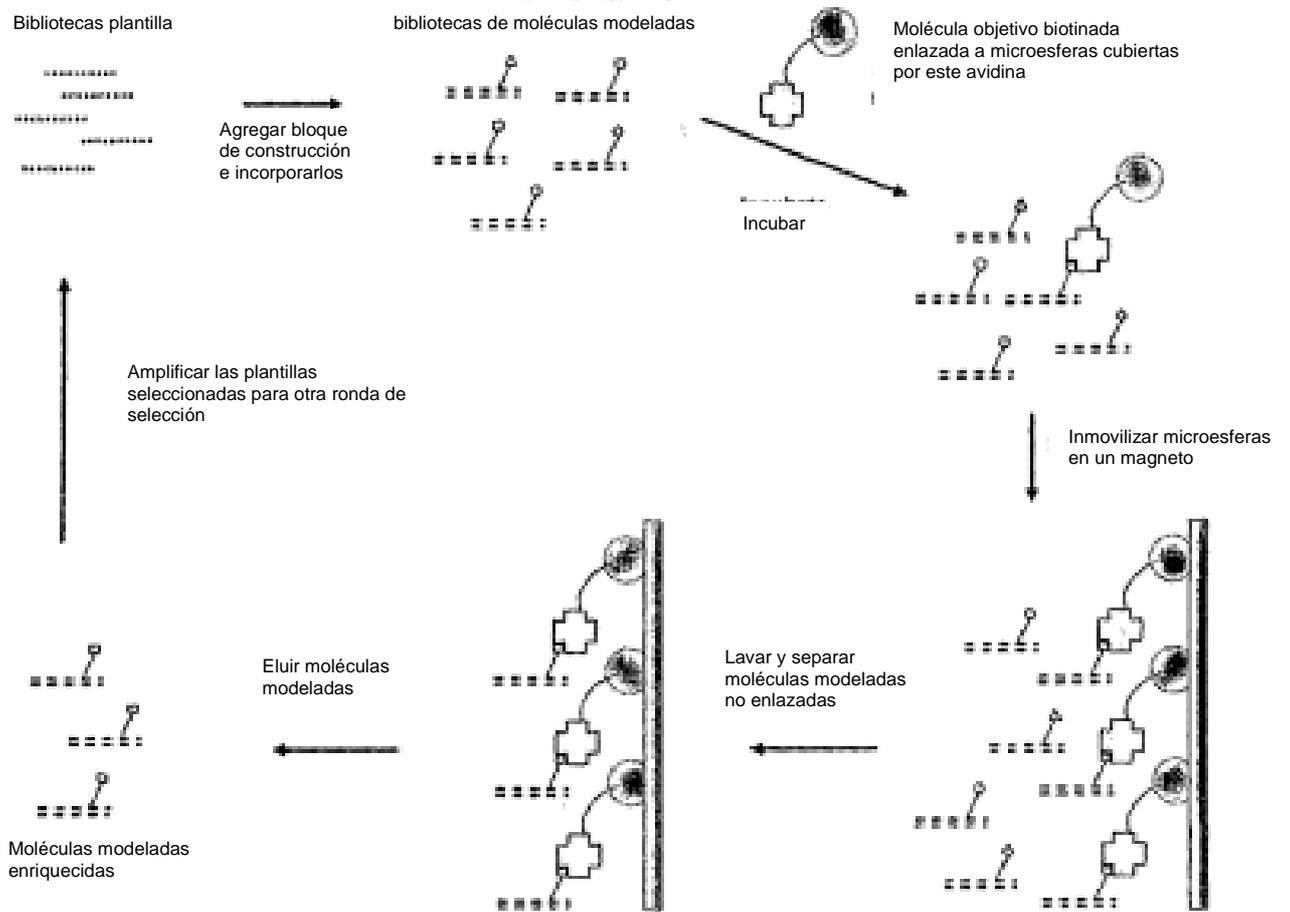
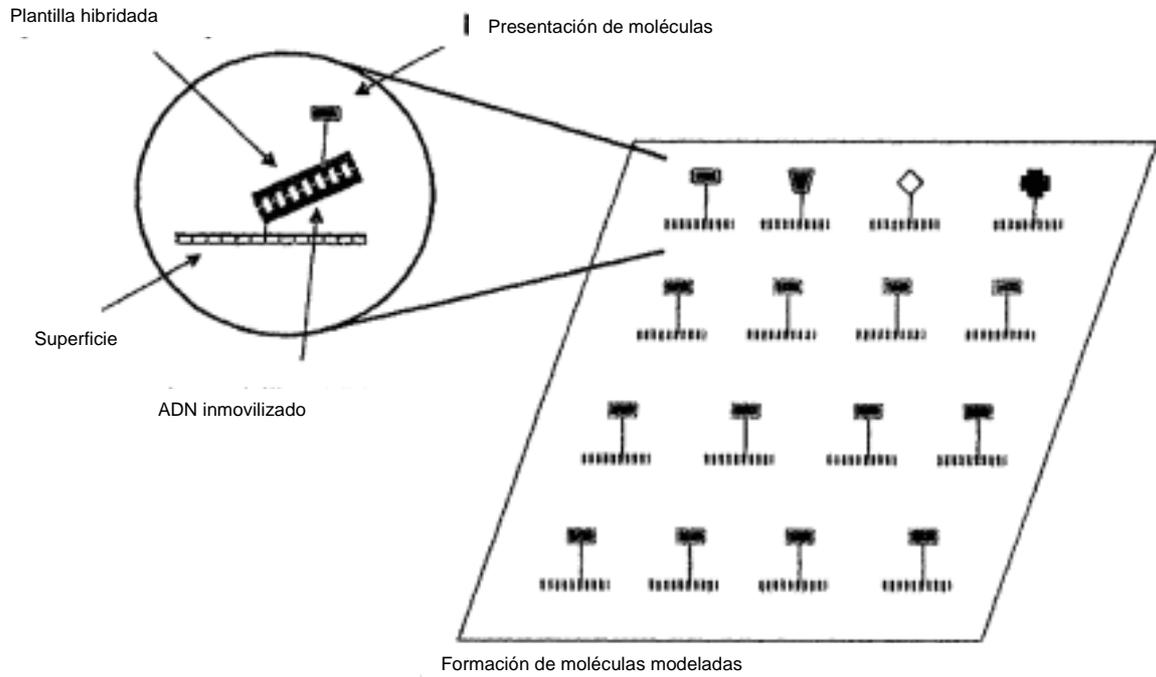


Figura 40. Formación de moléculas modeladas



41. Utilización de enlazadores rígidos o parcialmente rígidos

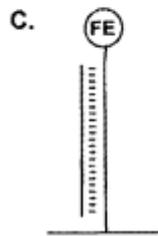
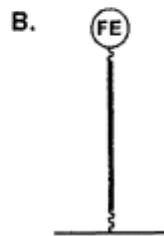
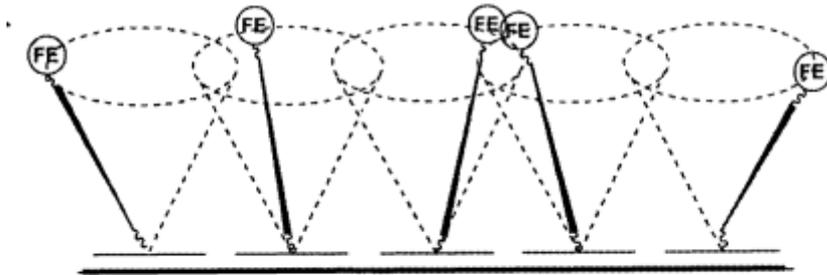


Figura 42. Uso de cajas de compresión

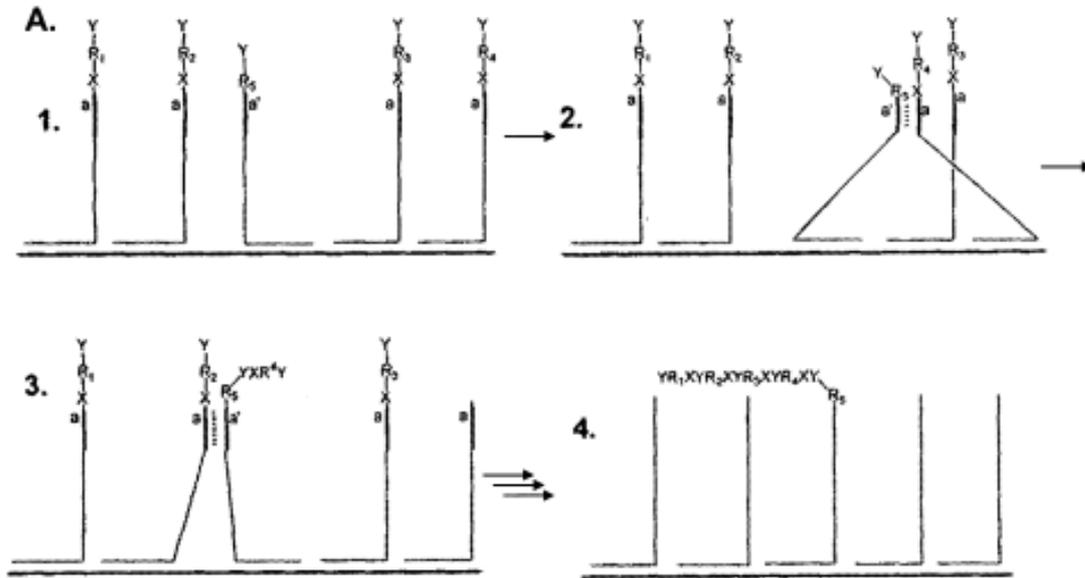




Figura 43. Síntesis modelada de compuestos orgánicos-ejemplos

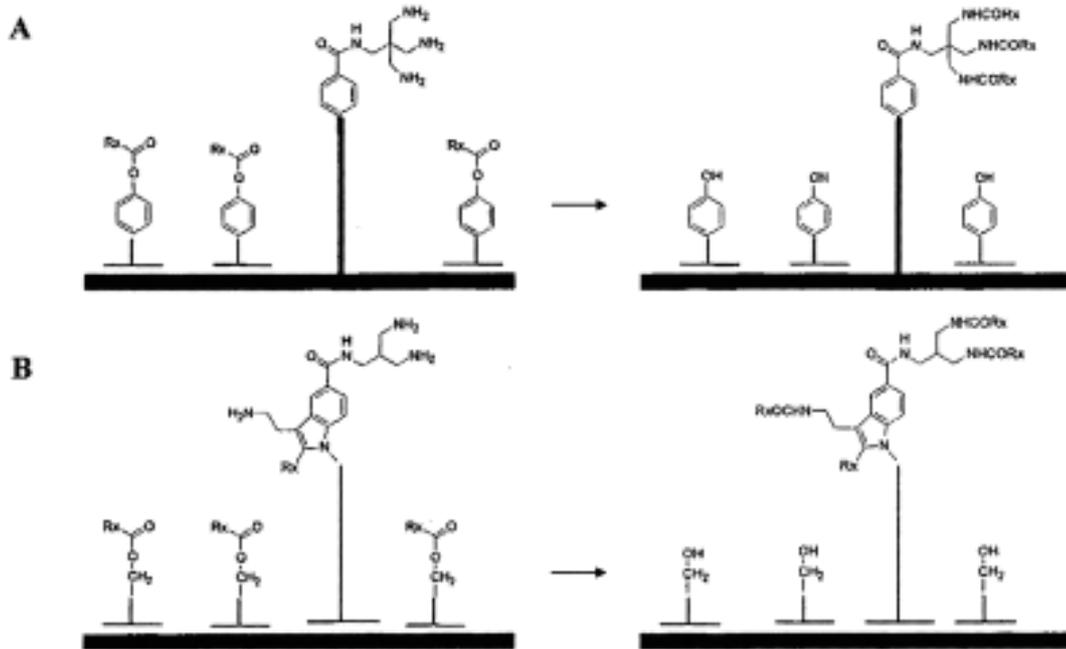
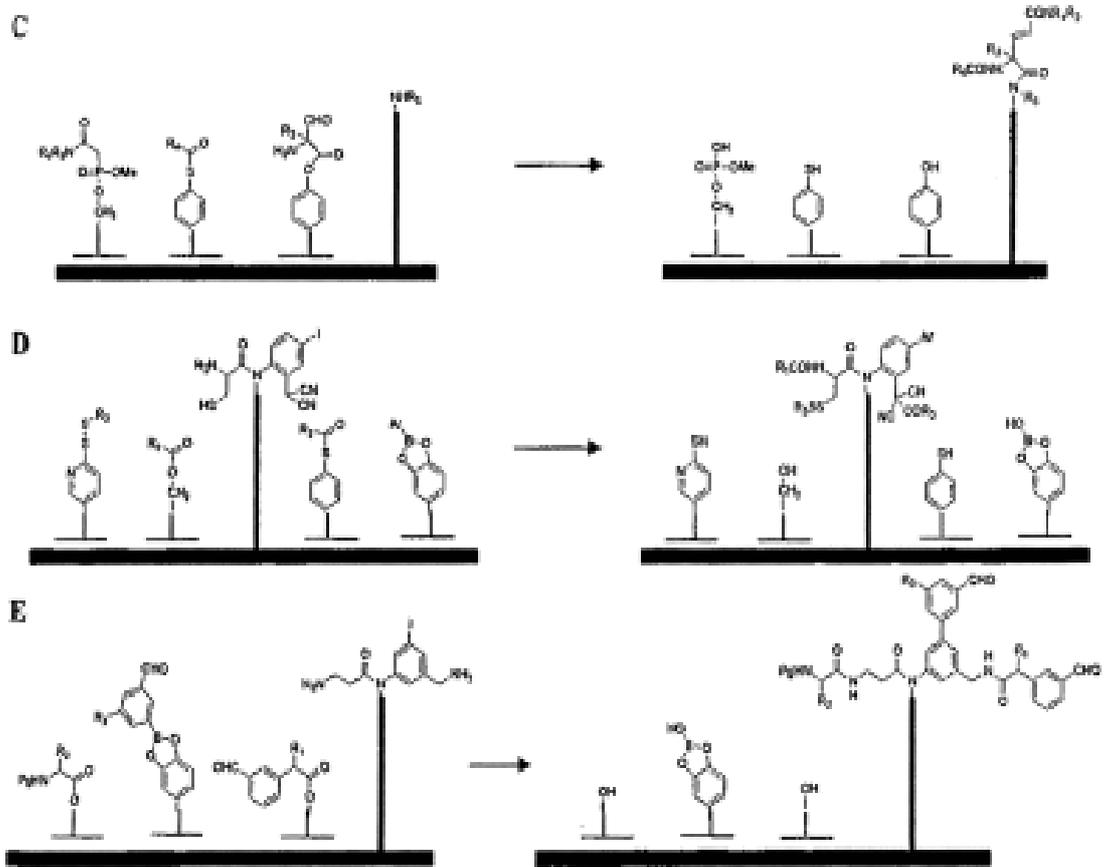
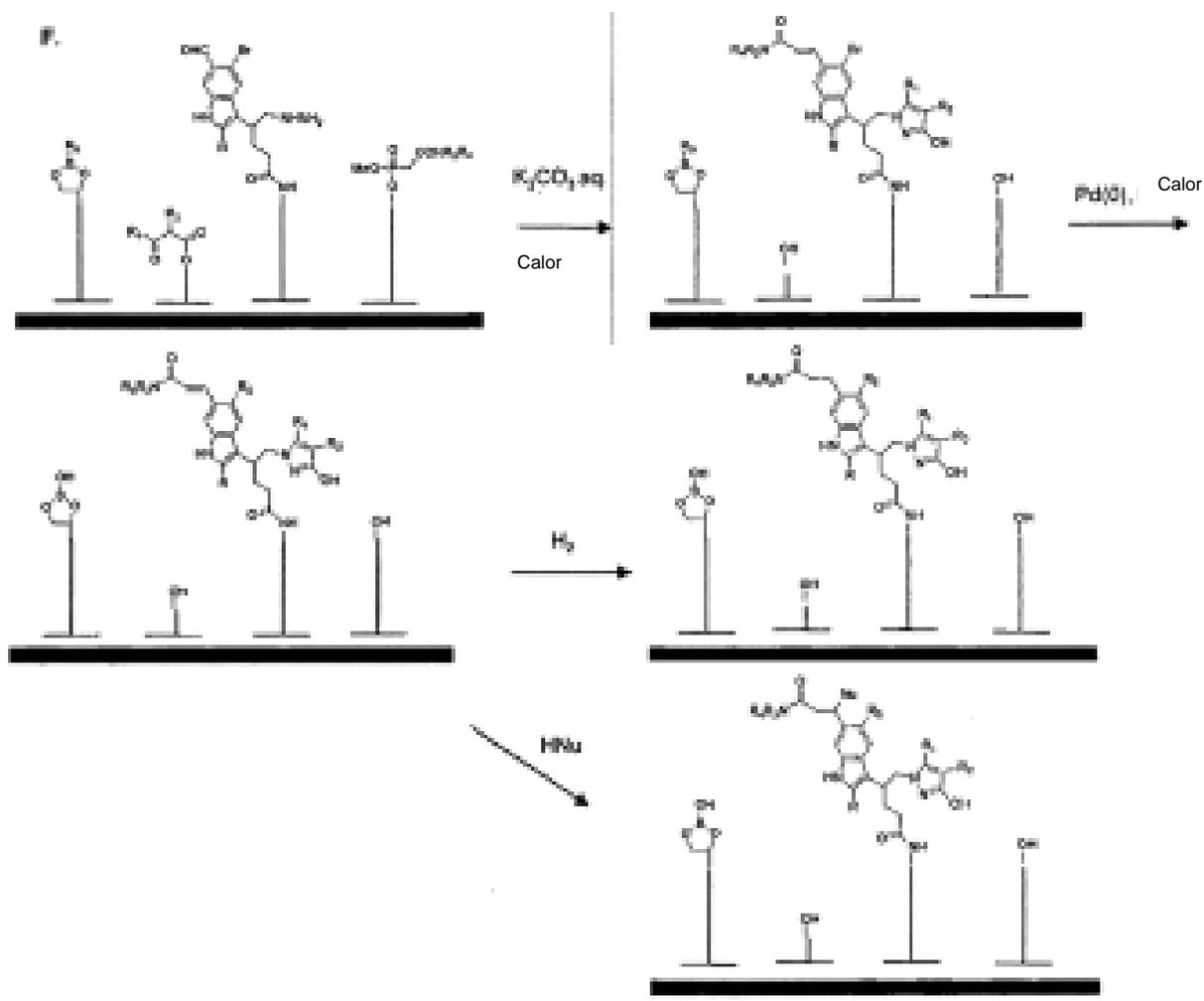
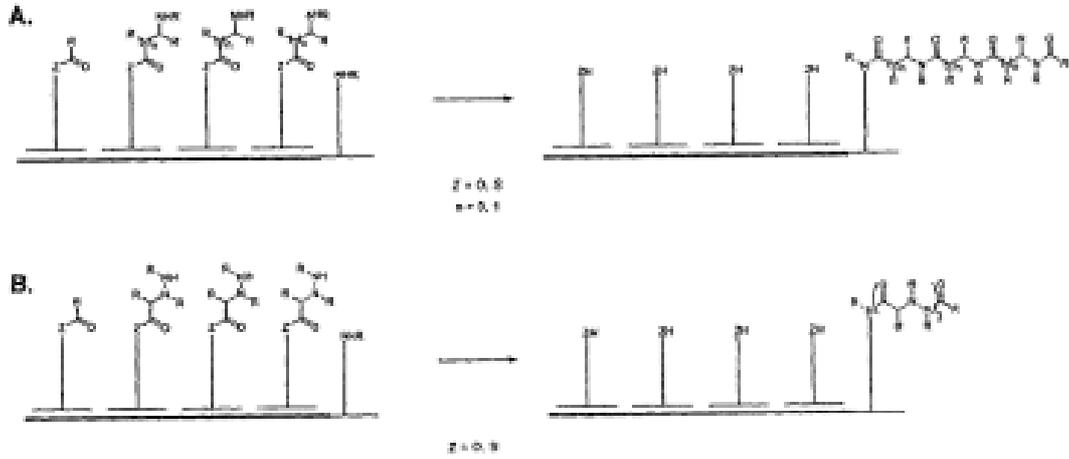


Figura 43. Cont.

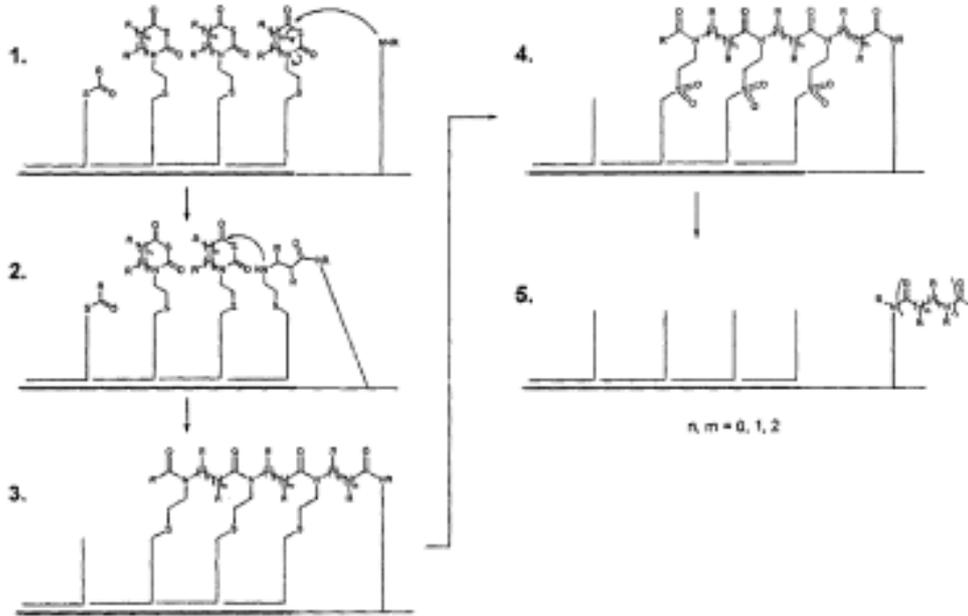




44. Codificación polimérica-ejemplos: ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) péptidos, peptóides o péptidos de hidracino

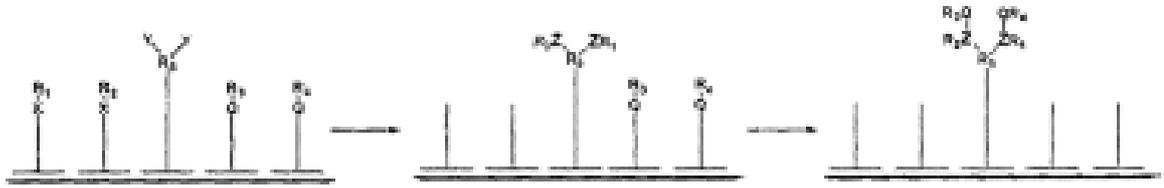


45. Codificación polimérica-ejemplos: ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\omega$ -péptidos por medio del uso de unidades NTA

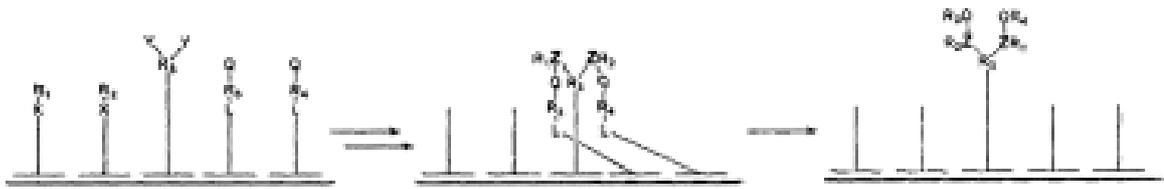


46. Modelación doble

**A.**



**B.**



46. Ejemplo 1: modelación doble

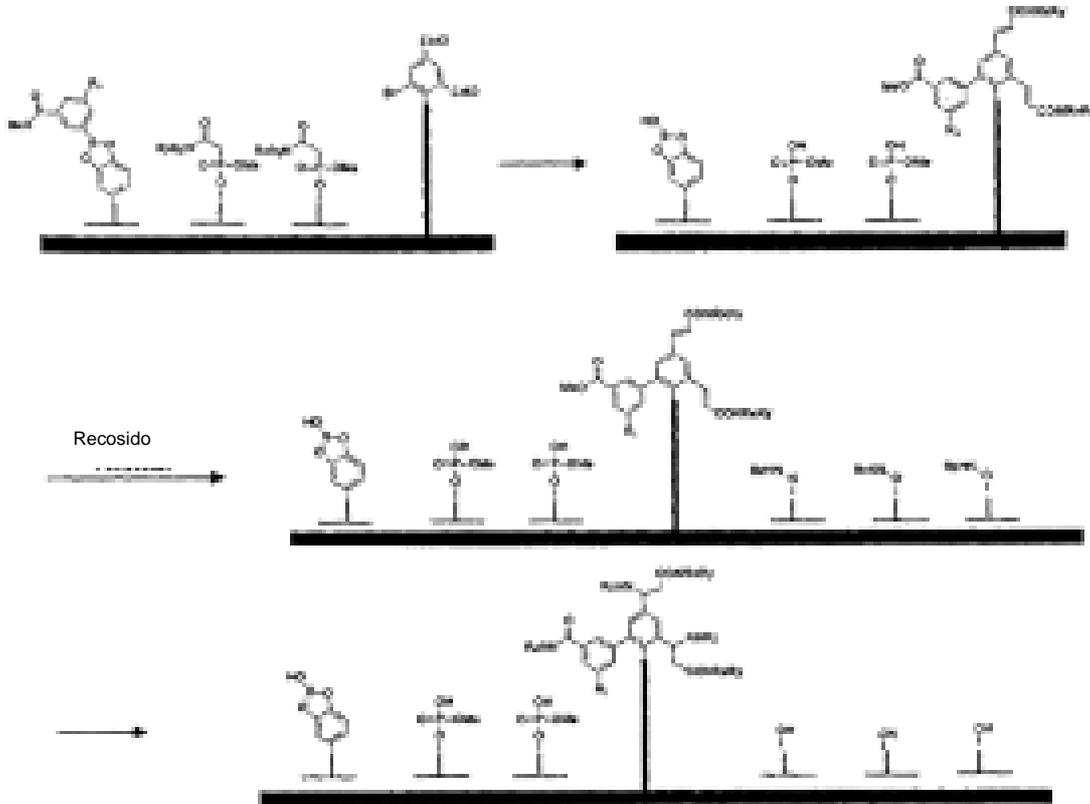
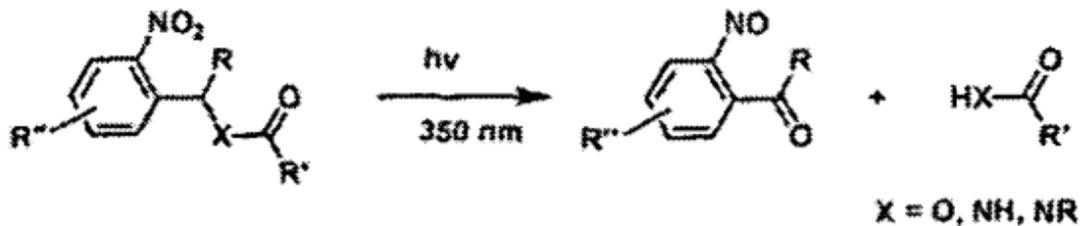
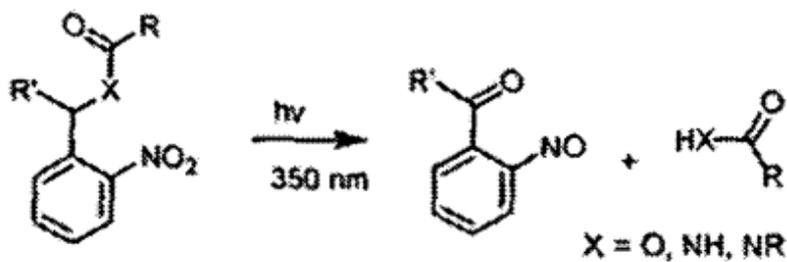


Figura 47. Enlazadores separables

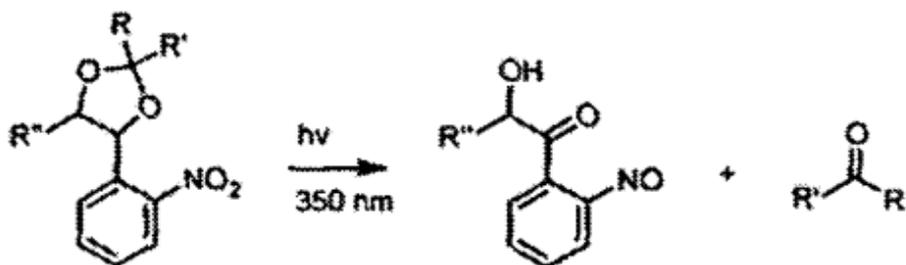
A. Enlazador para la formación de cetonas, aldehídos, amidas y ácidos



B. Enlazador para la formación de cetonas, amidas y ácidos



C. Enlazador para la formación de aldehídos y cetonas



E. Enlazador para la formación de aminas y alcoholes

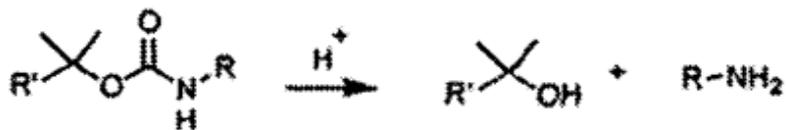
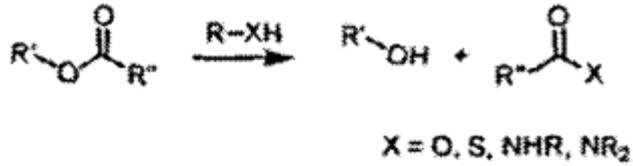
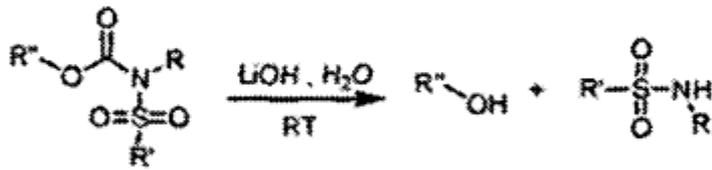


Figura 47. Cont.

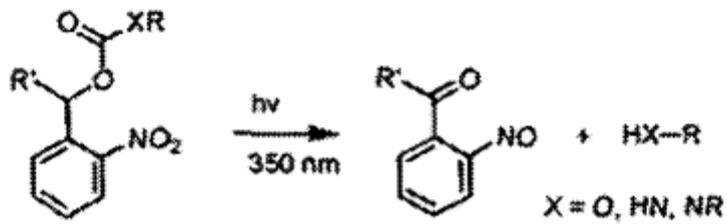
F. Enlazador para la formación de ésteres, tioésteres, amidas y alcoholes



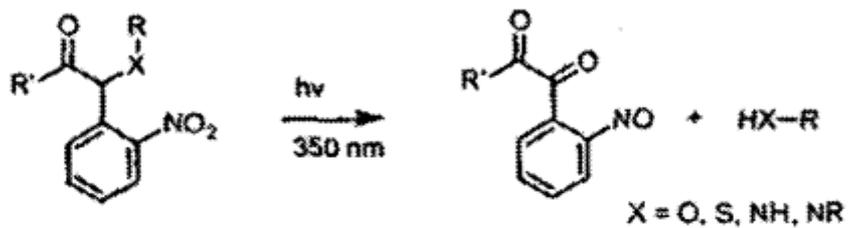
G. Enlazador para la formación de sulfonamidas y alcoholes



H. Enlazador para la formación de cetonas, aminas y alcoholes



I. Enlazador para la formación de cetonas, aminas, alcoholes y Mercaptanos



J. Enlazador para la formación de biarilos y hietarilos

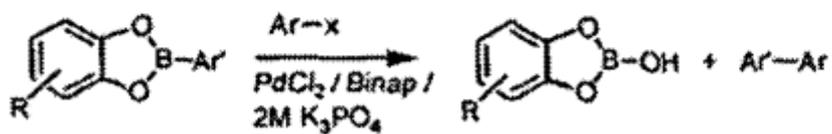
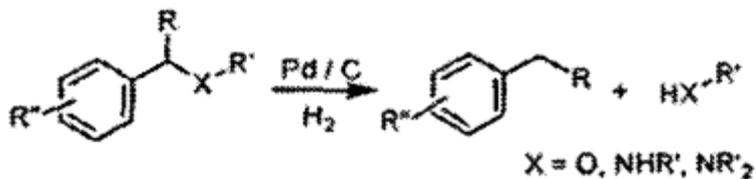


Figura 47. Cont.

K. Enlazador para la formación de bencilos, aminas, alcoholes y fenoles de anilinas

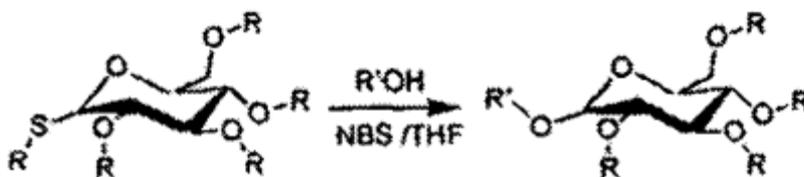


L. Enlazador para la formación de Mercaptanos

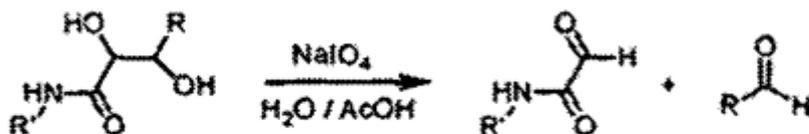


TCEP = 1 tris(2-carboxietil)fosfina

M. Enlazador para la formación de glucósidos



N. Enlazador para la formación de aldehídos y glicoxilamidas



O. Enlazador para la formación de aldehídos, cetonas y aminoalcoholes

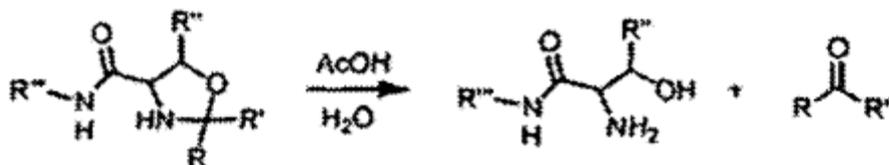
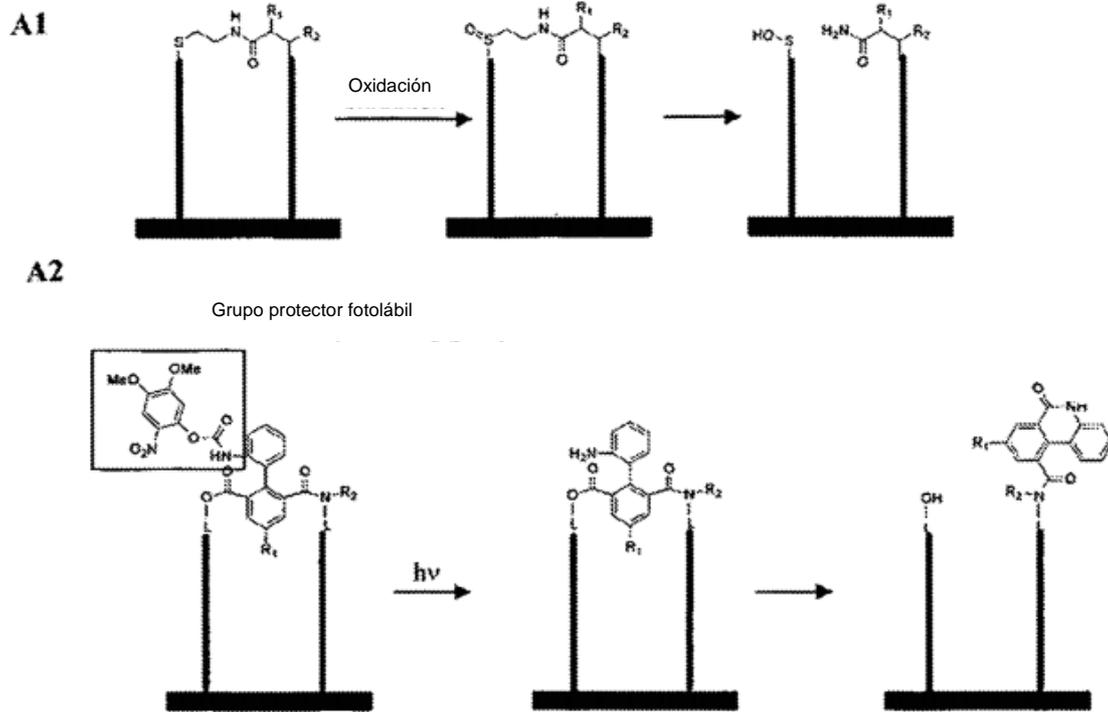


Figura 48. Modificación post-modelación de la molécula modelada una reorganización y separación en un paso, por ejemplo:



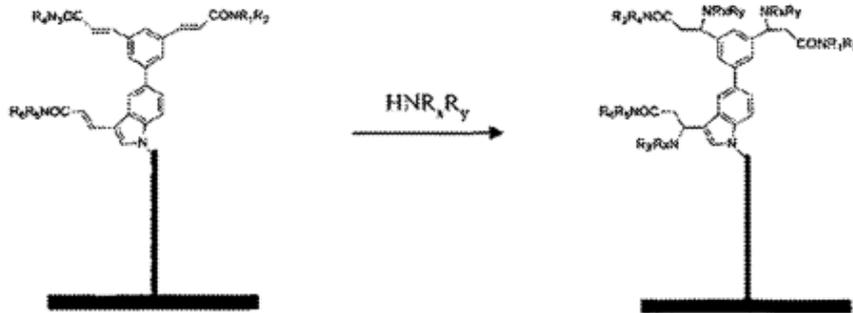
B Reacción de grupos funcionales presentes en una molécula modelada

B1 adición intramolecular de Michael:

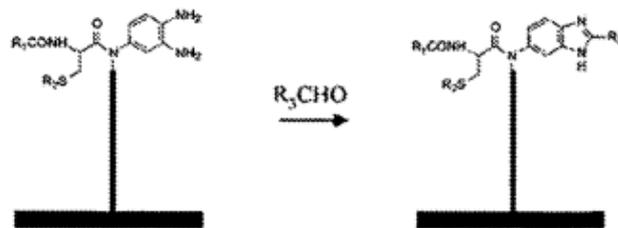


B1 adición intramolecular de Michael:

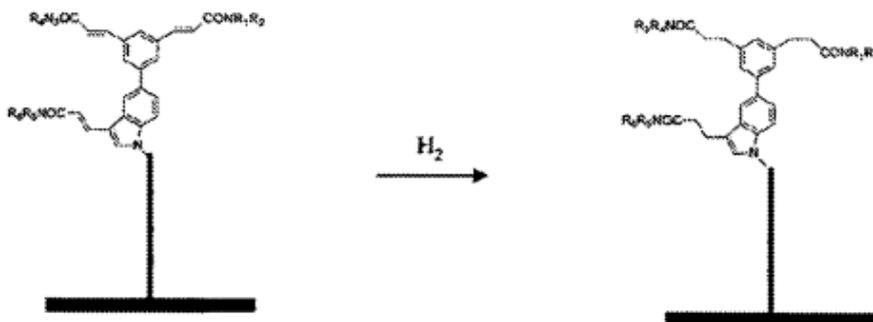
B2 adición intramolecular de Michael:



B3 reacción de fenilenediaminas y de aldehídos para formar bencimidazoles:



B4 reducción de enlaces múltiples:



C modificación post-modelación del enlazador para extender la separación entre la plantilla y la molécula modelada

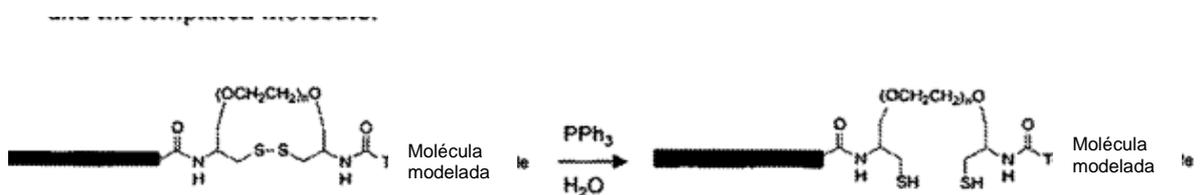


Figura 49



Figura 50

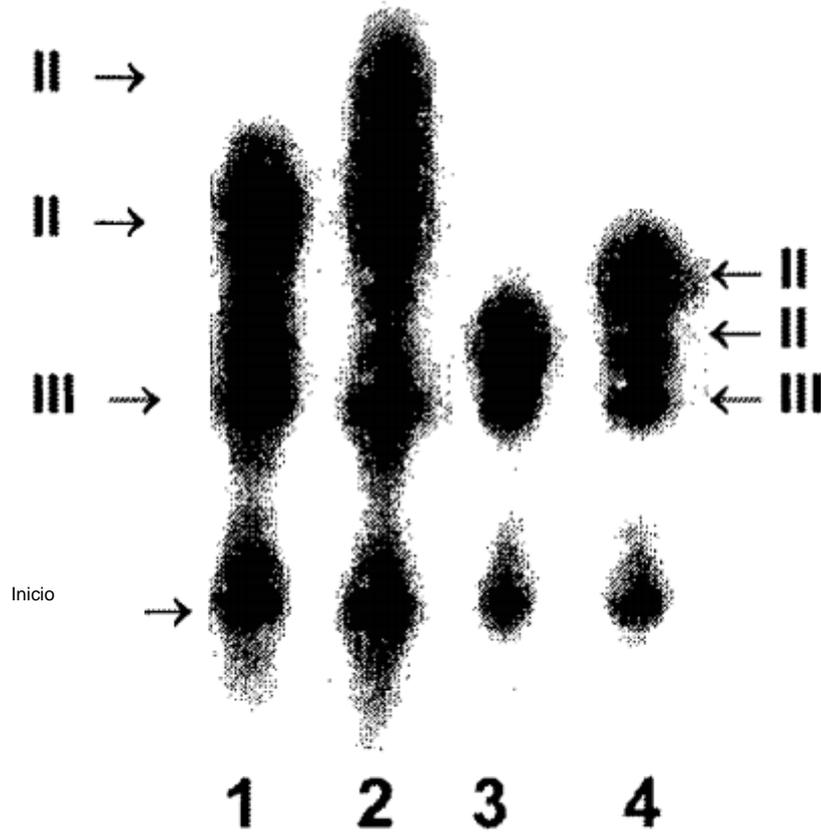


Figura 51

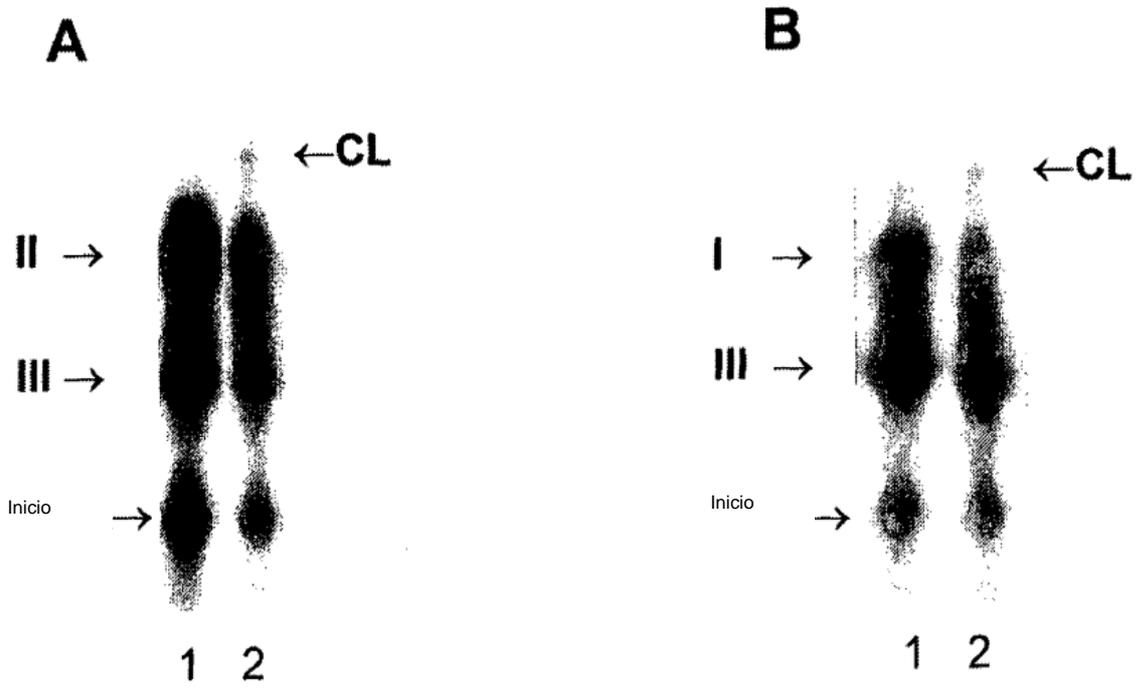


Figura 52

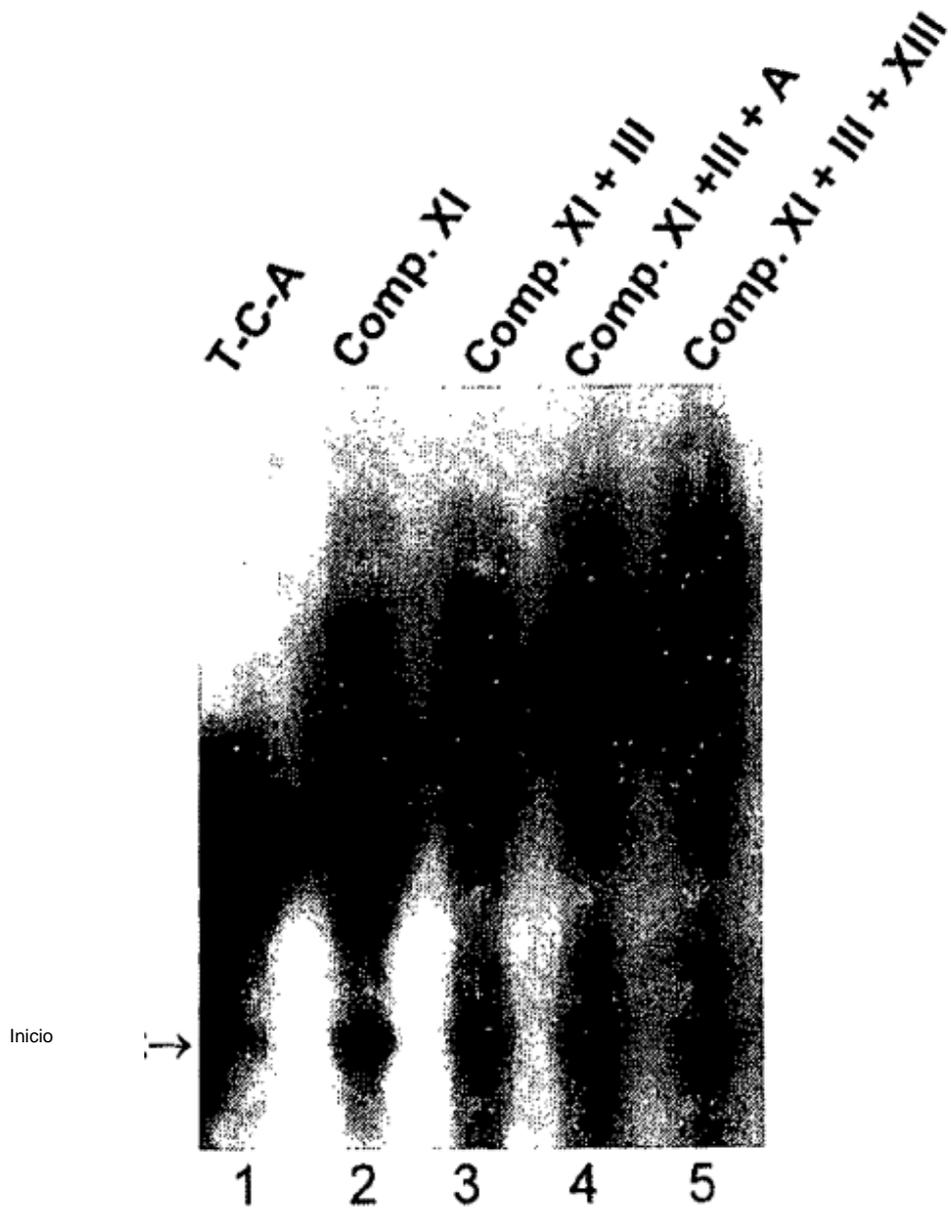


Figura 53

5

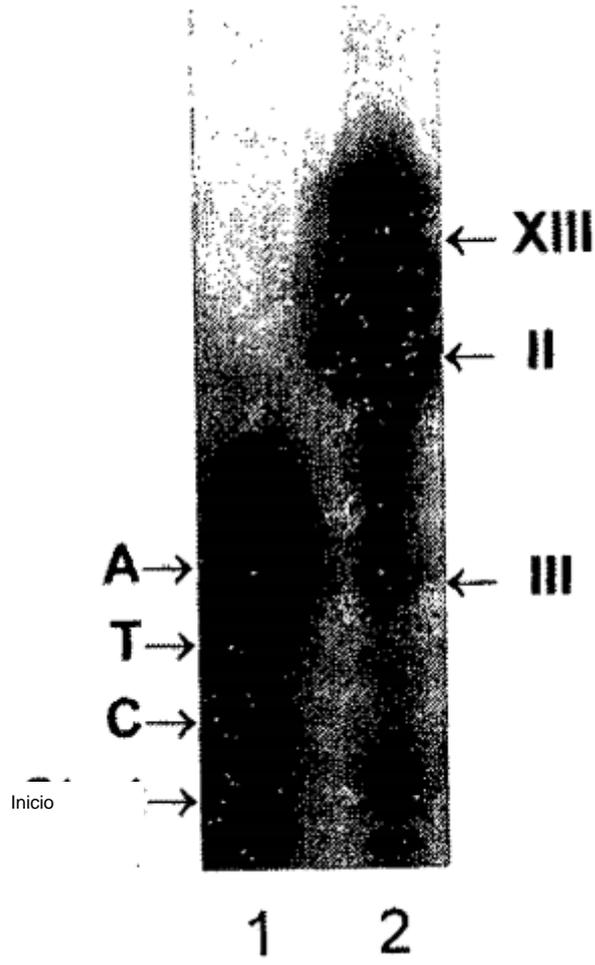
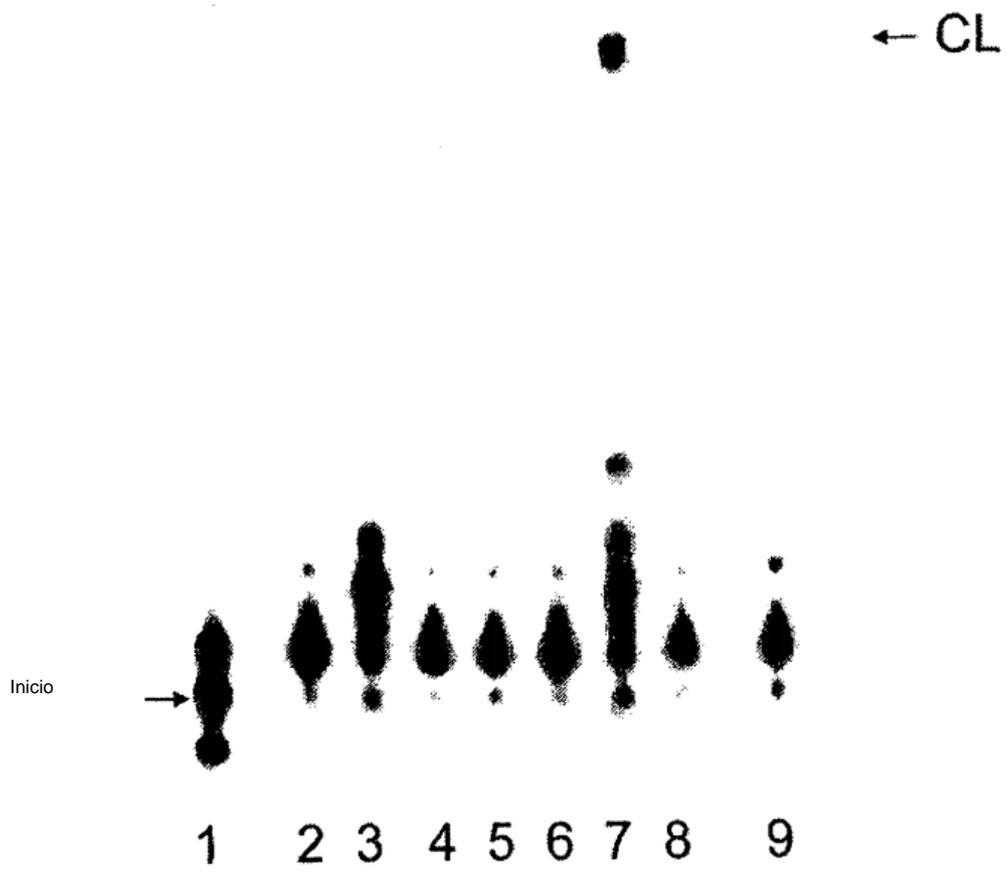


Figura 54



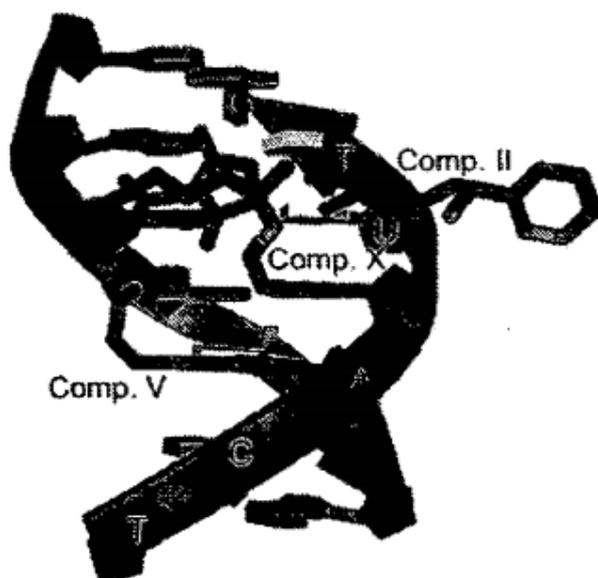


Figura 55A. Plantilla de ADN con nucleótidos modificados (compuesto V activado por medio de NHS) incorporados (todas se muestran en modelos de barras coloreados por el residuo)



Figura 55B. Plantilla de ADN que tiene modificaciones después de 1) la reacción entre el compuesto X y el compuesto V y 2) conexión del compuesto X y el compuesto II utilizando al reactivo agregado  $BS_3$

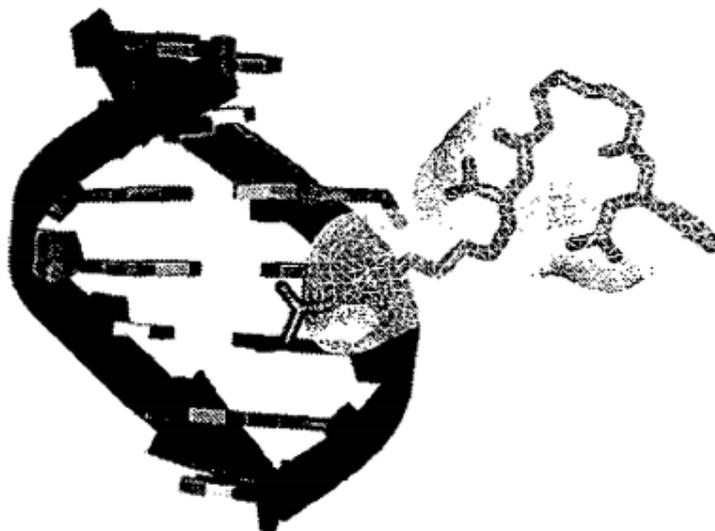


Figura 55C. ADN que muestra a la molécula modelada después de la hidrólisis de los 2 elementos hidrolizables de éter. Todas las modificaciones se muestran en representación de barras y adicionalmente el producto final es resaltado por su superficie.

Todas las figuras son creadas utilizando el visualizador de Accelrys (ilegible) 4.2 con estructuras calculadas utilizando MacroModel 7.2 de Schrodinger

Figura 56

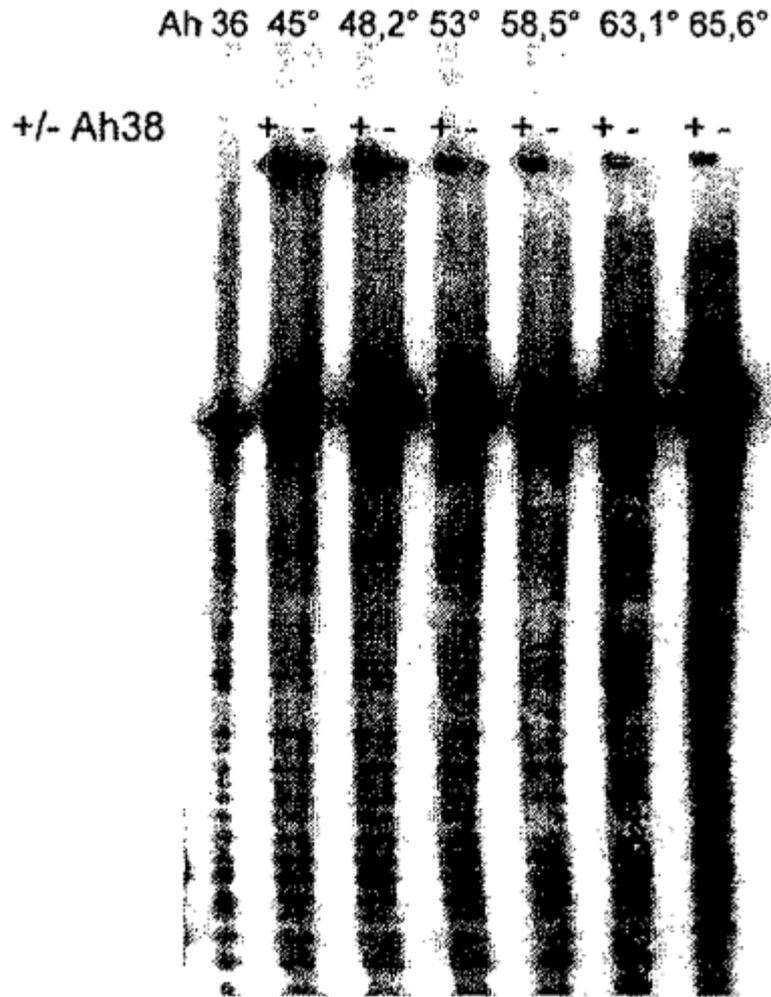


Figura 57A

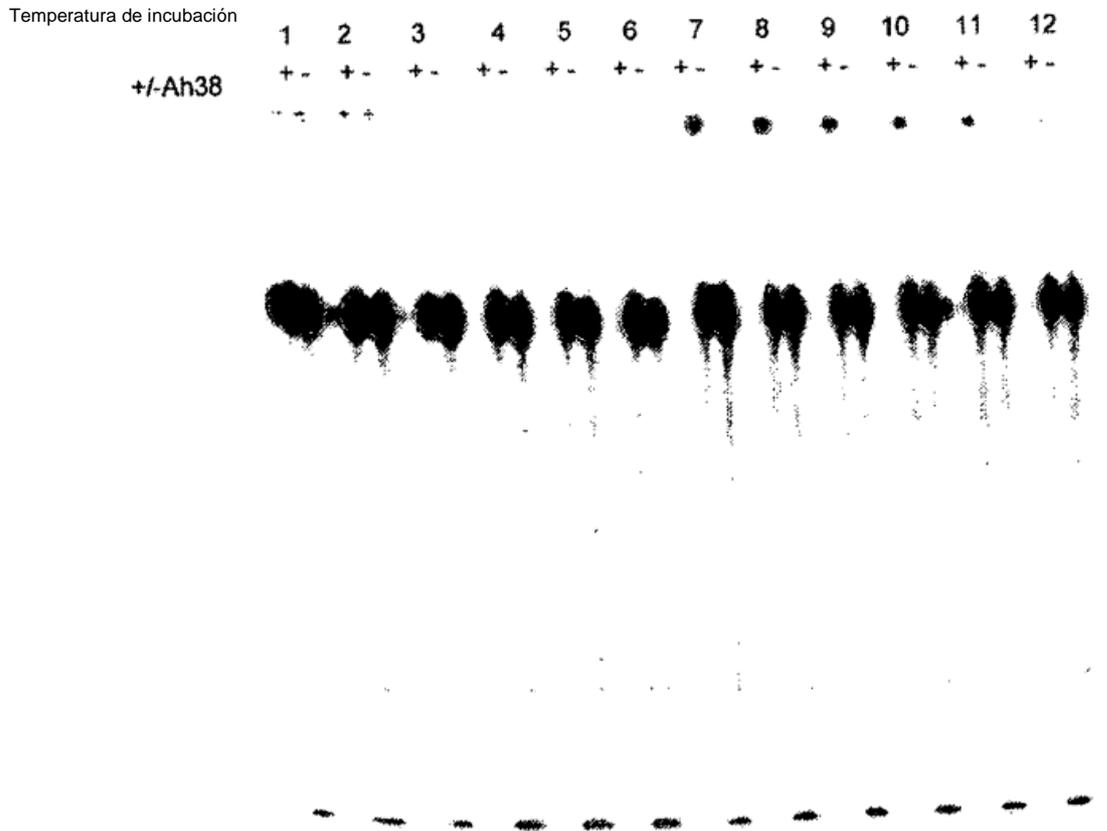








Figura 59

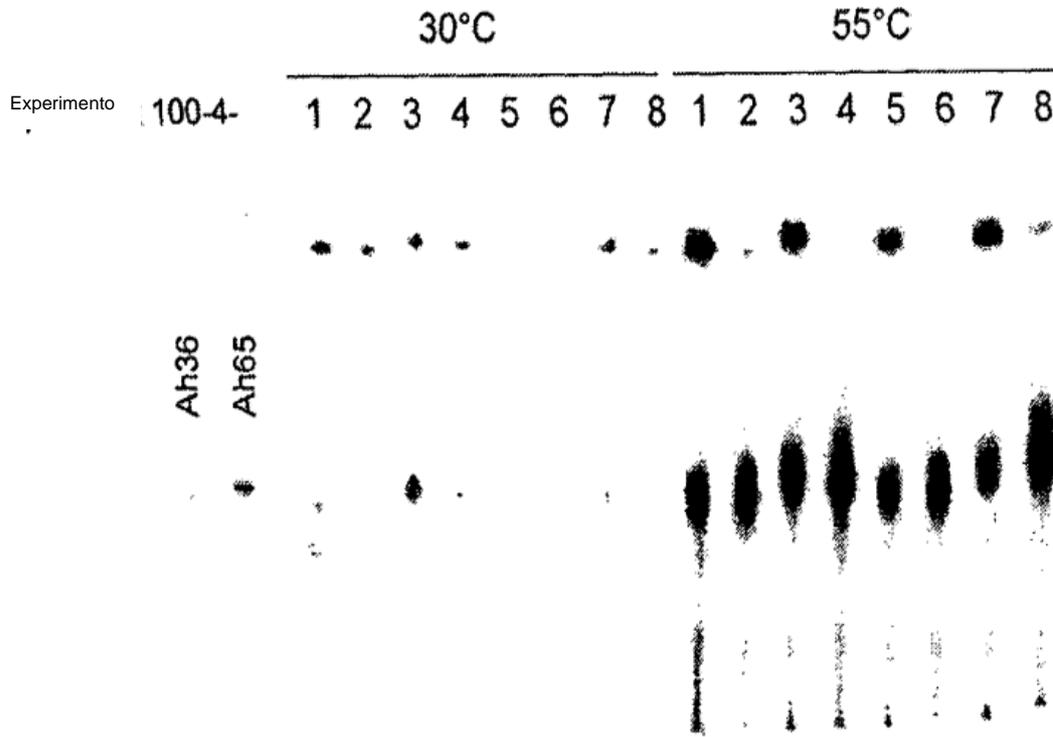


Figura 60



Figura 61

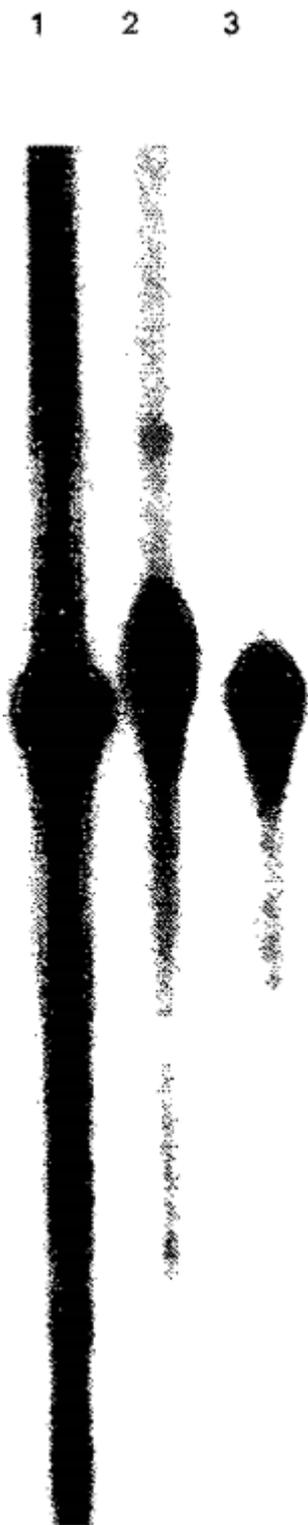


Figura 62

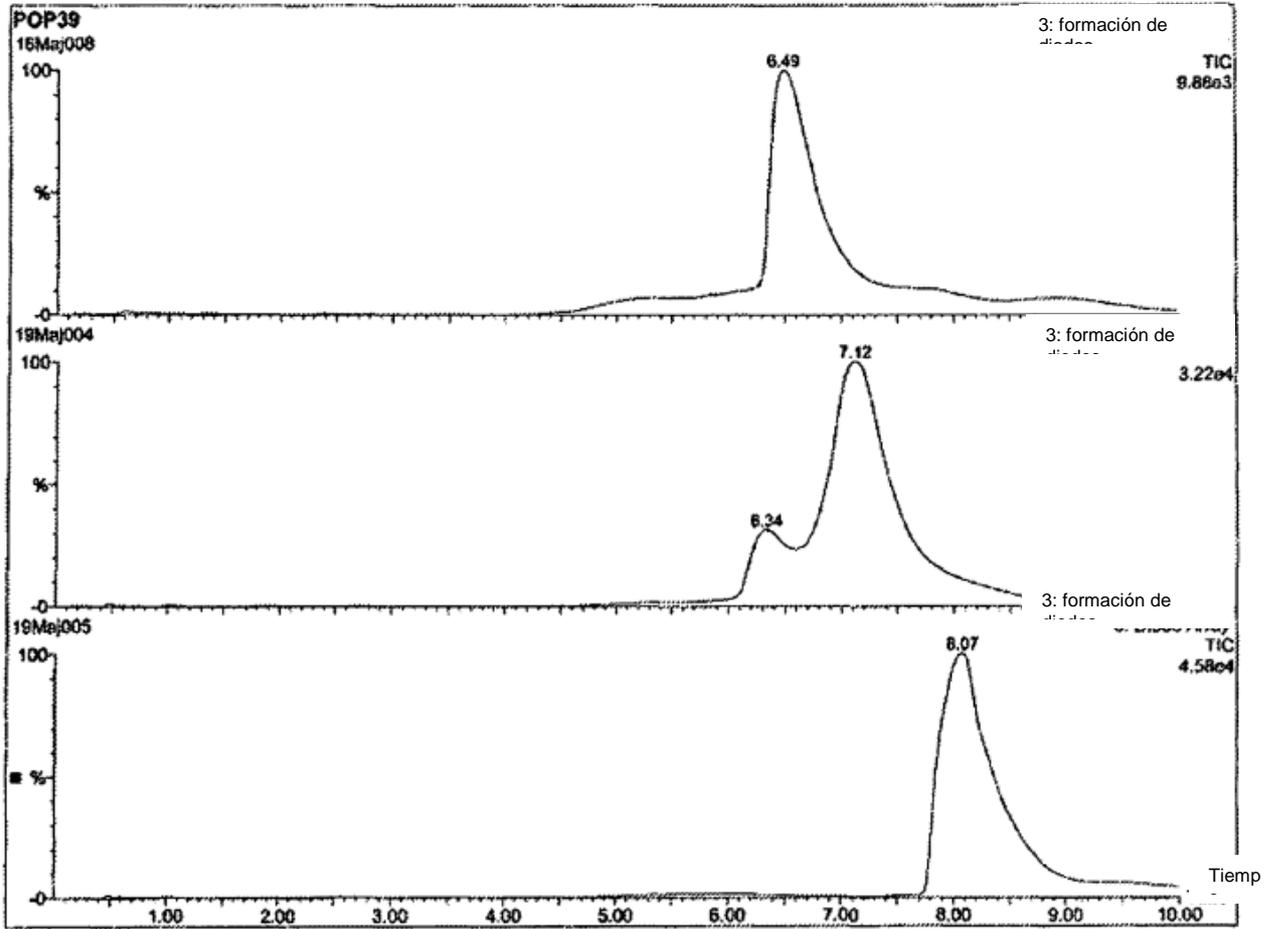


Figura 63

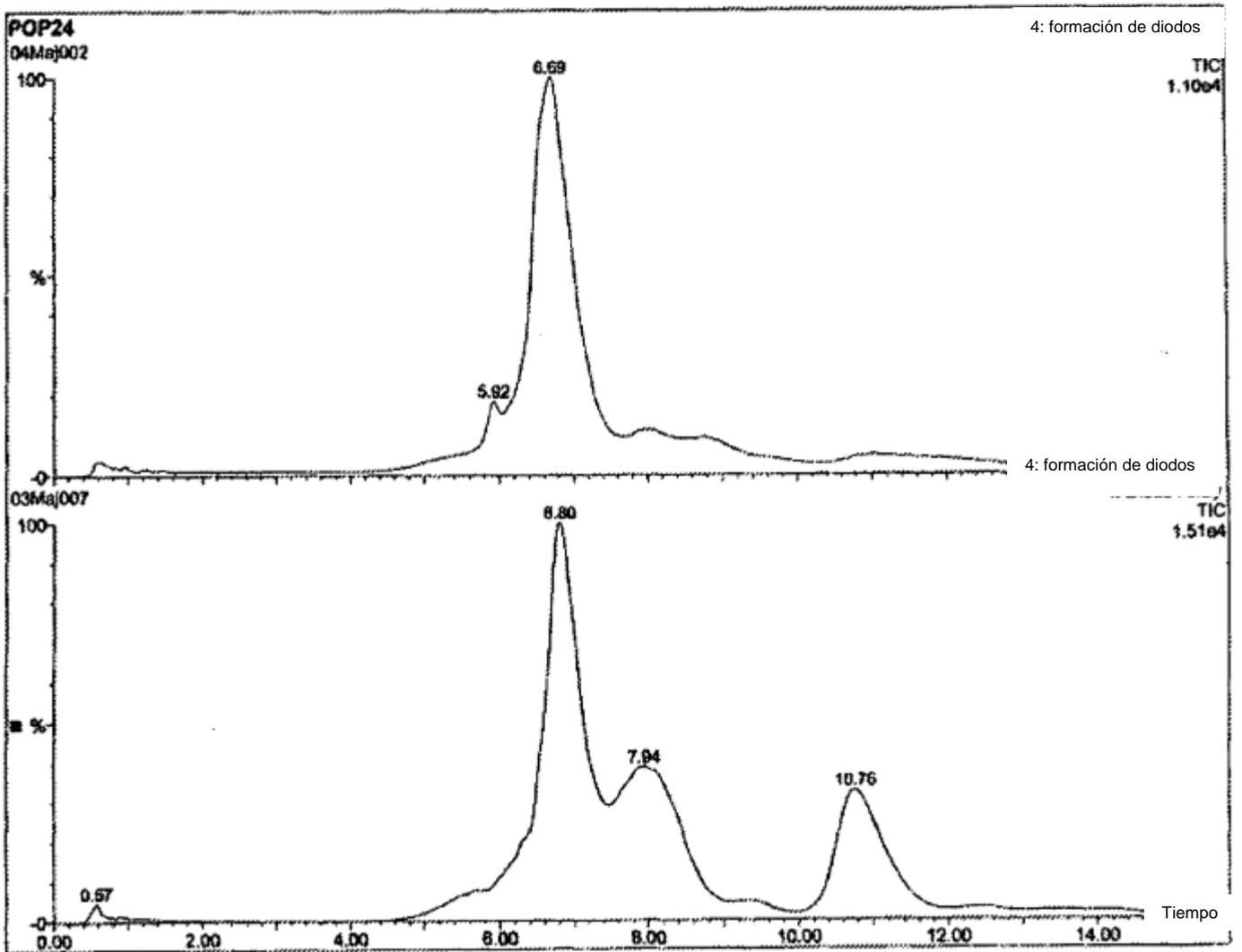


Figura 64

