

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 933**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

**C40B 40/14** (2006.01)

**C40B 40/06** (2006.01)

**C40B 50/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2003 E 08169346 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 2186897**

54 Título: **Método mejorado para sintetizar moléculas modeladas**

30 Prioridad:

**15.03.2002 DK 200200415 15.03.2002 US 364056  
P 20.06.2002 DK 200200952 20.06.2002 US  
175539 20.06.2002 US 389885 P 12.09.2002 US  
409968 P 12.09.2002 DK 200201347  
20.06.2002 WO PCT/DK02/00419**

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;  
HOLTMANN, ANETTE;  
FRANCH, THOMAS;  
GOULIAEV, ALEX HAAHR y  
FELDING, JAKOB**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 571 933 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).

**Método mejorado para sintetizar moléculas modeladas****Descripción****5 Área técnica del invento**

[0001] Este invento se refiere a un método para sintetizar moléculas modeladas. El método implica una alta concentración de grupos reactivos que tienen el propósito de participar en una formación de un enlace, incrementando, por lo tanto, la probabilidad de la formación de enlaces. El invento también se refiere a una biblioteca, que es una pluralidad de moléculas donde cada una de las moléculas modeladas está adherida a la plantilla que dirige su síntesis.

[0002] La generación de moléculas que transportan nuevas propiedades sigue siendo una tarea compleja. Recientemente, una serie de procedimientos han sugerido que deberían permitir una generación y un cribado más eficaz de un mayor número de moléculas. Los enfoques adoptados implican la codificación y/o modelización de moléculas distintas a los biopolímeros naturales como péptidos, ARN y ADN. Estos enfoques permiten al investigador generar y examinar un enorme número de moléculas en poco tiempo. Esto debería conducir a unas mejores moléculas que transporten las propiedades deseadas.

[0003] El dogma central de la biología describe el flujo de información unidireccional desde el ADN al ARN a la proteína. Recientemente, se han desarrollado procedimientos como la presentación en fagos, péptidos sobre plásmidos, la presentación en ribosomas y la fusión de ARNm-proteína, lo que permite la transferencia de información desde el nivel de la proteína/péptido al ARN o ADN. Esto ha permitido que el uso de la evolución molecular se aplique a un enorme número de péptidos que están expuestos a un proceso de enriquecimiento, donde después el grupo enriquecido de moléculas (enriquecido para una característica particular, como la unión a la proteína receptora) se amplifica mediante la explotación del flujo de información desde el péptido al ADN y luego se amplifica el ADN.

[0004] Más recientemente, se han desarrollado los enfoques que permiten la codificación de polipéptidos y otros polímeros bioquímicos. Un ejemplo de este enfoque se desvela en el documento US 5.723.598 que pertenece a la identificación de un polímero bioquímico que participa en una interacción vinculante preseleccionada con una diana para formar un complejo de reacción vinculante. El procedimiento técnico anterior abarca la generación de una biblioteca de moléculas bifuncionales. Una parte de molécula bifuncional es el polímero bioquímico y la otra parte es un oligonucleótido identificador que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica e identifica el polímero bioquímico. Tras la generación de la biblioteca de las moléculas bifuncionales se realiza una separación con respecto a la afinidad hacia una diana y la parte de oligonucleótido identificador de la molécula bifuncional se amplifica por medio de PCR. Eventualmente, los amplicones de PCR se secuencian y se descodifican para la identificación de los polipéptidos bioquímicos. Este enfoque sufre el inconveniente de que es necesario con un laborioso paso de decodificación después de cada ronda de selección.

Por tanto, se modera el flujo de información desde la secuencia del identificador al polímero bioquímico.

[0005] Halpin y Harbury han sugerido en el documento WO 00/23458 una mejora para el enfoque dispuesto justo encima, en el que las moléculas formadas no sólo se identifican, sino que también son dirigidas por la marca de ácido nucleico. El enfoque se basa en la estrategia tradicional de división y mezcla para la síntesis de bibliotecas combinatorias usando dos o más etapas sintéticas. Se usa una pluralidad de moldes de ácido nucleico, cada uno de los cuales tiene en un extremo un sitio reactivo químico y disperso por todo el sitio una pluralidad de regiones de codón, especificando cada una de dichas regiones de codón a su vez codones diferentes. Cada una de las cadenas, identificadas por una región del primer codón, se hace reaccionar, por separado, en los sitios de reacción química con reactivos seleccionados específicos. Posteriormente, todas las cadenas se reúnen y se someten a una segunda separación basada en una región del segundo codón. El procedimiento de división y mezcla se realiza un número de veces apropiado para producir una biblioteca de normalmente entre 103 y 106 compuestos diferentes. Este procedimiento es complicado y solo genera una biblioteca relativamente pequeña.

[0006] Gartner ZJ y Liu DR (J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 6961-6963) presenta un método en el cual el ADN es utilizado para dirigir específicamente a las secuencias de reacciones químicas. Se ha demostrado que el efecto de proximidad suministrado por la síntesis modelada de ADN puede ser utilizada para promover reacciones químicas. Cuando más de una sola entidad química va a participar en la formación de una molécula codificada, es necesario tener un bloque de construcción separado de un lugar reactivo de la plantilla por uno o más codones. Comúnmente, la distancia entre el bloque de construcción y el lugar reactivo de la plantilla totaliza algunos nucleótidos, por ejemplo, 30 nucleótidos, lo que implica que la reacción a la distancia más larga desde el lugar activo de la plantilla es menos promovida en relación a una entidad química ejecutada por un bloque de construcción recosido a un codón adyacente al lugar reactivo.

[0007] Kurz et al. (2001), Chembiochem, vol. 2, no. 9, pp. 666 - 672, presenta un método para la síntesis de fusiones covalentes de ADNCs- proteínas para aplicaciones de presentaciones proteínicas. Una plantilla ramificada de ARNm porta un aceptor de peptidilos y un cebador de transcripción en reversa en el extremo 3'. La interpretación in vitro

seguida de una transcripción reversa produjo a una proteína que está enlazadas covalentemente a su codificación de ADNc.

5 [0008] Gartner et al. (The generality of DNA-templated synthesis as a basis for evolving non-natural small molecules"; Journal of American Chemical Society, Estados Unidos; 18 de julio de 2001, vol. 123, núm. 28, p. 6961-6963) se refiere a la creación de bibliotecas amplificables y evolucionables de pequeñas moléculas no naturales mediante el desarrollo de procedimientos para traducir el ADN en estructuras sintéticas.

10 [0009] WO 01/07657 se refiere a métodos y reactivos para la liberación de un aceptador de péptidos a un ARN, así como, los productos aceptadores de ARN-péptidos.

[0010] WO 02/074929 se refiere a métodos, composiciones y sistemas para sintetizar, seleccionar, amplificar y cambiar a moléculas no naturales que se basan en plantillas de ácidos nucleicos.

15 [0011] Nazarenko et al. (A closed tube format for amplification and detection of DNA based energy transfer; Nucleic Acids Research; Oxford University Press, vol. 25, no. 12, 1 de enero de 1997, p. 2516-2521) se refiere a un método para la detección directa de ADN amplificado por PCR en un sistema cerrado. El procedimiento se basa en la incorporación de cebadores marcados por transferencia de energía en el producto de amplificación.

20 [0012] Summerer et al. (2002), Angewandte Chemie (Int. ed.), vol. 41, no. 1, pp. 89 - 90, se refiere a métodos de síntesis modelada por ADN de secuencias específicas para dirigir a las reacciones químicas.

[0013] Gryaznov y Letsinger (1993), J. Am. Chem. Soc., vol. 115, no. 5, pp. 3808 - 3809, se refiere a una ligación química de oligonucleótidos en la presencia y en la ausencia de una plantilla.

25 [0014] Czapinski et al. (2001), J. Am. Chem. Soc., vol. 123, no. 35, pp. 8618 - 8619, se refiere a métodos para ensamblajes dirigidos por plantillas de ácidos nucleicos.

30 [0015] Matsuura et al. (2001), J. Am. Chem. Soc., vol. 123, no. 2, pp. 357 - 358, se refiere a oligonucleótidos glicosilados a lugares específicos y su auto-organización.

[0016] Visscher et al. (1988), J. Mol. Evol., vol. 28, no. 1/2, pp. 3 - 6, se refiere a la síntesis dirigida por plantillas de análogos de oligonucleótidos acíclicos.

35 [0017] Brenner et al. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América, vol. 89, no. 12, pp. 5381 - 5383, se refiere a métodos para realizar química combinatoria codificada.

[0018] Este invento está dirigido a sugerir una solución para incrementar la concentración local de reactivos para promover la probabilidad de una reacción.

40

### Resumen del invento

[0019] Este invento suministra un método para sintetizar a una molécula modelada que comprende los pasos de:

- 45 a) Suministrar por lo menos una plantilla conformada de uno o más codones,  
 b) Suministrar una primera entidad funcional adherida al dominio de compresión, donde dicho dominio de compresión está conformado de una primera parte de una pareja molecular, siendo capaz de una interacción reversible con una 2ª parte de la pareja molecular,  
 c) Suministrar uno o más bloques de construcción, cada uno conformado de un anti-codón, una entidad funcional adicional y un enlazador que conecta al anti-codón con la entidad funcional, donde el anti-codón complementa a un  
 50 codón de una plantilla, y la entidad funcional está conectada a un dominio de compresión conformado de la 2ª parte de dicha pareja molecular y es capaz de estar conectada únicamente a la primera entidad funcional,  
 d) Contactar a los componentes del paso a), b), y c) entre sí bajo condiciones que permitan una hibridación específica del anti-codón o anti-codones al codón o codones de la plantilla o plantillas y la dimerización de las 2 partes de la pareja molecular.

55

[0020] La plantilla comprende, en una sección importante, 2 o más codones, tal como de 3 a 15 codones. La primera entidad funcional, que, en un aspecto del invento, puede ser un portador, puede conectarse entonces a 2 o más entidades funcionales. El método podría ser realizado una sola vez para conectar a la entidad funcional portadora con el monto deseado de entidades funcionales o los pasos de d) a g) podrían ser repetidos una o más veces para  
 60 agregar secuencialmente bloques de construcción que faciliten que entidades funcionales se adhieran a una entidad funcional o a una molécula modelada naciente.

60

[0021] Cuando se realiza una síntesis de varios pasos, la recepción de los pasos d) al g) es conducida utilizando la molécula modelada adherida a la plantilla que dirigió su síntesis de acuerdo al paso g) en calidad de la primera entidad funcional adherida a un dominio de compresión en el paso de contacto de acuerdo al paso d).

65

[0022] Los dominios compresores podrían caracterizarse como 2 partículas que interactúan que son capaces de dimerizar irreversiblemente en una forma ordenada, conectando, por lo tanto, a los grupos reactivos adheridos a ellas en una proximidad cercana. La reversibilidad es requerida en un aspecto referido para permitir a diferentes entidades funcionales que tengan el mismo dominio de dimerización el interactuar en momentos diferentes, un dominio compresor complementario adherido a un lugar reactivo. Muchos tipos de partículas moleculares podrían ser utilizados como dominios de compresión, de los cuales, a continuación se muestra una lista no comprensiva de parejas apropiadas de dominios compresores: i) ADN/ADN, ADN/ARN, LNA / ADN, PNA/ ARN, varias combinaciones de nucleótidos y análogos de nucleótidos; ii) péptido/péptido, por ejemplo, una base y un compresor de leucina ácida (hélice superenrollada de 2 hélices alfa), anticuerpo/antígeno; iii) ácido nucleico-péptido, por ejemplo, dominio/ADNs que se enlaza al ADN del dedo de Zinck; iv) péptido/molécula orgánica pequeña, por ejemplo, estreptavidina/biotina; v) molécula orgánica pequeña / molécula orgánica pequeña, por ejemplo, ácido nitriloacético (NTA)/ácido nitriloacético (NTA)  $-Zn^{++}$ ; vi) partícula cargada positivamente/partícula cargada negativamente, por ejemplo, ácido poliglútamico/polilisina.

La caja compresora puede ser escogida de acuerdo a las condiciones de reacción que se quiere mejorar. Por ejemplo, si la reacción es realizada a una temperatura moderada y a una concentración razonable de salinidad alta, las cajas compresoras ADN/ADN podrían ser utilizadas. Al variar la longitud de la caja compresora (las hebras complementarias de ADN), una persona podría diseñar cajas compresoras de una estabilidad y una dinámica deseada. Otros tipos de cajas compresoras dependerán bastante del pH. Por ejemplo, la interacción de la fuerza y dinámica de una pareja de glutamato/lisina dependerán del pH, tal como, por ejemplo, el poliglutamato tendrá una alta carga negativa a un pH alto, y no estará cargado para nada con un pH bajo.

[0023] La entidad funcional está, en un aspecto del invento, adherida a la plantilla a través de uno o más enlaces covalentes. Sin embargo, podría ser apropiado que la primera entidad funcional esté conectada a una secuencia de ácidos nucleicos que complementen a una secuencia de ácidos nucleicos albergados por la plantilla para permitir la adherencia de un portador a la plantilla por medio de hibridación. En esta forma, será posible el codificar a varios portadores diferentes por la plantilla. En una sección preferida del invento, la primera entidad funcional es un portador, es decir, una partícula química que ha sido modificada, usualmente al agregarse a grupos funcionales que emanan de uno o más bloques de construcción. El portador podría ser un solo grupo reactivo o una estructura química que comprende a 2 o más grupo reactivos. Usualmente, el portador permanece adherido a la plantilla a través de la síntesis de la molécula modelada.

[0024] Usualmente, cuando el dominio de compresión comprende a ácidos nucleicos, la polaridad del bloque de construcción que alberga a la primera entidad funcional está en reversa en comparación a la polaridad del bloque de construcción que alberga a la entidad funcional adicional, es decir, si la primera entidad funcional está adherida al extremo 5' de un oligonucleótido, la entidad funcional adicional estará adherida preferiblemente al extremo 3' del oligonucleótido de los bloques de construcción, o viceversa. En ciertos aspectos, cuando más de un bloque de construcción individual es incluido en la formación de la molécula modelada, es preferible que el bloque de construcción portador sea recosido a una posición flanqueadora de la plantilla, es decir, que no esté ubicada entre los codones o en el codón de los bloques de construcción.

[0025] El dominio de compresión podría ser ubicado en relación a la primera entidad funcional en una forma que promueve la proximidad de las entidades funcionales. En un aspecto, el dominio compresor está presente en la plantilla. En una configuración, el dominio de compresión está ubicado entre un codón que codifica al oligo portador y los codones que codifican a los bloques de construcción. En otro aspecto del invento, el dominio de compresión es una parte del enlazador del bloque de construcción. Preferiblemente, el dominio de compresión está cerca de la entidad funcional. Aún más preferiblemente, el dominio de compresión está separado de la entidad funcional a una distancia máxima de 2 monómeros de ácidos nucleicos. En una sección más preferida, el dominio de compresión de la entidad funcional del bloque de construcción y primera entidad funcional están distanciados de las entidades respectivas con el mismo número de monómeros de ácidos nucleicos para suministrar una alta concentración local de entidades funcionales. La distancia del dominio de compresión de la entidad funcional del bloque de construcción y de la primera entidad funcional, respectivamente, en relación a las entidades funcionales son preferiblemente de cero monómeros de nucleótidos. En otras palabras, es preferible que las 2 entidades funcionales que tienen el propósito de formar una conexión estén adheridas al nucleótido terminal del dominio de compresión.

[0026] El número deseado de monómeros de ácido nucleico del dominio de compresión depende en gran forma de la temperatura y de las condiciones de exigencia que son utilizadas en general durante la síntesis. Si se prefiere una exigencia baja y/o una temperatura relativamente baja el número de monómeros de ácidos nucleicos podría ser tan bajo como 3. Sin embargo, un número pequeño de monómeros de ácidos nucleicos en la secuencia del dominio de compresión podría incrementar el riesgo de hibridación, por ejemplo, a la plantilla o a los bloques de construcción. Es, por lo tanto, en general, preferible utilizar por lo menos 4 monómeros de ácidos nucleicos. De acuerdo a una sección importante del invento, la secuencia del dominio de compresión comprende a desde 3 a 20 monómeros de ácidos nucleicos. En una sección aún más importante, la secuencia del dominio de compresión comprende a desde 4 a 16 monómeros de ácidos nucleicos. Más preferidos es una secuencia de dominio de compresión que comprende a desde 5 a 10 monómeros de ácidos nucleicos.

[0027] El enlace entre el anti-codón y el un dominio de compresión podría ser un enlace individual o una partícula

química de hasta algunos cientos de A, tal como entre 1 y 300 A. El enlace que puede ser de cualquier naturaleza química adecuada se prefiere, sin embargo, en general, que sea un enlace de un oligonucleótido. En una sección preferida, el enlace es un enlace individual, es decir, el anti-codón topa al dominio de compresión.

5 [0028] En un aspecto preferido del invento, la temperatura de recosido del híbrido codón:anti-codón es más alta que la temperatura de recosido del híbrido del dominio de compresión para asegurar que el bloque de construcción permanezca adherido a la plantilla, aunque la interacción de los dominios de compresión será eliminada. El aspecto que se acaba de mencionar es preferible específicamente cuando se realiza el contacto de acuerdo al paso d) al alternar la temperatura por debajo y por arriba de la temperatura de recosido del dominio de compresión. El efecto de la alternación es incrementado cuando la alternación es realizada múltiples veces. Para evitar la liberación de bloque de construcción de la plantilla, la temperatura más alta es preferiblemente por debajo de la temperatura de recosido del híbrido codón:anti-codón.

10 [0029] De acuerdo a un aspecto preferido del invento, cuando la plantilla comprende 2 o más codones, los bloques de construcción adheridos a estos codones tienen secuencias esencialmente idénticas a las del dominio de compresión. Una alternación de la temperatura atraerá entonces a diferentes entidades funcionales recosidas a través de los bloques de construcción al portador. Por lo tanto, es posible tener una variedad de entidades funcionales que se las acerca a una proximidad cercana con el portador.

15 [0030] La diferencia entre la temperatura de recosido del híbrido codón: anti-codón y los dominios dimerizados de compresión es adecuadamente 10 °C o más. Más preferiblemente, la diferencia entre las temperaturas de recosido es el 25° o más.

20 [0031] En un aspecto del invento, la hibridación de los codones con anti-codones y la dimerización del dominio de compresión ocurre en pasos separados, es decir, las condiciones para permitir una hibridación específica del o de los anti-codones para con el o los codones de la o las plantillas son diferentes a las condiciones que permiten una dimerización óptima de las 2 parejas de la pareja molecular. La separación del paso facilita condiciones óptimas para cada paso. En el segundo paso, el paso de dimerización, se prefiere usar condiciones que aseguren que los codones y los anti-codones permanezcan adheridos y condiciones que favorezcan la reacción entre las entidades funcionales.

25 [0032] Las condiciones durante la hibridación específica del o de los anti-codones incluyen, adecuadamente, una concentración de codones y/o anti-codones, que es más alta que la concentración de codones y/o anti-codones utilizados durante la dimerización de las 2 parejas de la pareja molecular. La diferencia en concentración mejora la probabilidad de que un híbrido codón:anti-codón haya sido formado antes de la reacción de las entidades funcionales, asegurando, por lo tanto, la transferencia de información genética. En una forma adecuada, la concentración durante la hibridación del o de los codones y anti-codones es por lo menos 10 veces más alta en comparación con las concentraciones utilizadas para la dimerización de las 2 parejas del dominio de compresión. Las condiciones diluidas durante la dimerización del dominio de compresión también favorecen a las reacciones dirigidas por plantilla en vez de a las reacciones transversales entre grupos reactivos aleatorios que aparecen en el medio debido un incremento en la concentración local de grupos reactivos codificados en relación a la concentración de grupos reactivos en general en el medio.

30 [0033] En un aspecto del invento, el método es utilizado para generar a una biblioteca de moléculas modeladas adheridas a la plantilla (o, alternamente, una plantilla complementaria) que dirigió la síntesis de la molécula. En forma de ejemplo, una biblioteca puede ser generada al tener más de una posible interacción codón:anti-codón. Esto puede realizarse al tener algunos bloques de construcción con diferentes entidades funcionales, pero con anti-codones similares. Sin embargo, para obtener una relación de uno a uno entre la identidad de la entidad funcional conectada al portador y el codón de la plantilla, usualmente es preferible que cada bloque de construcción porte a un anti-codón específico que identifique a la entidad funcional.

35 [0034] Una biblioteca comprende, preferiblemente, una pluralidad de plantillas con diferentes codones únicos y/u orden único de codones. Usualmente se suministra una pluralidad de bloques de construcción que tienen anti-codones que corresponden a los codones únicos de las plantillas. En un aspecto del invento, un bloque específico de construcción es suministrado para cada uno de los codones únicos. En otro aspecto, algunos de los codones no son emparejados por un bloque de construcción o, alternamente, están bloqueados por una secuencia de oligonucleótidos sin una entidad funcional.

40 [0035] En el siguiente principio, se ilustra para un ejemplo específico no limitante. Los anti-codones en este ejemplo son aproximadamente de 20 nucleótidos de largo (y tienen una temperatura de derretimiento similar a la de su secuencia complementaria de aproximadamente 60 °C), donde el dominio de compresión es de aproximadamente 5 nucleótidos de largo (y tiene una temperatura de derretimiento mucho menor, por ejemplo, alrededor de 17° C). Los bloques de construcción y la pluralidad de plantillas están incubadas juntas, a una temperatura media (por ejemplo, 55 °C), permitiendo a los anti-codones encontrar y enlazarse a los codones correspondientes. A esta temperatura, los anti-codones interactúan eficientemente y específicamente con los codones, mientras que las cajas de compresión no interactúan eficientemente. Un exceso de bloques de construcción no enlazados son lavados y

separados. Entonces las reacciones entre los grupos reactivos de las entidades funcionales cercanas son iniciadas para reducir la temperatura, por ejemplo, 10 °C, y potencialmente cambiar otras condiciones adicionales a la temperatura. A 10 °C los dominios de compresión de los bloques regulares de construcción interactuarán con la secuencia complementaria del dominio de compresión de la entidad funcional portadora, acercando, de esa forma, a los grupos reactivos a una proximidad muy cercana (refiérase a la figura 14). Esto incrementa significativamente la concentración local de los grupos reactivos, y como resultado, los grupos reactivos reaccionan. Entonces, nuevamente, la temperatura es incrementada a la temperatura media (55 °C) y la caja de compresión es derretida resultando en una separación de las entidades funcionales. Cuando la temperatura es reducida, subsiguientemente, a alrededor de 10 °C, otro bloque de construcción podría hibridar su dominio compresor al dominio compresor del portador, haciendo posible que su entidad funcional pueda reaccionar con el portador.

### **Dominios de compresión**

[0036] La caja de compresión es una pareja de afinidad molecular compuesta de 2 partes que tienen una afinidad entre sí bajo ciertas condiciones ambientales. La propiedad esencial de la pareja de afinidad molecular es que las 2 partes son capaces de interactuar para armar a la pareja de afinidad molecular. En el campo biotecnológico una variedad de partes moleculares que interactúan son conocidas las cuales pueden ser utilizadas como la pareja de afinidad molecular. Ejemplos incluyen, pero no se restringen a interacciones proteína-proteína, interacciones proteína-polisacárido, interacciones ARN-proteína, interacciones ADN-ADN, interacciones ADN-ARN, interacciones ARN-ARN, interacciones biotina-streptavidina, interacciones enzima-ligando, interacciones anticuerpo-ligando, interacciones proteína-ligando, etcétera.

[0037] La interacción entre las partes de la afinidad molecular podrían resultar en un enlace fuerte o débil. Un enlace covalente es formado entre las partes de la pareja de afinidad. El enlace entre las partes puede ser visto como fuerte, mientras que el establecimiento de enlaces de hidrógeno, las interacciones entre los dominios hidrofóbicos, y la quelación metálica, en general, resultan en enlaces débiles. En general, enlaces relativamente débiles son preferidos. En un aspecto preferido del invento, la primera parte de la pareja de afinidad es capaz de interactuar irreversiblemente con la 2ª parte de la pareja de afinidad para suministrar una adherencia o una separación de las partes de acuerdo a las condiciones cambiantes del medio.

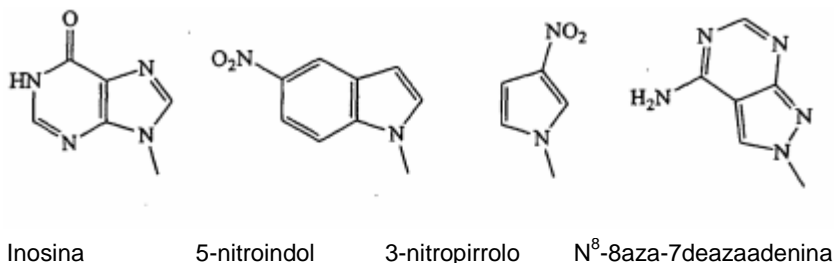
[0038] En un aspecto preferido del invento, la pareja de afinidad molecular se basa en una interacción entre nucleótidos, es decir, la primera parte de la pareja de afinidad es una secuencia de nucleótidos y la 2ª parte de la pareja de afinidad es una secuencia de nucleótidos capaz de hibridarse a la primera parte de la pareja de afinidad. La primera parte de la pareja de afinidad podría ser una parte de la plantilla o un bloque de construcción y podría comprender a un oligonucleótido que tiene bases nitrogenadas seleccionadas de las bases nitrogenadas que ocurren naturalmente, es decir, adenina, citosina, guanina, timina y uracilo que están adheridas a una estructura, tal como una secuencia repetitiva de unidades de (deoxi)ribosa-fosfato. La 2ª parte de la pareja de afinidad puede ser un oligonucleótido que tiene bases nitrogenadas que complementan y que son reconocidas específicamente por la primera parte, es decir, en el caso de que la primera parte contenga citosina, la 2ª parte contiene guanina y viceversa, y en el caso de que la primera parte contenga timina o uracilo, la 2ª parte contiene adenina. En un aspecto del invento, es preferido, sin embargo, que por lo menos algunas de las bases nitrogenadas de la 2ª parte de la pareja de afinidad sean bases nitrogenadas de bases que se emparejan en una forma no específica. Bases nitrogenadas con bases que se emparejan en una forma no específica son bases que, cuando se adhieren a una estructura, son capaces de emparejarse con por lo menos de 2 a 5 bases nitrogenadas que ocurren naturalmente las cuales ya fueron mencionadas. Preferiblemente, el emparejamiento de bases es de entre 2 o más bases nitrogenadas naturales y las bases nitrogenadas con bases que se emparejan no específicamente ocurren esencialmente iso-energicamente, es decir, los enlaces formados tienen una fuerza similar. El término "bases nitrogenadas con bases que se emparejan no específicamente" es utilizado en este documento intercambiabilmente con el término "base universal".

[0039] En ARNs naturales, se encuentra la inosina de la base nitrogenada. La inosina tiene la capacidad de hibridarse en una forma no específica con 3 de las bases nitrogenadas, es decir, citosina, timina y adenina. Otros compuestos sintéticos que tienen la misma capacidad de emparejarse a las bases en una forma no específica con bases nitrogenadas naturales han sido formados e incluyen, entre otras, a los compuestos que se muestran a continuación.

### **Ejemplos de bases universales:**

5

[0040]



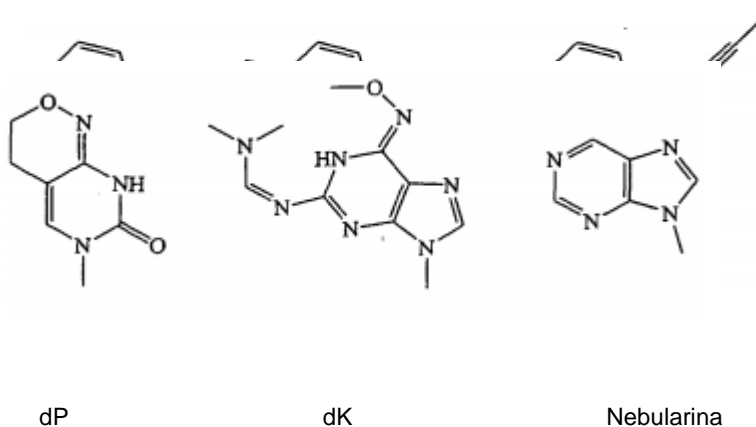
10

15

20

25

30



35 Plantilla

[0041] Los codones de la plantilla pueden ser cualquier entidad bioquímica con una capacidad para ser reconocida específicamente por otra entidad. Es preferido, sin embargo, que el codón sea una secuencia de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos porta una serie de bases nitrogenadas en una estructura. Las bases nitrogenadas de los codones podrían ser cualquier entidad química capaz de ser reconocida específicamente por una entidad complementaria. Las bases nitrogenadas son usualmente seleccionadas de bases nitrogenadas naturales (adenina, guanina, uracilo, timina y citosina) pero también las otras bases nitrogenadas que obedecen a las reglas de enlaces de hidrógeno de Watson-Crick también podría ser utilizadas, tal como las bases nitrogenadas sintéticas presentadas en US 6,037,120.

[0042] El codón podría ser un solo nucleótido en la generación de una biblioteca. Esto permitirá la incorporación de 4 entidades funcionales diferentes en la molécula dirigida por la plantilla. Sin embargo, para obtener una diversidad más grande, un codón comprende, preferiblemente, a por lo menos a 2 y más preferiblemente por lo menos 3 nucleótidos. Teóricamente, esto suministrará a 4<sup>2</sup> y 4<sup>3</sup>, entidades funcionales diferentes, respectivamente. Los codones usualmente no comprenderán más de 100 nucleótidos. Es preferido tener codones con una secuencia de 3 a 30 nucleótidos.

[0043] Los por lo menos 2 codones de la plantilla son organizados en la secuencia, es decir, uno a lado del otro y podrían ser separados por un grupo separador. Dependiendo de la molécula dirigida por plantilla que se intenta formar, la plantilla podría comprender a codones adicionales. Cada uno de los codones adicionales podría ser separado por un grupo separador adecuado. Preferiblemente, todos o por lo menos la mayoría de codones de la plantilla están organizados en secuencia y cada uno de los codones está separado de un codón cercano por un grupo separador. Generalmente, se prefiere tener más de 2 codones en la plantilla para permitir la síntesis de moléculas dirigidas por plantillas más complejas. En un aspecto preferido del invento, el número de codones de la plantilla es desde 2 a 100. Aún más preferido es que la plantilla comprenda entre 3 a 15 codones.

[0044] La secuencia separadora podría servir para varios propósitos. En una configuración del invento, el grupo separador identifica a la posición de un codón. Usualmente, el grupo separador ya sea corriente arriba o corriente abajo del codón comprende a información que permite la determinación de la posición del codón. El grupo separador también podría suministrar a una región para una afinidad alta. La región de alta afinidad asegurará que la hibridación de la plantilla con el anti-codón ocurra en el marco. Además, la secuencia separadora ajusta a la

temperatura de recosido a un nivel deseado.

[0045] Una secuencia separadora con una alta afinidad puede ser suministrada por medio de la incorporación de una o más bases nitrogenadas que forman a 3 enlaces de hidrógeno para una base nitrogenada cognada. Un ejemplo de una base nitrogenada que tiene esta propiedad es la guanina. Alternamente, o adicionalmente, la secuencia separadora podría ser sujeta a una modificación estructural. Algunas modificaciones estructurales suministran una afinidad más alta, tal como una sustitución de 2'-O-metilo de la partícula ribosa, de los ácidos nucleicos de péptidos (PNA - peptide nucleic acids), y la ciclación del O- metileno de 4' de la partícula ribosa, también referida como LNA (Ácido Nucleico Bloqueado - (Locked Nucleic Acid).

La plantilla podría comprender a regiones flanqueadoras. Una de las regiones flanqueadoras puede, en un aspecto del invento, servir para inmovilizar la plantilla a una superficie de un soporte sólido tal como una micro matrices. En otro aspecto del invento, la región flanqueadora puede abarcar a un grupo de señales, tal como un fluoróforo o un grupo reactivo, para permitir a una detección directa de la presencia de la plantilla. Las regiones flanqueadoras también pueden servir como lugares de cebado para una reacción de amplificación, tal como la PCR.

[0046] La plantilla también puede ser inmovilizada en un soporte sólido, tal como una micro esfera o un material matricial al incorporar a un grupo de biotinas en la plantilla y un acoplamiento subsiguiente a un soporte sólido cubierto con estreptavidina. Otros métodos de inmovilización son conocidos para una persona con conocimiento en la industria, incluyendo el acoplamiento de la plantilla aún anticuerpo y la inmovilización de la conjugación a un soporte sólido cubierto con el antígeno apropiado. En un aspecto preferido, el lugar de cebado de la plantilla apoya al propósito doble de participar en una reacción de amplificación y como un medio de inmovilización. La inmovilización puede ser efectuada, por ejemplo, por medio del tratamiento de la plantilla que comprende al lugar de cebado con un soporte sólido comprendido de secuencias de oligonucleótidos que son complementarias para el lugar de cebado.

[0047] En un aspecto, la primera entidad funcional está adherida covalentemente a la plantilla. La adherencia covalente del grupo reactivo usualmente significa que la molécula dirigida por la plantilla es formada en, o cerca de, dicho grupo reactivo. La molécula final dirigida por la plantilla es, por lo tanto, adherida en una forma covalente a la plantilla que dirigió y codificó la síntesis mencionada. En el caso de que se forme una biblioteca que comprende a una pluralidad de complejos preparados de acuerdo con el invento, condiciones de alta exigencia para un procedimiento de selección podrían ser utilizados sin el riesgo de separar de la plantilla a la molécula dirigida por la plantilla.

[0048] En otro aspecto del invento, la primera entidad funcional es adherida en una forma que no es covalente a la plantilla. Usualmente, la adherencia no covalente involucra a enlaces de hidrógeno y a la interacción hidrofóbica. Notablemente, la adherencia no covalente involucra la reacción de hibridación entre oligonucleótidos o una de sus partes. En una sección preferida, la entidad funcional está adherida a una secuencia de nucleótidos, que complementa una secuencia de nucleótidos de la plantilla. La secuencia complementaria que tiene adherido al grupo reactivo puede servir como un ancla, es decir, una atadura de la plantilla a la molécula naciente dirigida por la plantilla. Usualmente, la secuencia complementaria del ancla tiene una temperatura de recosido más alta que cada uno de los bloques de construcción para asegurar la adherencia al ancla, incluso bajo condiciones que separan a los bloques de construcción.

[0049] La primera entidad funcional, tal como un portador, podría estar enlazado a una plantilla a través de un enlazador selectivamente separable, que permite la separación de la molécula dirigida por la plantilla de la plantilla en el momento que se decida hacerlo por la persona que está haciendo el experimento. La primera entidad funcional comprende, generalmente, a un grupo reactivo. El grupo reactivo puede ser parte de una molécula naciente dirigida por la plantilla que, posiblemente en una forma modificada, aparece en el final de la molécula modelada. El grupo reactivo también puede ser parte de un portador, tal como una entidad molecular que comprende a más de un grupo reactivo. Además, el grupo reactivo puede estar en una forma que tiene que ser activada antes de que se puede iniciar el método del invento.

[0050] En el aspecto del invento que se relaciona a la generación de la biblioteca, podría ser deseado el acoplar a la primera entidad funcional a un anti-codón complementando a un codón (adicional) en la plantilla, haciendo, de esa forma, que sea posible tener más de una sola clase de entidades funcionales presentes en el medio. Alternamente, una entidad funcional o un portador conformado de los grupos reactivos podría variar.

[0051] Cuando la plantilla es lineal, la primera parte de la pareja de afinidad molecular está usualmente ubicada entre el codón activo y una entidad funcional o una molécula modelada naciente conectada covalentemente o por medio de hibridación a la plantilla para suministrar una proximidad más cercana entre los grupos reactivos. Más preferiblemente, la primera parte de la pareja de afinidad molecular está ubicada cerca del grupo reactivo de la plantilla.

[0052] la 2ª parte de la pareja de afinidad molecular está ubicada en el bloque de construcción. La 2ª parte de la pareja de afinidad molecular podría estar incluida en el caso de que el codón al cual el bloque de construcción está



adherido esté cerca del grupo reactivo de la plantilla, o expresado de otra forma, el anti-codón del bloque de construcción podría ser, por lo menos en parte, idéntico a la 2ª parte de la pareja de afinidad molecular. Los bloques de construcción que tienen anti-codones que tienen el propósito de interactuar con codones lejanos del grupo reactivo de la plantilla, tal como un portador, comprende a una sección del enlazador de la 2ª parte de la pareja de afinidad molecular. El término "lejanos" se debe entender como el caso en el cual el codón activo, es decir, el codón hibridado al anti-codón del bloque de construcción, está separado en relación al grupo reactivo de la plantilla con uno o más codones inactivos.

[0053] La 2ª parte de la pareja de afinidad molecular en el enlazador del bloque de construcción está ubicada preferiblemente cerca de la entidad funcional para incrementar la proximidad entre el grupo reactivo del bloque de construcción y el grupo reactivo de la plantilla. Más preferiblemente, la 2ª parte de la pareja de afinidad molecular está separada del nucleótido que porta a la entidad funcional por cero o 2 nucleótidos.

#### Condiciones de hibridación

[0054] Está dentro de la capacidad de una persona con conocimiento en la industria el construir el diseño deseado de un oligonucleótido. Cuando una temperatura específica de recosido es deseada, es un procedimiento estándar el sugerir las composiciones apropiadas de los monómeros de ácidos nucleicos y su longitud. La construcción de un diseño apropiado podría tener la asistencia de softwares, tales como Vector NTI Suite o la base de datos pública en la dirección de Internet <http://www.nwfsc.noaa.gov/protocols/oligoTMcalc.html>.

[0055] Las condiciones que permiten una hibridación específica de los codones y de los anti-codones están influenciadas por varios factores incluyendo la temperatura, la concentración salina, el tipo de amortiguador, y la acidez. Está entre las capacidades de la persona con conocimiento en la industria el seleccionar condiciones apropiadas para asegurar que el contacto entre las plantillas y los bloques de construcción sea realizado en condiciones de hibridación. La temperatura a la cual 2 oligonucleótidos de una sola hebra forman un dúplex es referido como la temperatura de recosido o la temperatura de derretimiento. La curva de derretimiento usualmente no es aguda indicando que el recosido ocurre en un rango de temperaturas. La 2ª derivación de la curva de derretimiento es utilizada aquí para indicar la temperatura de derretimiento.

#### Entidad funcional

[0056] La entidad funcional del bloque de construcción sirve el propósito de ser un precursor de la entidad estructural que se incorpora eventualmente en la molécula modelada. Por lo tanto, cuando en esta aplicación de las reivindicaciones declara que una entidad funcional es transferida a una molécula naciente dirigida por la plantilla debe entenderse que no necesariamente todos los átomos de la entidad funcional original se encuentran en la molécula dirigida por la plantilla que se formara eventualmente. Además, como consecuencia de las reacciones involucradas en la conexión, la estructura de la entidad funcional puede cambiar cuando aparece en la molécula modelada naciente. Específicamente, la separación que resulta en la liberación de la entidad funcional podría generar a un grupo reactivo que en un paso subsiguiente puede participar en la formación de una conexión entre la molécula modelada naciente y una entidad funcional.

[0057] La entidad funcional del bloque de construcción comprende a por lo menos un grupo reactivo capaz de participar en una reacción que resulta en una conexión entre la entidad funcional del bloque de construcción y la parte de la plantilla o el elemento complementario hibridado a la plantilla que porta al grupo reactivo de la plantilla. La conexión es ayudada por uno o más grupos reactivos de la entidad funcional. El número de grupos reactivos que aparecen en la entidad funcional es adecuadamente del 1 al 10. Un bloque de construcción que presenta solamente a un grupo reactivo es utilizado adicionalmente en las posiciones de los extremos de los polímeros, donde los bloques de construcción tienen 2 grupos reactivos que son adecuados para la formación de la parte corporal de un polímero o portadores capaces de tener más reacciones. 2 o más grupos reactivos que tienen el propósito de la formación de conexiones, están presentes comúnmente en portadores. Un portador podría hacer una estructura esencial, que forma a la base para la creación de múltiples variaciones. Las formas de variaciones del portador son formadas comúnmente a través de la reacción de grupos reactivos del portador con grupos reactivos de otros bloques de construcción, mediados, opcionalmente, por grupos de relleno o catalizadores, bajo la creación de una conexión entre las entidades. Las entidades funcionales que van a ser conectadas al portador podían contener 1, 2 o algunos grupos reactivos capaces de formar conexiones.

[0058] El grupo reactivo del bloque de construcción puede ser capaz de formar una conexión directa a un grupo reactivo de otro bloque de construcción, molécula modelada naciente o un lugar reactivo de la plantilla. En ciertas secciones del invento una conexión indirecta es formada utilizando un grupo de relleno de conexión. Se debe entender que no todos los átomos de una entidad funcional necesariamente serán mantenidos en la molécula modelada (naciente) formada. En vez de eso, las entidades funcionales son vistas como precursores de la estructura de la molécula modelada final.

[0059] La separación opcional de acuerdo al paso f) puede ser realizada en una forma apropiada. En un aspecto del invento, la separación involucra el uso de un reactivo y/o de una enzima. La separación resulta en una transferencia

de la entidad funcional adicional a la molécula dirigida por la plantilla naciente o en una transferencia de la molécula dirigida por la plantilla naciente a la entidad funcional del bloque de construcción. En algunos casos, podría ser ventajoso el introducir a nuevos grupos químicos como una consecuencia de la separación del enlazador. Los nuevos grupos químicos pueden ser utilizados para reacciones adicionales en un ciclo subsiguiente, ya sea directamente o después de haber sido activados. En otros casos, es deseable que ningún vestigio del enlazador exista después de la separación.

[0060] En otro aspecto, la conexión y la separación es realizada como una reacción simultánea, es decir, ya sea que la entidad funcional del bloque de construcción o la molécula naciente dirigida por la plantilla sean un grupo que abandona de la reacción. En general, se prefiere diseñar a un sistema para que la conexión y la separación ocurran simultáneamente puesto que esto reduce el número de pasos y la complejidad. La conexión y separación simultáneas también pueden ser diseñadas para que no aparezca ningún vestigio del enlazador o para que un grupo químico nuevo para más reacciones sea introducido, tal como se describió anteriormente.

[0061] Es importante para el método, de acuerdo al invento, que por lo -1 enlazador permanezca intacto después del paso de separación. Él por lo menos un enlazador vinculará a la molécula naciente dirigida por la plantilla con la plantilla que dirigió su síntesis. En el caso de que el método involucre esencialmente la transferencia de entidades funcionales con un portador o con un polímero cambiante, la molécula que eventualmente será portada o el polímero podrían ser adheridos con un enlazador selectivamente separable. El enlazador selectivamente separable es diseñado para que no sea separable bajo condiciones que resultan en la transferencia de la entidad funcional a la molécula naciente dirigida por la plantilla.

#### Bloque de construcción

[0062] Los bloques de construcción utilizados en el método de acuerdo a este invento podrían ser diseñados de acuerdo a las entidades particulares involucradas en el bloque de construcción. Por ejemplo, el anti-codón podría estar adherido a la 2ª parte de la pareja de afinidad molecular con un enlazador de polietilenglicol (PEG) y la entidad funcional podría estar adherido directamente a la 2ª parte de la pareja de afinidad molecular. En otro ejemplo preferido, el anti-codón, el enlazador y la 2ª parte de la pareja de afinidad molecular es un oligonucleótido lineal contiguo.

[0063] La adherencia de la entidad funcional al enlazador es preferiblemente en un nucleótido terminal o un nucleótido o 2 nucleótidos abajo del oligonucleótido. La adherencia de la entidad funcional puede ser en cualquier entidad disponible para la adherencia, es decir, la entidad funcional puede estar adherida a un nucleótido del oligonucleótido en la base nitrogenada, o en la estructura. En general, es preferible adherir a la entidad funcional al fósforo de la vinculación internucleosídica o en la base nitrogenada.

[0064] En un aspecto del invento, un grupo reactivo de la entidad funcional es adherido al oligonucleótido enlazador. El grupo reactivo es, preferiblemente, de un tipo que es capaz de crear una conexión con la molécula naciente dirigida por la plantilla por medio de una reacción directa entre los respectivos grupos reactivos o mediante el uso de un grupo adecuado de relleno. El grupo reactivo que acopla a la entidad funcional con el enlazador es, preferiblemente, separado simultáneamente con el establecimiento de la conexión. La entidad funcional podría, en algunos casos, contener a un segundo grupo reactivo capaz de involucrarse en la formación de una conexión en un ciclo subsiguiente. El segundo grupo reactivo podría ser de un tipo que necesita una activación antes de ser capaz de participar en la formación de una conexión.

[0065] El enlazador de oligonucleótidos podría estar distanciado de la entidad funcional por medio de una partícula separadora. El separador podría estar diseñado para que el espacio conformacional que ha sido tomado de muestra por el grupo reactivo sea optimizado para una reacción con un grupo reactivo de una molécula naciente dirigida por la plantilla.

[0066] El diseño de bloques de construcción que comprende al anti-codón podría estar dirigido a obtener temperaturas de recosido en un rango específico para todos o para parte de los híbridos bloque de construcción: plantilla para asegurar que los anti-codones han sido recosidos a la plantilla antes de que las entidades funcionales estén conectadas entre sí a través de una reacción química. Cuando los bloques de construcción se recosen a la plantilla con, esencialmente, la misma afinidad, es necesario agregar a los bloques de construcción en cada ciclo, es decir, contactar a los bloques de construcción con la plantilla involucra una adición separada de los bloques de construcción individuales.

[0067] En un aspecto del invento, los bloques de construcción son diseñados para que el bloque de construcción cuando se agrega a la plantilla del primer ciclo tenga una temperatura de recosido menor que los subsiguientes bloques de construcción. Al usar una temperatura para el paso de conexión en un segundo paso o paso subsiguiente que es mayor que el previo paso, es posible tener únicamente a los bloques de construcción deseados recosidos a la plantilla, mientras que la mayoría de bloques de construcción que han sido usados previamente o que no han reaccionado estarán separados por su cuenta opcionalmente, un paso de recuperación podría ser utilizado entre cada ciclo para enriquecer el número de plantillas que se encuentran solas por su cuenta disponibles para

recosido a un subsiguiente bloque de construcción. El paso de recuperación podría involucrar la incorporación de biotina en el oligonucleótido del bloque de construcción y la separación de los bloques de construcción de la plantilla utilizando microesferas cubiertas con estreptavidina a una temperatura por sobre la temperatura de recosido, tal como se describe en otras secciones de este documento.

5 [0068] Después del paso de separación, las partes de la pareja de afinidad molecular son separadas para permitir que un bloque subsiguiente de construcción interactúe con la primera parte del dominio de compresión. Opcionalmente, el paso de separación podría ser realizado después de la separación de la pareja de afinidad molecular. En caso de que la pareja de afinidad molecular sea un oligonucleótido doblemente atado, las partes de la  
10 pareja de afinidad podrían ser separadas al incrementar la exigencia, por ejemplo, al incrementar la temperatura. Alternamente, la 2ª parte de la pareja de afinidad portada por el bloque de construcción, puede ser degradada enzimáticamente o químicamente tal como se presenta más adelante.

15 [0069] Después de la reacción de un bloque de construcción, por ejemplo, por una transferencia de una entidad funcional a un portador, el anti-codón podría permanecer recosido a la plantilla durante un ciclo subsiguiente. Sin embargo, es generalmente preferido remover el anti-codón de un bloque de construcción que ha reaccionado sin albergar a la molécula naciente dirigida por la plantilla que proviene de la plantilla antes de la repetición de los pasos  
20 d) al g). La ausencia del anti-codón recosido hace posible incorporar a las bases universales en el enlazador para obtener una afinidad entre el enlazador y los codones inactivos que han sido utilizados previamente.

25 [0070] El anti-codón puede ser removido utilizando varias técnicas, tales como la separación de la plantilla al incrementar la exigencia, comúnmente al elevar la temperatura; una digestión enzimática parcial o completa; o una degradación química. El método que utiliza un incremento en la exigencia es el más simple de aplicar. Sin embargo, en el evento de que un recosido pudiese ocurrir o se desee una remoción selectiva del anti-codón, podría contemplarse utilizar métodos enzimáticos o químicos o una mezcla de estos.

30 [0071] Un método para la remoción de bloques de construcción gastados, bloques de construcción que no reaccionaron y excesos de bloques de construcción involucra la incorporación de biotina o una molécula pequeña similar y la extracción de dichos bloques de construcción utilizando la adherencia entre la biotina y la avidina o la estreptavidina en microesferas cubiertas. Más específicamente, la biotina es incorporada en el bloque de construcción durante su síntesis. Después de la transferencia o alternamente después del paso de separación del  
35 invento, la mezcla es tratada con microesferas cubiertas con estreptavidina bajo condiciones que permiten el acoplamiento de la estreptavidina a la biotina. Subsiguientemente, la temperatura es elevada por sobre la temperatura de recosido del híbrido bloque de construcción:plantilla y la mezcla es sujeta a una gravedad incrementada, por ejemplo, por medio de una centrifugación. El sobrenadante comprenderá entonces a la plantilla liberada de los bloques de construcción. Una alternativa al acoplamiento biotina-estreptavidina es la formación de una conexión S-S. Por ejemplo, el oligonucleótido que comprende al anti-codón se le suministra un grupo -SH, tal como un producto reducido del modificador de tioles C6 S-S (Glen Research# 10-1936-90). El grupo -SH de bloque  
40 de construcción puede ser acoplado a otro grupo -SH en un soporte sólido bajo condiciones de oxidación y el bloque de construcción puede ser removido junto con el soporte sólido por medio de centrifugación si el material sólido es una micro esfera o por medio de elución si el soporte sólido es una matriz de fase sólida de una columna.

45 [0072] Para algunas aplicaciones podría ser ventajoso el degradar selectivamente al oligonucleótido que contiene al anti-codón. Algunos métodos están disponibles para la degradación de la parte de ARN del dúplex ADN:ARN. Asimismo, la plantilla puede ser suministrada en forma de un oligonucleótido individual y el anti-codón puede ser una sola hebra de ARN cognada. El dúplex ADN:ARN puede ser degradado entonces con una enzima seleccionada de ARNasa H, ARNasa A, ARNasa 1. Alternamente, la parte de ARN del dúplex ARN: ADN puede ser degradada químicamente por medio de un tratamiento bajo condiciones alcalinas débiles (pH 9-10) o con Pb(Ac)2 acuoso.

50 [0073] Si el enlazador internucleosídico comprende a un tiofosfato, el enlazador puede ser separado con yodo. Por lo tanto, de acuerdo a este método, una plantilla de oligonucleótidos, tal como una plantilla de ADN o de ARN que se ha irrigado a un anti-codón de ADN o de ARN que comprende a un tiofosfato en el enlazador internucleosídico puede ser tratado con yodo o yodo etanol acuoso para separar al anti-codón.

55 [0074] De acuerdo a otro método, una hebra puede ser separada en un dúplex si un monómero de ADN contiene una base nitrogenada de uracilo al tratar primero al dúplex con uracil-glicosilasa para remover la partícula de uracilo y tratar subsiguientemente con ácido débil. Otro método adicional involucra la inclusión de fosfonato de metilo en el enlazador internucleosídico y separar al enlazador utilizando viperina, por ejemplo, por medio de un tratamiento a 37 °C durante una hora con una concentración de piperidina de 100 mM.

60 [0075] Los varios métodos de remoción del anti-codón de la plantilla pueden ser utilizados en la degradación selectiva de anti-codones. La ventaja de la degradación selectiva es aparente especialmente cuando la molécula naciente dirigida por la plantilla, así como el bloque de construcción son codificados por la plantilla. En un aspecto, un portador es codificado por la plantilla y los bloques de construcción son incorporados secuencialmente. Al utilizar  
65 cualquiera de los métodos que se acaban de mencionar es posible remover selectivamente el bloque de construcción, incluyendo el anti-codón y el enlazador, mientras que el anti-codón utilizado para recoser al codón que

codifica a un portador permanece adherido a la plantilla.

#### Molécula modelada

5 [0076] Cuando una estrategia es seguida en la cual la molécula modelada producida eventualmente es adherida a una plantilla por medio de un elemento complementario, que podría o podría no involucrar a un anti-codón, la afinidad es relativamente débil debido a que únicamente enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas juntan a las partes. Sin embargo, en un aspecto del invento, el elemento complementario que finalmente alberga a la molécula modelada, podría estar adherido a la plantilla a través de un híbrido elemento complementario:plantilla que  
10 tiene una temperatura más alta de recosido que los otros híbridos codón:anti-codón de la plantilla. Alternamente, y en algunas aplicaciones, preferiblemente, la molécula modelada es conectada con la plantilla que dirigió su síntesis por medio de un enlace covalente. El enlace covalente podría ser adicional a los enlaces de hidrógeno o el enlace covalente podría ser una sustitución. La presencia de un enlace covalente permite un tratamiento químico más duro del complejo. En un aspecto del invento, el enlace covalente es separable selectivamente para suministrar una  
15 separación de la molécula modelada de la plantilla complementaria.

[0077] El método de acuerdo al invento podría, como un paso final, involucrar la transferencia de la molécula modelada a un punto de anclaje en la plantilla, o una secuencia que complementa a la plantilla, para establecer una conexión química efectiva entre la plantilla y la molécula modelada. Un acoplamiento efectivo de la molécula modelada a la plantilla o una secuencia complementaria a la plantilla puede ser deseable para permitir condiciones de enriquecimiento de desnaturalización o una modificación de desnaturalización post-modelación de la molécula fabricada. El anclaje podría involucrar la presencia de un grupo reactivo en la molécula modelada y un compañero de reacción en la plantilla, haciendo posible que la reacción entre estos grupos reactivos establezca un enlace covalente. Alternamente, el punto de anclaje podría estar presente en una secuencia complementaria hibridada a la  
20 plantilla. En una sección importante, la secuencia complementaria tiene una temperatura más alta de recosido que uno o más de los bloques de construcción, notablemente el bloque de construcción terminal, para permitir el uso de una exigencia más alta durante el enriquecimiento y, opcionalmente, el despeje de los bloques de construcción utilizados.

#### Biblioteca

[0078] Este invento también se refiere a una biblioteca de complejos disfuncionales. La biblioteca es compuesta de una pluralidad de complejos diferentes, tales como por lo menos  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^9$ ,  $10^{12}$ , o  $10^{15}$  complejos diferentes. La pluralidad de diferentes complejos es producida al suministrar inicialmente una pluralidad de plantillas diferentes, así como una pluralidad de bloques de construcción. Cada uno de los anti-codones de los bloques de construcción son adyacentes para ser capaz de interactuar con por lo menos un codón de por lo menos una plantilla. La pluralidad de plantillas diferentes es sujeta simultáneamente al método que se describió anteriormente. La parte de propagación del método puede ser repetida un número deseado de veces para cambiar a la molécula modelada. Cada repetición de la propagación es iniciada al contactar a las plantillas con un nuevo subconjunto de bloques de construcción  
35 adicionales.

[0079] Las varias diferentes plantillas de este invento son construidas convenientemente para seguir un esquema general. De acuerdo al esquema, varias secciones de codificación son suministradas en la plantilla. A su vez, cada una de las secciones purificadoras específica a uno o más codones únicos. Por lo tanto, una plantilla específica comprende a un número dado de codones únicos. La pluralidad de las plantillas puede ser tomado en cuenta como una unidad, caracterizarse como una biblioteca que comprende un monto total de diferentes combinaciones de codones únicos posibles, o uno de sus subconjuntos. Las secciones codificadoras son posicionadas adecuadamente en una secuencia lineal, para que las secciones codificadoras individuales estén posicionadas inmediatamente al lado de otra, opcionalmente, separadas por una secuencia separadora. En algunas secciones, podría ser ventajoso el usar una plantilla ramificada para asegurar la proximidad de grupos reactivos, la introducción de catalizadores en la cercanía de los grupos reactivos o la introducción de por lo menos un 3<sup>er</sup> reactivo.  
45

[0080] Los codones únicos de las plantillas son compuestos preferiblemente de una secuencia de monómeros de ácidos nucleicos, tal como nucleótidos. Cada codón es preferiblemente único en el sentido que dentro de la misma sección codificadora ningún otro codón tiene una secuencia y longitud idénticas de monómeros de ácidos nucleicos. Preferiblemente, un codón único no tiene una secuencia correspondiente en ningún otro lugar de la pluralidad de plantillas. Para evitar la hibridación entre las plantillas individuales también es deseable diseñar a cada uno de los codones únicos para que su secuencia complementaria no exista en ninguna otra plantilla.  
50

[0081] El número de secciones codificadoras puede ser seleccionado de acuerdo al número de los compuestos modelados finales deseados, los bloques de construcción disponibles y la estructura modelada visualizada del compuesto. De acuerdo al invento, el número de regiones codificadoras es, preferiblemente, por lo menos 3 para lograr la diversidad deseada. El límite superior para el número de regiones codificadoras no ha sido elucidado todavía; sin embargo, se cree que un número que exceda a 100 podría dar problemas prácticos. Generalmente, es preferible utilizar plantillas que tengan entre 2 y 50 regiones codificadoras, más preferiblemente entre 3 y 30 y  
60 todavía más preferiblemente entre 4 y 15.

[0082] Dentro de cada una de las regiones codificadoras, el número de codones únicos podría seleccionarse de acuerdo a la necesidad de diversidad. El número de codones únicos en cada una de las regiones codificadoras podría ser similar o diferente. El número de codones únicos puede ser tan bajo como uno. Esta podría ser la elección cuando una entidad molecular específica es deseada en la molécula modelada cambiante. El límite superior para el número de codones únicos podría escogerse para que sea muy alto siempre y cuando la hibridación específica de oligonucleótidos de los anti-codones a sus complementos en la plantilla ocurra. Un ejemplo de un límite superior podría ser 10,000, pero podría escogerse por debajo de este límite o por encima de acuerdo a lo que se necesite.

[0083] Como un ejemplo de una biblioteca relativamente pequeña, alrededor de  $10^5$  complejos diferentes pueden ser obtenidos para plantillas que tienen 4 regiones codificadoras, donde cada región codificadora específica a 30 codones únicos. Si cada uno de los codones únicos sólo pueden estar presentes una sola vez en la plantilla, por lo menos 120 bloques de construcción diferentes deben ser suministrados. La pluralidad de plantillas y de bloques de construcción puede ser utilizada para la generación de un compuesto 4-mer, tal como un péptido alfa o beta. Una biblioteca más grande de  $10^{10}$  complejos podría ser preparada empezando desde plantillas que tengan 5 regiones codificadoras y 100 codones únicos dentro de cada región codificadora.

[0084] La biblioteca podría ser utilizada para una variedad de aplicaciones, incluyendo la búsqueda de compuestos para su uso en métodos terapéuticos o de diagnóstico y compuestos de protección vegetal, tal como pesticidas, fungicidas, etcétera. La biblioteca podría comprender a cualquier número de complejos de acuerdo al invento.

[0085] Un método para identificar los compuestos más activos que pueden ser utilizados en, por ejemplo, aplicaciones terapéuticas es el exponer a la biblioteca a un tratamiento de enriquecimiento. De acuerdo a un aspecto del invento, un enriquecimiento de una biblioteca de complejos que comprenden a moléculas modeladas con relación a una actividad predeterminada, comprende los pasos de:

- i) establecer una primera biblioteca de complejos que comprende a moléculas modeladas, donde dicha biblioteca puede ser obtenida de acuerdo a cualquiera de los métodos del invento,
- ii) exponer a la biblioteca a condiciones que enriquezcan a la biblioteca con complejos que tienen a la actividad predeterminada,
- iii) amplificar los complejos de la biblioteca enriquecida,
- iv) opcionalmente, repetir el paso ii) al iii), y
- v) obtener una biblioteca enriquecida que tenga una tasa más alta de complejos que comprenden a moléculas modeladas con la actividad predeterminada.

[0086] El paso de amplificación es preferido normalmente, aunque no siempre es necesario. Especialmente, cuando algunos ciclos de enriquecimiento son conducidos, es ventajoso hacer una amplificación para obtener complejos suficientes. En un aspecto del invento, la amplificación de los complejos de la biblioteca enriquecida comprende los pasos de contactar a la biblioteca de los complejos con medios de amplificación, amplificando a las plantillas o a las plantillas complementarias, y conduciendo el método de acuerdo al invento, utilizando el producto de la amplificación como plantilla. Los medios de amplificación pueden ser cualquiera de sistemas de amplificación de ácidos nucleicos adecuados para la amplificación de la plantilla, tal como PCR. Preferiblemente, la amplificación del complejo comprende a una amplificación de  $10^1$  a  $10^{15}$  veces.

[0087] Para permitir múltiples ciclos de enriquecimiento, 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. Los complejos podrían ser identificados después de la terminación de cada ciclo o podrían ser identificados solamente después del último ciclo. No existe una necesidad explícita para identificaciones inmediatas puesto que la amplificación puede ser realizada sin saber la secuencia de la plantilla o una secuencia que complementa a la plantilla, si la plantilla o su complemento es suministrado con regiones adecuadas de cebado. La identificación después del proceso de enriquecimiento involucra la determinación de la secuencia de la plantilla y/o la determinación estructural de la molécula modelada y/o cuando todo el complejo tiene la actividad predeterminada.

[0088] Preferiblemente, las condiciones que enriquecen a la biblioteca comprenden el contactar a un compañero de enlace con las moléculas modeladas de interés. El compañero de enlaces podría estar en una solución o podría estar directa o indirectamente inmovilizado en un soporte. El enriquecimiento es, en general, realizado utilizando un ensayo de afinidad o de actividad. En un aspecto del invento, el enriquecimiento es realizado al examinar para detectar complejos que tienen una afinidad con- o un efecto en- una molécula objetivo o una entidad objetivo. En otro aspecto el enriquecimiento es realizado por medio de una selección para detectar una actividad catalítica. Alternamente, las condiciones que enriquecen a la biblioteca involucran cualquiera de uno o más de las opciones de separación electroforética, filtración de geles, inmunoprecipitaciones, enfoques isoeléctricos, centrifugaciones e inmovilizaciones.

[0089] El proceso de enriquecimiento podría involucrar a células. Por lo tanto, en una sección, las condiciones que enriquecen a la biblioteca comprenden suministrar células capaces de internalizar a la molécula modelada, o realizar una interacción con la molécula modelada que tenga la actividad predeterminada deseada.

[0090] Cuando una biblioteca de complejos ha sido enriquecida a un grupo pequeño que comprende a complejos que presentan una actividad predeterminada, es deseable obtener a cada uno de los complejos por separado. La molécula modelada puede ser obtenida del complejo al separar al o a los enlazadores de uno o más bloques de construcción para liberar a la molécula modelada de la plantilla.

5

#### Nucleótidos

[0091] Los nucleótidos utilizados en este invento podrían ser enlazados juntos en un oligonucleótido. Cada monómero de nucleótidos es compuesto normalmente de 2 partes, expresamente una partícula de bases nitrogenadas, y una estructura. La estructura podría en algunos casos ser subdividida en una partícula de azúcar y un enlazador internucleosídico.

10

[0092] La partícula de la base nitrogenada podría ser seleccionada de entre bases nitrogenadas que ocurren naturalmente, así como bases nitrogenadas que no ocurre naturalmente. Debe quedar entendido para una persona con conocimiento en la industria que varias bases nitrogenadas que previamente han sido consideradas como "que no ocurren naturalmente" han sido subsiguientemente encontradas en la naturaleza. Por lo tanto, la "base nitrogenada" incluye no sólo a los heterociclos conocidos de purina y pirimidina, pero también a análogos heterociclos y a sus tautómeros. Ejemplos ilustrativos de bases nitrogenadas son la adenina, la guanina, la timina, la citosina, el uracilo, la purina, la xantina, la diaminopurina, la 8-N<sup>6</sup>-metiladenina, la 7-deazaxantina, la 7-deazaguanina, la N<sup>4</sup>,N<sup>4</sup>-etanocitosina, la N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-etano-2,6-diamino-purina, la 5-metilcitosina, la 5-(C<sup>3</sup>-C<sup>6</sup>)-alquilcitosina, el 5-fluorouracilo, el 5-bromouracilo, la pseudoisocitosina, la 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, la isocitosina, la isoguanina, la inosina y las bases nitrogenadas que "no ocurren naturalmente" en Benner et al., patente de Estados Unidos número. 5,432,272. El término "base nitrogenada" tiene la intención de abarcar cada uno y todos de estos ejemplos, así como sus análogos y tautómeros. Especialmente bases nitrogenadas interesantes son la adenina, la guanina, la timina, la citosina, la 5-metilcitosina, y el uracilo, los cuales son considerados como bases nitrogenadas que ocurren naturalmente en relación a las aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico a humanos.

15

20

25

30

[0093] Ejemplos de parejas específicas adecuadas de bases nitrogenadas se muestran a continuación:

35

40

45

50

55

60

65

Parejas de bases naturales

5

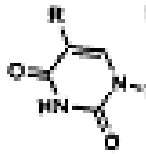
$R=H$ : Uracilo  
 $R=CH_3$ : Timina  
 Citosina

10



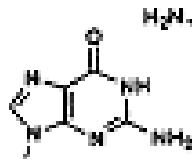
Estructura

Adenina



Estructura

Estructura



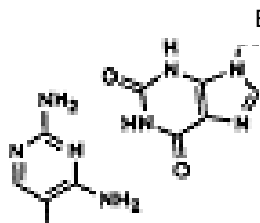
Guanina

Estructura

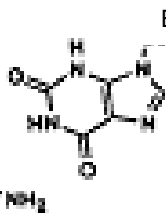
20

Parejas bases sintéticas

25

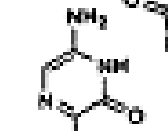


Estructura

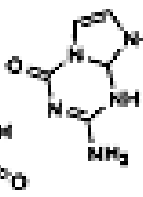


Estructura

30

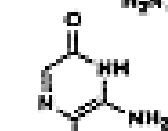


Estructura



Estructura

35

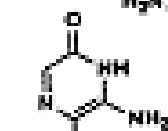


Estructura



Estructura

45



Estructura



Estructura

50

Bases sintéticas de purina

55



Estructura

Avenida de 7-deaza

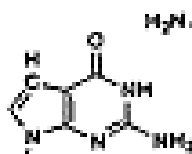


$R=H$ : Uracilo  
 $R=CH_3$ : Timina

Estructura

Citosina

60



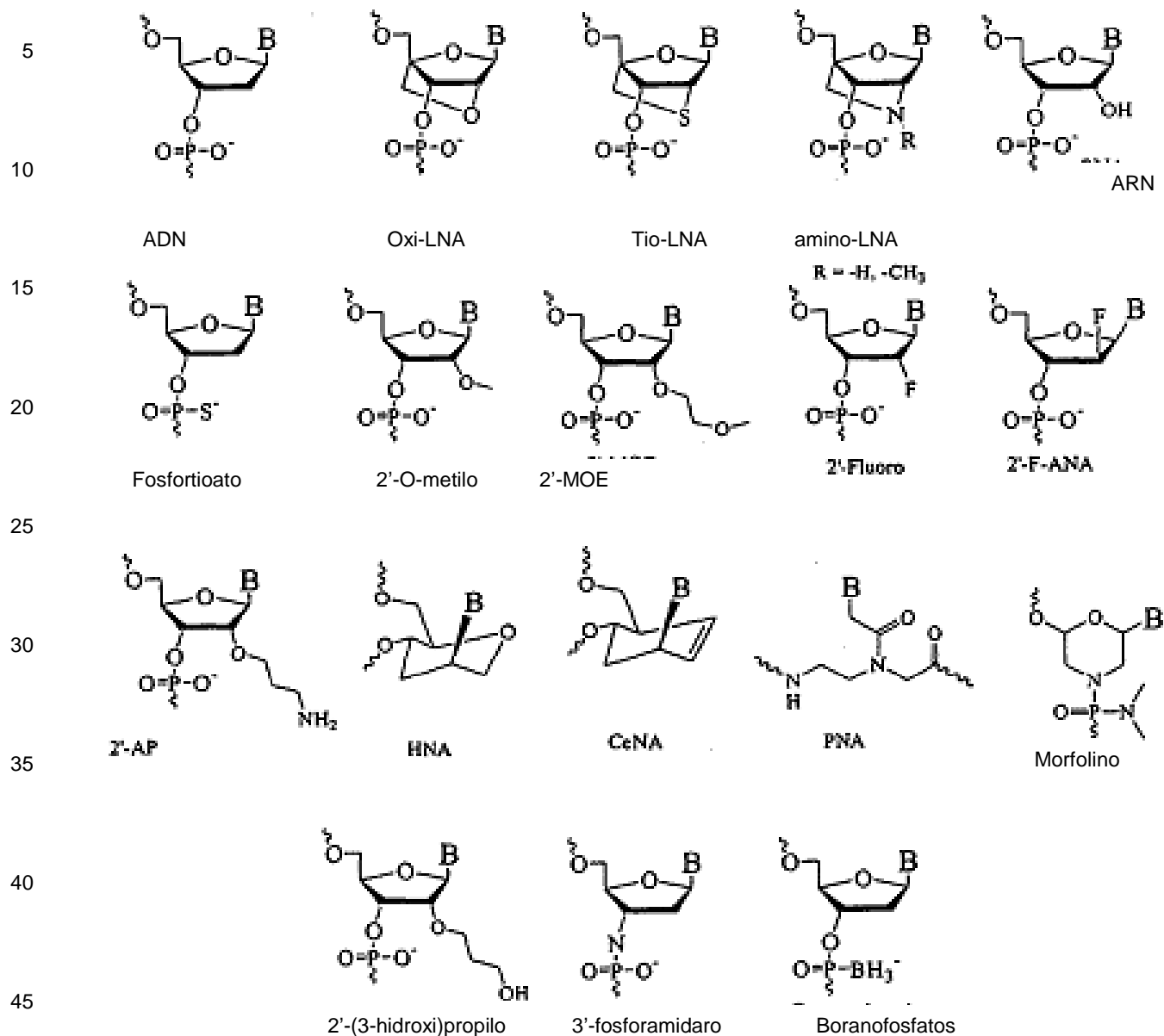
Estructura

Guanina de 7-deaza

Estructura

65

[0094] Ejemplos adecuados de unidades estructurales se muestran a continuación (B denota una base nitrogenada):



[0095] La partícula de azúcar de la estructura es adecuadamente una pentosa, pero podría ser la parte apropiada de un PNA o un anillo de 6 miembros. Ejemplos adecuados de pentosas posibles son la ribosa, la 2'-deoxiribosa, la 2'-O-metil-ribosa, 2'-flour-ribosa, y la 2'-4'-O-metileno-ribosa (LNA). En una forma adecuada, la base nitrogenada es adherida a la posición 1' de la entidad pentosa.

[0096] Un enlazador internucleosídico conecta al extremo 3' del monómero anterior a un extremo 5' de un monómero sucesor cuando la partícula de azúcar de la estructura es una pentosa, tal como la ribosa de 2'-deoxiribosa. El enlace internucleosídico podría ser el enlace de fosfodiéster que ocurre naturalmente o uno de sus derivados. Ejemplos de aquellos derivados incluyen al fosfortioato, al metilfosfonato, al fosforamidato, al fosfortriéster, y al fosfoditioato. Además, el enlazador internucleosídico puede ser cualquiera de un número de enlazadores que no contienen fósforo los cuales son conocidos en la industria.

[0097] Los monómeros de ácidos nucleicos preferidos incluyen a nucleósidos que ocurren naturalmente que forman parte del ADN, así como, la familia de ARN conectada a través de los enlaces de fosfodiésteres. Los miembros de la familia de ADN incluyen a la deoxiadenosina, a la deoxiguanosina, a la deoxitimidina, y a la deoxicitidina. Los miembros de la familia de ARN incluyen a la adenosina, a la guanosina, a la uridina, a la citidina, y a la inosina. La inosina es un nucleósido que no se empareja específicamente y podría ser utilizada como una base universal tal como se mencionó anteriormente debido a que la inosina puede emparejarse casi isoenergéticamente con A, T y C.



[0098] Cada codón es complementado por un anti-codón. El anti-codón tiene la capacidad específica de interactuar con el codón que complementa. La afinidad entre el codón y el anti-codón complementario es afectada a través de enlaces de hidrógeno de acuerdo al sistema de emparejamiento de bases de Watson-Crick el cual es muy bien conocido. Por lo tanto, el anti-codón puede estar compuesto del mismo tipo de monómeros de ácidos nucleicos que el codón en sí.

#### Grupos funcionales

[0099] La entidad funcional podría comprender a uno o más grupos funcionales, es decir, grupos que eventualmente forman parte de la molécula modelada. La molécula modelada podría comprender a uno o más de los siguientes grupos funcionales ya sean individualmente o en combinaciones:

1. Hidroxilos
2. Aminas primarias, secundarias, terciarias.
3. Ácidos carboxílicos.
4. Fosfatos, fosfonatos.
5. Sulfonatos, sulfonamidas.
6. Amidas.
7. Carbamatos.
8. Carbonatos.
9. Ureas.
10. Alcanos, alquenos, alquinos.
11. Anhídridos.
12. Cetonas.
13. Aldehídos.
14. Nitratos, nitritos.
15. Iminas.
16. Fenilos y otros grupos aromáticos.
17. Piridinas, pirimidinas purinas, indoles, imidazoles, y bases heterocíclicas.
18. Heterociclos.
19. Policiclos.
20. Flavinas.
21. Haluros.
22. Metales.
23. Quelatos.
24. Inhibidores que se basan en mecanismos.
25. Catalizadores de moléculas pequeñas.
26. Dextrinas, sacáridos.
27. Fluoresceína, rodamina y otros fluoróforos.
28. Policétidos, péptidos, varios polímeros.
29. Enzimas y ribozimas y otros catalizadores biológicos.
30. Grupos funcionales para acoplamiento post-polimerización/post activación de grupos funcionales.
31. Medicamentos, por ejemplo, la partícula de taxol, la partícula de aciclovir, "productos naturales"
32. estructuras supramoleculares, por ejemplo, nanoaglutinamientos.
33. Lípidos
34. Oligonucleótidos, análogos de oligonucleótidos (por ejemplo, PNAs, LNAs, morfolinos).
35. Hidrógeno

#### Grupos reactivos

[0100] Los grupos reactivos se refieren, entre otras cosas, a grupos que forman parte de la entidad funcional y son capaces de participar en una reacción que forma una conexión entre dos entidades funcionales, ya sea directamente o a través de una entidad molecular puente adecuada. A continuación se enumeran ejemplos de grupos reactivos:

1. N-carboxianhídridos (NCA)
2. N-tiocarboxianhídridos (NTA)
3. Aminas
4. Ácidos carboxílicos
5. Cetonas
6. Aldehídos
7. Hidroxilos
8. Tioles
9. Ésteres
10. Tioésteres
11. Sistema conjugado de enlaces dobles
12. Haluros de alquilo

13. Hidrazinas  
 14. Ésteres de N-hidroxisuccinimida  
 15. Epóxidos  
 16. Haloacetilos  
 5 17. Sacáridos activados por UDP  
 18. Sulfuros  
 19. Cianatos  
 20. Carbonilimidazol  
 21. Tiazinanonas  
 10 22. Fosfinas  
 23. Hidroxilaminas  
 24. Sulfonatos  
 25. Nucleótidos activados  
 26. Cloruro de vinilo  
 15 27. Alquenos, quinonas

#### Moléculas moldeadas

20 **[0101]** Según la presente invención, prácticamente cualquier molécula puede moldearse utilizando el procedimiento general descrito en el presente documento. Los ejemplos de compuestos que se anticipan y se pueden sintetizar incluyen, entre otros, los compuestos enumerados a continuación:

25 alfa-, beta-, gamma- y omega-péptidos mono-, di- y tri-péptidos sustituidos; péptidos con forma L y D; beta-péptidos modificados en columna ciclohexano y ciclopentano; polipéptidos vinílogos; glicopolipéptidos; poliamidas; péptido sulfonamida vinílogo; polisulfonamida; péptido conjugado (es decir, que tiene grupos prostéticos); poliésteres; polisacáridos; policarbamatos; policarbonatos; poliureas; poli-peptidilfosfonatos; azatidas; peptoides (licinas sustituidas por N oligo); poliéteres; oligómeros etoxiformacetal; polioéteres; polietilenglicoles (PEG); polietilenos; polidisulfidas; sulfuros de poliarileno; polinucleótidos; APN; ANB; morfolinis; oligo pirro-linona; polioximas; poliiminas; polietilenimina; poliacetatos; poliestirenos; poliacetileno; polivinilo; lípidos; fosfolípidos; glicolípidos; 30 policiclos (alifáticos); policiclos (aromáticos); poliheterociclos; proteoglicanos; polisiloxanos; poliisocianidas; poliisocianatos; polimetacrilatos; hidrocarburos de cadena abierta monofuncionales, difuncionales, trifuncionales y oligofuncionales; carbociclos no aromáticos monofuncionales, difuncionales, trifuncionales y oligofuncionales; hidrocarburos monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos y policíclicos; hidrocarburos policíclicos puenteados; heterociclos no aromáticos monofuncionales, difuncionales, trifuncionales y oligofuncionales; heterociclos monocíclicos, bicíclicos, 35 tricíclicos y heterociclos, heterociclos policíclicos puenteados; carbociclos aromáticos monofuncionales, difuncionales, trifuncionales y oligofuncionales; carbociclos aromáticos monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos y policíclicos; heterociclos aromáticos monofuncionales, difuncionales, trifuncionales y oligofuncionales; heterociclos monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos y policíclicos; quelatos; fullerenos; esteroides; análogos de ciclosporina; así como cualquier combinación de las partes moleculares anteriores.

40 **[0102]** La selección o el cribado, comúnmente conocido como el enriquecimiento, de la biblioteca de complejos que comprenden moléculas moldeadas con respecto a las actividades deseadas (por ejemplo, la unión a determinada diana, actividad catalítica, o un efecto particular en un ensayo de actividad) se puede realizar de acuerdo con cualquier protocolo estándar. Por ejemplo, las selecciones de afinidad se pueden realizar de acuerdo 45 con los principios utilizados para el fago presentado, los péptidos presentados en polisomas o en la fusión ARNm-proteína. La selección para la actividad catalítica se puede realizar mediante selecciones de afinidad en columnas de afinidad análogas del estado de transición (Baca et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997, 94(19):10063-8) o mediante los esquemas de selección basados en la función (Pedersen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998, 95(18):10523-8). El cribado para una característica deseada puede llevarse a cabo de acuerdo con los ensayos basados en placa 50 de microtitulación estándar o mediante ensayos de clasificación FACS.

55 **[0103]** En general, las selecciones de afinidad implican la inmovilización de una diana o una pareja de unión sobre un soporte sólido, como una columna. Posteriormente, el complejo generado de acuerdo con la invención se añade a la columna en condiciones que permitan unir una parte de los complejos a la diana. Los complejos no unidos a la diana se eluyen de la columna y se descargan. La parte de los complejos unidos a la diana se puede amplificar usando el molde o el molde complementario asociado a la molécula moldeada.

60 **[0104]** La elección del método de amplificación depende de la elección de los codones y los anticodones. Los oligonucleótidos naturales pueden amplificarse mediante cualquier procedimiento de vanguardia. Estos métodos incluyen, entre otros, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); así como, por ejemplo, la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, Compton, Nature 350, 91-92 (1991)), el ARN antisentido amplificado (por ejemplo, van Gelder et al, PNAS 85.: 77652-77656 (1988)); el sistema de replicación de secuencia autosostenida (por ejemplo Gnatelli et al, PNAS 87:1874-1878 (1990)); la amplificación independiente de la polimerasa como se describe, por ejemplo, en Schmidt et al, NAR 25: 4797-4802 (1997), así como la amplificación in vivo de plásmidos que transportan fragmentos de ADN clonados. Los métodos de amplificación mediada por ligasa 65 se pueden utilizar también, por ejemplo, LCR (reacción en cadena de la ligasa).

**[0105]** Para los nucleótidos no naturales, las opciones de métodos de amplificación eficientes son menores. Puesto que, por definición, los nucleótidos no naturales se pueden incorporar mediante ciertas enzimas, incluidas las polimerasas, será posible llevar a cabo de forma manual la reacción en cadena de la polimerasa añadiendo la polimerasa durante cada ciclo de extensión.

**[0106]** Para los oligonucleótidos que contienen análogos de nucleótidos, existen menos procedimientos para la amplificación. Se pueden utilizar esquemas de amplificación mediados no enzimáticos (Schmidt et al, NAR 25: 4797-4802 (1997)). Para los análogos de oligonucleótidos modificados en columna, como APN y ANB, puede utilizarse este método de amplificación. Antes o durante la amplificación, los moldes o moldes complementarios pueden ser mutagenizados o recombinados para crear una mayor diversidad para la siguiente ronda de selección o de cribado.

**[0107]** Tras la amplificación de la parte de molde o de la parte de molde complementario del complejo, se lleva a cabo el método de acuerdo con la invención usando el producto de amplificación como los moldes. El resultado es una biblioteca reducida o enriquecida de complejos de un molde unido a una molécula moldeada.

**[0108]** Los pasos de selección y amplificación pueden repetirse si se considera necesario para enriquecer aún más la biblioteca. Cuando se repiten los pasos de selección y amplificación, el paso de unión que implica la diana y los complejos se lleva a cabo preferiblemente en condiciones más estrictas que garantizan que solo una parte de los complejos se adhieren a la diana.

**[0109]** Los ciclos de enriquecimiento se pueden realizar de 2 a 15 veces o incluso más con el enriquecimiento en cada ciclo de 10 a 1000 veces. En un enfoque, la biblioteca de partida asciende a 10<sup>14</sup> complejos. Después de siete ciclos de enriquecimiento con una concentración de 100 veces en cada ciclo, en teoría, debería obtener el complejo con la afinidad más alta para la diana. Sin embargo, es más probable que los ciclos finales ofrezcan un pequeño grupo de complejos interesantes, que tienen que examinarse mediante otros medios.

**[0110]** Tras la ronda final de selección, suele ser conveniente secuenciar los moldes individuales para determinar la composición de las moléculas moldeadas individuales. Si el molde contiene nucleótidos naturales, es una rutina estándar amplificar opcionalmente por PCR los moldes aislados (si el molde es una molécula de ARN, es necesario usar la transcriptasa inversa para producir ADNc antes de la amplificación por PCR), y después clonar el fragmentos de ADN, por ejemplo, en plásmidos, transformar estos y luego secuenciar los clones plásmidos individuales que contienen una o varias secuencias de ADN en tándem. En este caso, es práctico diseñar un sitio de restricción en las dos secuencias flanqueadoras a la secuencia central al azar o parcialmente al azar del molde (es decir, en los sitios de unión del cebador). Esto permitirá una clonación sencilla de los nucleótidos aislados. La secuenciación puede realizarse mediante el método de terminación de cadena dideoxi estándar o por medios más clásicos, como la secuenciación de Maxam-Gilbert.

**[0111]** Si el molde contiene los nucleótidos no naturales, tal vez no sea factible clonar secuencias individuales por transferencia a través de un huésped microbiano. Sin embargo, al usar poblaciones de perla en la que cada perla transporta una secuencia oligonucleótido es posible clonar in vitro, donde después pueden amplificarse opcionalmente todos los nucleótidos unidos a una perla específica y posteriormente secuenciarse (Brenner et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 1665-1670). Como alternativa, se puede diluir de manera adecuada la población de los aislados, y luego la alícuota en placas de microtitulación de manera que los pozos contienen de media, por ejemplo, 1 molde. Al amplificar los moldes únicos, por ejemplo, mediante PCR, ahora será posible secuenciar usando métodos estándar. Por supuesto, esto requiere que los nucleótidos no naturales sean sustratos para la polimerasa termoestable utilizada en la PCR.

**[0112]** Si se utilizan métodos alternativos que requieren oligonucleótidos más cortos, tal vez sería conveniente diseñar el molde de partida de manera que contenga los sitios de restricción en cada lado de la región codificante/modelizante del molde. De este modo, tras la ronda de selección final, los moldes se pueden restringir para obtener un oligonucleótido corto que codifique el polímero moldeado y, a continuación, estos oligonucleótidos cortos se pueden aplicar a varios procedimientos analíticos.

**[0113]** También es posible secuenciar los aislados mediante el uso de una matriz de ADN de oligonucleótidos con secuencias aleatorias pero predeterminadas.

**[0114]** También sería conveniente secuenciar la población de aislados como un grupo, por ejemplo, si se espera que las secuencias estén en un registro, por ejemplo, porque la biblioteca inicial constaba de una secuencia degenerada basada en una secuencia de polímero con una actividad deseada conocida (relativamente alta). De esta forma, se espera que todos los aislados tengan secuencias similares a la secuencia inicial de los moldes antes de la selección. Por lo tanto, la población de aislados se puede secuenciar en su conjunto para obtener una secuencia consenso para la población en su conjunto.

**[0115]** Este invento también está dirigido a métodos que permiten la selección de moléculas pequeñas capaces de enlazarse a diferentes objetivos. La tecnología de moléculas que presentan a plantillas contiene una función integrada para una selección y amplificación directa. Los enlaces de la molécula seleccionada deberían ser

selectivos para que coordinen únicamente a un objetivo específico y, por lo tanto, eviten o induzcan un efecto biológico específico. Finalmente, estas moléculas enlazadoras deberían poder utilizarse, por ejemplo, como agentes terapéuticos o como agentes diagnósticos.

5 **[0116]** Las bibliotecas de moléculas presentadas en molde se pueden combinar fácilmente con cribas, selecciones o ensayos para evaluar el efecto de la unión de un ligando de molécula en la función de la diana. En una realización más específica, el método que se muestra en el molde proporciona un medio rápido para el aislamiento y la identificación de ligandos de moléculas que se unen a estructuras supramoleculares, macrosupramoleculares, macromoleculares y de bajo peso molecular (por ejemplo, ácidos nucleicos y proteínas, incluidas enzimas, receptores, anticuerpos, y glicoproteínas); moléculas de señalización (por ejemplo, AMPc, inositol trifosfato, péptidos, prostaglandinas); y superficies (por ejemplo, metal, plástico, compuesto, vidrio, cerámica, caucho, piel, tejido).

15 **[0117]** En concreto, la selección o partición en este contexto supone cualquier proceso por el cual el complejo de molécula de presentación en molde unido a una molécula diana, el par complejo-diana, se puede separar de las moléculas de presentación en molde no unidas a la molécula diana. La selección puede llevarse a cabo mediante diversos métodos conocidos en la materia.

20 **[0118]** La estrategia de selección puede llevarse a cabo de manera que permita la selección en contra de casi cualquier diana. Es importante destacar que ningún paso de esta estrategia de selección necesita información estructural detallada de la diana o las moléculas en las bibliotecas. Todo el proceso está dirigido por la afinidad de unión implicada en el reconocimiento/coordinación específico de las moléculas en la biblioteca para una determinada diana. No obstante, en algunas aplicaciones, si es necesario, la funcionalidad también puede incluirse análoga a la selección de la actividad catalítica usando la presentación en fagos (Soumillion et al. (1994) J. Mol. Biol. 237: 415-22; Pedersen et al. (1998) PNAS. 18: 10523-10528). A continuación se describe un ejemplo de varios procedimientos de selección.

30 **[0119]** Este proceso de selección integrado de molécula que se muestra en el molde es muy adecuado para optimizaciones, donde los pasos de selección se realizan en serie comenzando con la selección de moléculas de unión y terminando con la molécula de unión optimizada. Son posibles los procedimientos únicos de cada paso para automatizar el uso de varios sistemas robóticos. Esto se debe a que existe un flujo secuencial de eventos y donde cada evento se puede realizar por separado. En un entorno más preferido, se proporciona una biblioteca adecuada de molécula de presentación en molde y la molécula diana para un sistema totalmente automático que finalmente genera la molécula de unión optimizada.

35 Incluso más preferiblemente, este proceso debe funcionar sin ninguna necesidad de trabajo externa fuera del sistema robótico durante todo el procedimiento.

40 **[0120]** Las bibliotecas de molécula de presentación en molde contendrán moléculas que podrían coordinar potencialmente cualquier diana conocida o desconocida. La región de unión en una diana podría ser en un sitio catalítico de una enzima, un punto de enlace en un receptor (por ejemplo, GPCR), un área de superficie de la proteína implicada en la interacción proteína-proteína (en especial una región candente) y un sitio específico en el ADN (por ejemplo, el surco mayor). La tecnología de molécula de presentación en molde identificará principalmente moléculas que coordinan a la molécula diana. La función natural de la diana podría ser estimulada (agonizante) o reducida (antagonizante) o verse afectada por la unión de las moléculas presentadas en el molde. Esto dependerá del modo de unión preciso y del sitio de unión particular; las moléculas presentadas en el molde ocupan la diana. Sin embargo, se sabe que los sitios funcionales (por ejemplo, la interacción proteína-proteína o los sitios catalíticos) en distintas proteínas son más propensos a unirse a moléculas que otras áreas de superficie más neutras en una proteína. Además, estos sitios funcionales contienen normalmente una región más pequeña que parece ser la principal responsable de la energía de enlace, las denominadas regiones de candentes (Wells, et al. (1993) Recent Prog. Hormone Res. 48; 253-262). Este fenómeno aumentará la posibilidad de seleccionar directamente las moléculas pequeñas que afectarán a la función biológica de una determinada diana.

55 **[0121]** La tecnología de molécula de presentación en molde de la invención permitirá procedimientos de selección análogos a otros métodos de presentación, como la presentación en fagos (Smith (1985) Science 228: 1315-1317). La selección de presentación en fagos se ha utilizado con éxito 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). También se explotan procedimientos de selección similares para otros tipos de sistemas de presentación, como la presentación en ribosomas (Mattheakis et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 9022-9026) y la presentación en ARNm (Winter et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 12297-302). No obstante, la tecnología de molécula de presentación en molde de la invención permitirá por primera vez la selección directa de pequeñas moléculas no péptidas específicas de la diana independientemente del proceso de traducción en el complejo ribosoma. Los pasos necesarios incluidos en esta invención son la amplificación de los moldes y la incorporación y la reacción de los componentes básicos monómeros. La amplificación y la incorporación, y la incorporación y la reacción se llevan a cabo en el mismo paso o en un proceso secuencial.

65

**[0122]** El enlace entre la molécula moldeada (molécula presentada) y la unidad de la replicación de ADN (molde codificante) permite una rápida identificación de moléculas de unión mediante el uso de diversas estrategias de selección. Esta invención permite una amplia estrategia para identificar moléculas de unión frente a cualquier diana conocida. Además, esta tecnología también permitirá el descubrimiento de nuevas dianas desconocidas mediante el aislamiento de moléculas de unión frente a antígenos desconocidos (epítomos) y el uso de estas moléculas de unión para la identificación y validación.

**[0123]** Como se comprenderá, la selección de moléculas de unión desde las bibliotecas de moléculas presentadas en molde se puede realizar en cualquier formato para identificar moléculas de unión óptimas. Un procedimiento de selección típico frente a una diana purificada incluirá los siguientes pasos principales: Generación de una biblioteca de moléculas presentadas en molde; La inmovilización de la molécula diana mediante un enfoque de inmovilización adecuado; Añadir la biblioteca para permitir la unión de las moléculas presentadas en molde; Retirar las moléculas presentadas en molde no vinculantes; Elución de las moléculas presentadas en molde unidas a la diana inmovilizada; Amplificación de moléculas presentadas en molde enriquecidas para la identificación mediante secuenciación o para introducir las en la siguiente ronda de selección. Los pasos generales se muestran esquemáticamente en la Figura 12.

**[0124]** En una realización preferida, un protocolo de selección estándar mediante el uso de una biblioteca de moléculas de presentadas en molde es utilizar el método biopanning. En esta técnica, la diana (por ejemplo, la proteína o el conjugado de péptido) se inmoviliza sobre un soporte sólido y las moléculas presentadas en molde que coordinan potencialmente a la diana son las únicas que se seleccionan y enriquecen. Sin embargo, el procedimiento de selección requiere que las moléculas presentadas en molde unidas pueden separarse de las que no están unidas, es decir, las que están en disolución. Una persona experta en la materia puede lograr esto de muchas formas.

**[0125]** El primer paso en el ciclo de enriquecimiento de afinidad es cuando se lavan las moléculas presentadas en el molde que muestran baja afinidad por una diana inmovilizada, lo que deja las moléculas presentadas en molde de unión más fuerte unidas a la diana. A continuación, la población enriquecida, el restante unido a la diana después del riguroso lavado, se eluye con, por ejemplo, ácido, sales caotrópicas, calor, elución competitiva con el ligando conocido o liberación proteolítica de las moléculas diana/molde. Las moléculas presentadas en molde eluidas son adecuadas para la PCR, lo que conduce a muchas órdenes de amplificación, es decir, cada molécula única presentada en molde enriquecida en la primera ronda de selección participa en las nuevas rondas de selección con un número de copias considerablemente mayor. Por lo general, después de tres a diez rondas de enriquecimiento, se obtiene una población de moléculas que se enriquece en gran medida para las moléculas presentadas en molde que se unen con más fuerza a la diana. A ello le sigue un ensayo cualitativo de la proporción de moléculas de presentación en molde que permanecen unidas a la diana inmovilizada. Las secuencias del molde variante se secuencian individualmente.

**[0126]** La inmovilización de la diana (péptido, proteína, ADN u otro antígeno) en perlas puede resultar útil cuando no hay duda de que la diana adsorberá al tubo (por ejemplo, dianas desplegadas eluidas a partir de geles de SDS-PAGE). Las perlas derivatizadas se pueden utilizar luego para seleccionar entre las moléculas de presentación en molde, simplemente por sedimentación de las perlas en una centrífuga de mesa. Como alternativa, las perlas se pueden utilizar para hacer una columna de afinidad y la suspensión de las bibliotecas de presentación en molde recircula a través de la columna. Existen muchas matrices reactivas disponibles para la inmovilización de la molécula diana, incluida, por ejemplo la unión a grupos -NH<sub>2</sub> y grupos -SH. Las perlas magnéticas son fundamentalmente una variante de lo anterior; la diana está unida a perlas magnéticas que luego se utilizan en la selección. Las perlas activadas están disponibles con sitios de unión para grupos -NH<sub>2</sub> o -COOH (que se pueden utilizar para el acoplamiento). La diana también puede secarse sobre nitrocelulosa o PVDF. Al utilizar una estrategia de secado, es importante asegurarse de que la tira de papel secante utilizada se bloquea tras la inmovilización de la diana (por ejemplo con BSA o una proteína similar).

**[0127]** En otra realización preferida, también se puede realizar la selección o partición usando, por ejemplo: la inmunoprecipitación o inmunoprecipitación indirecta en la que la molécula diana se captura junto con moléculas de unión de presentación en molde; la cromatografía en columna de afinidad en la que la diana se inmoviliza en una columna y las bibliotecas de presentación de molde fluyen para capturar moléculas de unión a la diana; transferencia de gel (agarosa o poli(acrilamida)) en la que las moléculas de presentación en molde seleccionadas migran junto con la diana en el gel; clasificación FACS para localizar células que coordina las moléculas de presentación en molde; centrifugación en gradiente de CsCl para aislar la molécula diana junto con moléculas de unión de presentación en molde; espectroscopía de masas para identificar moléculas diana que están marcadas con moléculas de presentación en molde; etc., sin limitación. En general, es útil cualquier método en el que el complejo de molécula/diana de presentación en molde pueda separarse de las moléculas de presentación en molde no unidas a la diana.

Tabla 1: Ejemplos de método de selección posible para identificar moléculas de unión mediante la tecnología de presentación en molde.

	Tipo de diana	Método de elección
5	Receptores solubles	Inmovilización directa, inmunoprecipitación, columna de afinidad, clasificación FACS, MS.
10	Receptor de superficie celular	Selección de sustracción de superficie celular, selección in vivo, clasificación FACS, columna de afinidad.
15	Inhibidores enzimáticos	Inmovilización directa, inmunoprecipitación, columna de afinidad, clasificación FACS, MS.
20	Epítomos superficiales	Selección de sustracción de superficie celular, clasificación FACS, columna de afinidad.

[0128] La elución de las moléculas presentadas en molde se puede realizar de distintas maneras. Las moléculas de unión pueden liberarse de la molécula diana mediante desnaturalización, ácido o sales caotrópicas y luego transferirse a otro vial para su amplificación. Como alternativa, la elución puede ser más específica para reducir el fondo. La elución se puede lograr usando la proteólisis para escindir un enlace entre la diana y la superficie de inmovilización o entre la molécula presentada y el molde. Además, la elución se puede lograr mediante la competencia con un ligando conocido. Como alternativa, la reacción PCR se puede realizar directamente en los pozos lavados al final de la reacción de selección.

[0129] Una posible característica de la invención es el hecho de que las moléculas de unión no necesiten ser eluibles desde la diana para ser seleccionables ya que solo se necesita el ADN de molde codificante para su posterior amplificación o clonación, no la molécula de unión en sí. Se sabe que algunos procedimientos de selección pueden unir los ligandos más ávidos con tanta fuerza que resulte difícil eluirlos. Sin embargo, el método de la invención puede practicarse con éxito para producir ligandos ávidos, incluso ligandos de unión covalente.

[0130] El protocolo de selección alternativo incluye un ligando conocido como fragmento de cada molécula que se muestra en la biblioteca. Ese ligando conocido guiará la selección mediante la coordinación a una parte definida de la molécula diana y la focalización en la selección de moléculas que se unen a la misma región. Esto podría ser especialmente útil para aumentar la afinidad para un ligando con una función biológica deseada pero con una potencia demasiado baja.

[0131] Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a métodos para aumentar la diversidad o complejidad de una única molécula de unión seleccionada o de una mezcla de estas. Tras la selección inicial, las moléculas enriquecidas se pueden alterar para aumentar aún más la diversidad química o la complejidad de las moléculas presentadas. Esto puede realizarse mediante el uso de varios diversos métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, usando oligonucleótidos aleatorios sintetizados, oligonucleótidos fortalecidos o mutagénesis aleatoria. La aleatorización puede enfocarse para permitir los codones preferibles o localizados para una parte predeterminada o subsecuencia de la secuencia nucleótida de molde. Otro método preferible es recombinar moldes codificantes para las moléculas de unión de una manera similar a cómo utiliza la transposición de ADN en genes homólogos para las proteínas (Stemmer (1994) Nature 370: 389-91). Este enfoque se puede utilizar para recombinar las bibliotecas iniciales o más preferiblemente para recombinar moldes codificantes enriquecidos.

[0132] En otra realización de la invención, cuando las moléculas de unión en contra de antígenos específicos que solo es posible expresar en una superficie celular, por ejemplo, canales iónicos o receptores transmembrana, es necesario que la partícula de las propias células se puedan usar como el agente de selección. En este tipo de enfoque, las células que carecen de la diana específica deben utilizarse para hacer una o más rondas de selección negativa o estar presentes en gran exceso en el proceso de selección. Aquí se eliminan las moléculas irrelevantes presentadas en molde. Por ejemplo, para una selección positiva en contra de un receptor expresado en células enteras, la selección negativa estaría en contra de las células no transformadas. Este enfoque también se denomina selección de sustracción y se ha utilizado con éxito para la presentación en fagos en bibliotecas de anticuerpos (Hoogenboom et al. (1998) Immunotech. 4: 1-20).

[0133] Un ejemplo específico de un procedimiento de selección puede implicar la selección en contra de los receptores de la superficie celular que se internalizan desde la membrana de modo que el receptor junto con la molécula de unión seleccionada pueden abrirse camino en el citoplasma de la célula o núcleo de la célula. En

función del índice de disociación constante para moléculas de unión seleccionadas específicas, estas moléculas residen en gran medida tras la absorción en el citoplasma o el núcleo.

5 **[0134]** La persona experta en la materia admitirá que el proceso de selección puede realizarse en cualquier disposición en la que la diana se utilice como el cebo sobre el cual pueden coordinarse las moléculas presentadas en el molde.

10 **[0135]** Los métodos de selección de la presente invención se pueden combinar con la selección o cribado secundario para identificar ligandos de moléculas capaces de modificar la función de la molécula diana tras la unión. Por lo tanto, los métodos descritos aquí se pueden emplear para aislar o producir moléculas de unión que se unen y modificar la función de cualquier proteína o ácido nucleico. Se contempla que el método de la presente invención se puede emplear para identificar, aislar o producir moléculas de unión que afectarán a la actividad catalítica de las enzimas diana, es decir, inhiben la catálisis o la unión al sustrato que se modifica, afectar a la funcionalidad de los receptores de proteínas, es decir, inhiben la unión a receptores o modificar la especificidad de unión a los receptores; afectar a la formación de multímeros de la proteína, es decir, alteran la estructura cuaternaria de las subunidades de la proteína; y modificar las propiedades de transporte de la proteína, es decir, interrumpe el transporte de moléculas o iones pequeños por las proteínas.

20 **[0136]** También puede incluirse un aspecto adicional de la presente invención que se refiere a métodos que permiten la funcionalidad en el proceso de selección. Por ejemplo, cuando se ha realizado el enriquecimiento contra una diana determinada, se genera una serie de blancos distintos, estos blancos pueden probarse directamente para su funcionalidad (por ejemplo, la señalización celular). Por ejemplo, esto puede llevarse a cabo utilizando la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

25 **[0137]** El fenotipo alterado se puede detectar en una amplia variedad de formas. En general, el fenotipo modificado se detecta usando, por ejemplo: el análisis microscópico de la morfología celular; ensayos de viabilidad celular estándar, incluido el aumento de la muerte celular y el aumento de la viabilidad celular; ensayos de etiquetado estándar como ensayos con indicador fluorométrico para la presencia de nivel de célula o molécula particular, incluida FACS u otras técnicas de tinción; la detección bioquímica de la expresión de los compuestos diana tras matar las células; etc. En algunos casos, las vías de señalización específicas se pueden probar usando varios constructos de gen informador.

35 **[0138]** Los métodos de selección secundaria que se pueden combinar con tecnología de molécula de presentación en molde incluyen, entre otros, selecciones o cribas para la inhibición de la enzima, la alteración o la unión al sustrato, la pérdida de funcionalidad, la alteración de la estructura, etc. Los expertos en la materia son capaces de seleccionar entre varias alternativas de métodos de selección o cribado que sean compatibles con los métodos descritos en el presente documento.

40 **[0139]** Las moléculas de unión de la invención pueden seleccionarse para otras propiedades además de la unión. Por ejemplo, durante la selección; la estabilidad para determinadas condiciones del entorno de trabajo deseado del producto final puede incluirse como un criterio de selección. Si las moléculas de unión que son estables en presencia de una determinada proteasa es conveniente que la proteasa pueda formar parte del medio amortiguador utilizado durante la selección. Asimismo, la selección también se puede realizar en suero o en extractos de células o en cualquier tipo de medio. Como se comprenderá, cuando se utiliza este enfoque de presentación en molde, deben evitarse las condiciones que perturban o degradan el molde para permitir la amplificación. Como los expertos en la materia comprenderán, pueden incorporarse otras propiedades deseadas directamente en las moléculas de presentación. Por ejemplo, la afinidad de la membrana puede incluirse como una propiedad mediante el empleo de componentes básicos con una alta hidrofobicidad.

50 **[0140]** Las moléculas seleccionadas por la tecnología de molécula de presentación en molde pueden producirse mediante varios métodos sintéticos. La síntesis química puede llevarse a cabo, ya que la estructura de moléculas de unión seleccionada se obtiene fácilmente de la secuencia de ácido nucleico del molde codificante. La síntesis química de las moléculas seleccionadas también es posible ya que también se conocen los componentes básicos que componen las moléculas de unión, además de las reacciones químicas que reúnen juntos.

55 **[0141]** En una realización preferida, las moléculas de unión seleccionadas se sintetizan y se prueban en varios ensayos in vitro e in vivo adecuados para verificar los candidatos seleccionados para los efectos biológicos y la potencia. Esto se puede hacer en una variedad de formas, como apreciarán los expertos en la materia, y puede depender de la composición de la molécula bioactiva.

60 *Identificación y validación de la diana*

65 **[0142]** En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para identificar o aislar dianas que están implicadas en procesos patológicos u otros eventos biológicos. En este aspecto, las moléculas diana son de nuevo preferiblemente proteínas o ácidos nucleicos, pero también pueden incluir, entre otros, carbohidratos y varias moléculas a las que puede lograrse la unión de un ligando de molécula específico. En principio, la tecnología de

molécula de presentación en molde se podría utilizar para seleccionar epítomos específicos sobre antígenos que se encuentran en células, tejidos o in vivo. Estos epítomos podrían pertenecer a una diana que está implicada en importantes eventos biológicos. Además, estos epítomos también podrían estar involucrados en la función biológica de la diana.

5  
**[0143]** La presentación en fagos con anticuerpos y las bibliotecas de péptidos se ha utilizado con éxito en numerosas ocasiones para identificar nuevos antígenos celulares. (p. ej. Pasqualini et al. (1996) *Nature* 380: 364-366; Pasqualini et al. (2000) *Cancer Res.* 60: 722-727; Scheffer et al. (2002) *Br J Cancer* 86: 954-962; Kupsch et al. (1999) *Clin Cancer 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 eficaz ha sido la selección directamente en células que se sospecha que expresan antígenos específicos de la célula. Es importante destacar que al seleccionar el antígeno de la superficie celular, la molécula de molde se puede mantener fuera de la célula. Esto aumentará la probabilidad de que la molécula de molde estará intacta después de la liberación de la superficie celular.

15  
**[0144]** La selección in vivo de moléculas presentadas en molde tiene un enorme potencial. Al seleccionar desde bibliotecas de moléculas presentadas en molde in vivo es posible aislar moléculas con capacidad de expansión y migración dirigida (homing) específicamente a tejidos normales y otros tejidos patológicos (por ejemplo, tumores). Este principio se ha ilustrado mediante el uso de la presentación en fagos de bibliotecas de péptidos (Pasqualini y Ruoslathi (1996) *Nature* 280: 364-366). Este sistema se ha utilizado también en seres humanos para identificar los motivos peptídicos que localizaban a diferentes órganos (Arap et al. (2002) *Nat. Med.* 2:121-127). Se podría utilizar un procedimiento de selección similar para las bibliotecas que muestran moldes. El ADN codificante en la presentación en fagos se protege de manera efectiva mediante la partícula de fago que permite la selección in vivo. En consecuencia, la estabilidad del molde in vivo será importante para la amplificación y la identificación. El molde se puede estabilizar usando diversos derivados de nucleótidos de una forma similar a como se han utilizado para estabilizar los aptámeros para aplicaciones in vivo (Nolte (1996) *Nature Biotechnol.* 14: 1116-1121; Pagratis et al. (1997) *Nature Biotechnol.* 15: 68-72). Sin embargo, es razonable creer que la estructura del molde se estabilizará contra la degradación debido a las bases modificadas que se utilizan para la codificación de la molécula moldeada. También son posibles otros tipos de protección en los que la molécula de molde está protegida para la solución mediante el uso de varios métodos. Esto podría incluir, por ejemplo liposomas, pegilación, proteínas de unión u otros tipos de protección. La molécula de molde también podría integrarse en otra estructura diseñada que proteja el molde de la manipulación externa. Por ejemplo, el enlace se puede diseñar para incorporarse en vesículas para colocar los moldes dentro de la vesícula y las moléculas presentadas en el exterior. La disposición protegerá las moléculas de molde de la manipulación externa y, al mismo tiempo, permitirá la exposición de las moléculas presentadas para permitir la selección.

35  
**[0145]** La mayoría de anticuerpos tienen una gran área de unión cóncava que requiere hasta cierto punto epítomos que sobresalen en los antígenos. Además, la molécula de anticuerpo es una gran macromolécula (150 kDa) que reducirá estéricamente el acceso a una serie de antígenos diferentes (por ejemplo, sobre una superficie celular). La tecnología de presentación en molde debe ser capaz de acceder y reconocer epítomos inaccesibles para los anticuerpos. Las pequeñas moléculas de unión serán capaces de unirse a los sitios activos, surcos y otras áreas en un antígeno. El elemento del molde de codificación también es más pequeño que un anticuerpo que aumentará el acceso físico del par molécula vinculante al molde. Además, la diversidad y complejidad de las bibliotecas de moléculas presentadas en molde serán mucho mayores en comparación con las bibliotecas de péptidos. Esto aumentará la posibilidad de encontrar moléculas que puedan coordinar a epítomos inaccesibles para los péptidos debido a la química inadecuada. En conjunto, la tecnología de molécula de presentación en molde tiene el potencial de identificar antígenos nuevos que no es posible identificar con anticuerpos o péptidos. Un experto en la materia admitirá que pueden utilizarse varios tipos de células en el procedimiento de selección. También se entenderá que la selección de nuevos antígenos puede realizarse mediante el uso de métodos de sustracción como se describe anteriormente.

50  
**[0146]** Otro aspecto de la presente invención se refiere a métodos para validar la diana identificada. Las moléculas de unión identificadas se pueden utilizar directamente si cambian la respuesta biológica de la diana. Esto se puede hacer sea in vitro usando cualquier ensayo directo o basado en células o directamente in vivo estudiando cualquier respuesta fenotípica. La fuerza de este enfoque es que las mismas moléculas se utilizan para la identificación y la validación de varias dianas. Más favorable, las moléculas de unión también podrían utilizarse directamente como agentes terapéuticos.

60  
**[0147]** En otra realización preferida, las moléculas presentadas en molde se usan para extraer las moléculas diana. Por ejemplo, esto puede lograrse mediante la selección en contra de una biblioteca de ADNc expresada en bacteriófago (bibliotecas frente a bibliotecas). Al mezclar una biblioteca de molécula de presentación en molde con una biblioteca de ADNc será posible encontrar pares de unión entre las moléculas pequeñas en la biblioteca de molécula de presentación en molde y las proteínas de la biblioteca de ADNc. Una posibilidad es mezclar una biblioteca de presentación de fagos con una biblioteca de presentación del molde y hacer una selección para el fago o para la biblioteca de molde. La biblioteca seleccionada se cubre luego para clones de fagos localizados y el ADN que codifica el fago y las moléculas presentadas en molde se pueden identificar mediante la PCR. También podría utilizarse otros tipos de bibliotecas de ADNc, como ácidos nucleicos, carbohidratos o polímeros sintéticos.



[0148] En otra realización de la invención, la tecnología de molécula de presentación en molde puede utilizarse para tener en cuenta el metabolismo de fármacos in vivo e in vitro. Eso podría incluir las reacciones de la fase I (activación) y de la fase II (desintoxicación). Las principales clases de reacciones son la oxidación, la reducción y la hidrólisis. Otras enzimas catalizan conjugaciones. Estas enzimas podrían utilizarse como dianas en un proceso de selección para eliminar la molécula presentada que son propensas a coordinar a estas enzimas. Los moldes correspondientes a estas moléculas presentadas se podrían utilizar posteriormente para competir o eliminar estas moléculas al hacer bibliotecas de moléculas presentadas en molde.

[0149] Estas bibliotecas obtenidas estarán libres de moléculas que tengan una tendencia de unión a enzimas implicadas en la fase I-II y sea posible eliminarlas de manera más rápida. Por ejemplo, podría realizarse una selección en cada enzima independiente o en cualquier combinación de enzimas citocromo P450, flavina monooxigenasa, monoaminos oxidasas, esterases, amidasas, hidrolasas, reductasas, deshidrogenasas, oxidasas UDP-glucuronosiltransferasas, glutatona S-transferasas y otras enzimas relevantes para identificar estas moléculas de unión que son propensas a coordinar a estas enzimas metabólicas. Los inhibidores se seleccionan fácilmente debido a su afinidad de unión, pero los sustratos necesitan por lo menos afinidad micromolar para ser identificados.

[0150] Otra realización interesante de esta invención es la posibilidad de seleccionar directamente moléculas que se transportan pasiva o activamente a través de la membrana plasmática epitelial o de otras membranas. Un ensayo de selección posible es el uso de células CaCO-2, una línea de células epiteliales del colon humano, que es general, aceptada como un buen modelo para la barrera epitelial en los intestinos gastrointestinales. El ensayo de células CaCO-2 implica el crecimiento de una línea de células epiteliales del colon humano en insertos de cultivo de tejidos, de manera que la monocapa resultante forma una barrera biológica entre los compartimentos apical y basolateral. Las bibliotecas de moléculas presentadas en molde se colocan a cada lado de la monocapa de células y se recogen y se amplifican las moléculas que puedan penetrar la monocapa de células. Este proceso puede repetirse hasta que se hayan identificado moléculas activas. Para los expertos en la materia, es posible y evidente otra línea celular o disposición de este ensayo.

[0151] Un aspecto adicional de la presente invención se refiere métodos de selección para la estabilidad de las moléculas seleccionadas. Esto podría llevarse a cabo sometiendo un grupo enriquecido de moléculas de unión a un entorno que posiblemente degradará o cambiará la estructura de las moléculas de unión. Varias condiciones podrían ser determinadas proteasas o una mezcla de proteasa, extracto de células y varios fluidos de, por ejemplo, el intestino gastrointestinal. Otras condiciones podrían ser varias sales, un medio ácido o una temperatura elevada. Otra posibilidad es generar una biblioteca de ligandos conocidos y someter esa biblioteca a ensayos de estabilidad y selección para identificar moléculas estables bajo determinadas condiciones como se describe anteriormente.

#### *Aplicaciones terapéuticas*

[0152] Las posibles aplicaciones terapéuticas de la invención son grandes. Por ejemplo, la tecnología de la molécula que se muestra en el molde de la invención puede utilizarse para bloquear o estimular diversas dianas. Una diana terapéuticamente relevante es una sustancia que se sabe o se sospecha que está involucrada en un proceso de regulación que no está funcionando bien y por lo tanto conduce a un estado de enfermedad. Los ejemplos de estos procesos son la interacción receptor-ligando, la interacción transcripción-ADN, y la interacción célula-célula que implican moléculas de adhesión, la interacción cofactor-enzima, y la interacción proteína-proteína en la señalización intracelular. La molécula diana significa cualquier compuesto de interés para los que se desea un ligando de molécula. Por lo tanto, la diana puede incluir, por ejemplo, un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una matriz de compuestos localizados espacialmente, una macromolécula biológica, como el ADN o ARNm, una biblioteca de presentación de péptidos en bacteriófagos, una biblioteca de presentación de péptidos en ribosomas, un extracto obtenido a partir de materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos o células animales (por ejemplo, mamíferos) o tejidos, proteínas, proteínas de fusión, péptidos, enzimas, receptores, ligandos de receptores, hormonas, antígenos, anticuerpos, fármacos, colorantes, factores de crecimiento, lípidos, sustratos, toxinas, virus, o similares, etc., sin limitación. Otros ejemplos de dianas incluyen, por ejemplo, una célula entera, un tejido entero, una mezcla de proteínas relacionadas o no relacionadas, una mezcla de virus o cepas bacterianas o similares, etc., sin limitación.

[0153] Las dianas de fármacos terapéuticos se pueden dividir en distintas clases de acuerdo a su función; receptores, enzimas, hormonas, factores de transcripción, canales iónicos, receptores nucleares, ADN, (Drews, J. (2000), Science 287:1960-1964). Entre ellos, los receptores, los receptores nucleares y las enzimas metabólicas constituyen una grandísima mayoría de dianas conocidas para fármacos existentes. Especialmente, el receptor acoplado a proteínas G (GPCR) constituye una de las clases más importantes de dianas de fármacos junto con proteasas para la intervención farmacológica. Aunque los ejemplos anteriores se centran en las dianas más relevantes, para una persona experta en la materia será evidente que cualquier otra diana terapéutica puede ser de interés.

[0154] La presente invención que emplea la tecnología de molécula que muestra el molde se puede utilizar para identificar agonistas o antagonistas para todas estas clases de dianas de fármacos, en función de las propiedades específicas que contiene cada diana. Es posible obtener la mayoría de las dianas en una forma purificada para los

procedimientos de selección directa. Cuando se encuentran en sus ambientes nativos como los receptores de superficie celular incrustados, tienen que utilizarse otras dianas. En estas situaciones, se puede realizar la selección a través de las bibliotecas de molécula de presentación en molde usando la sustracción-selección descrita anteriormente.

5  
**[0155]** Una aplicación específica de la tecnología de molécula que se muestra en el molde de la invención es generar moléculas que puedan funcionar como antagonistas, donde las moléculas bloquean la interacción entre un receptor y una o más ligandos. Otra aplicación incluye la célula diana. Por ejemplo, las moléculas generadas que reconocen proteínas o receptores de superficie específica serán capaces de unirse a determinados tipos de células.  
 10 Además, estas moléculas pueden transportar otro agente terapéutico para aumentar la potencia y reducir los efectos secundarios (por ejemplo, para el tratamiento del cáncer). También se incluyen las aplicaciones que implican agentes antivirales. Por ejemplo, una molécula generada, que se une fuertemente a epítomos en la partícula viral, puede ser útil como un agente antiviral. Otra aplicación específica de la tecnología de la molécula que se muestra en el molde de la invención es generar moléculas que pueden funcionar como agonistas, donde las moléculas estimulan o activan un receptor para iniciar una vía de señalización celular.  
 15

#### Descripción Breve de las Figuras

[0156] Las siguientes figuras son referidas en esta descripción:

20 La figura 1 muestra una reproducción de un gel de PAGE que muestran a enlaces transversales de funcionalidades de aminos de 2 oligonucleótidos recosidos por una plantilla común.

25 La figura 2 muestra una reproducción de un gel de PAGE que muestra 2 oligonucleótidos recosidos por una plantilla común y enlazados transversalmente con una separación de 0, 1, 2 y 30 parejas base.

La figura 3 muestra una reproducción de un gel de PAGE que muestra a los enlaces transversales de 2 oligonucleótidos que terminan con una amina y con un ácido carboxílico, respectivamente.

30 La figura 4 muestra una reproducción de un gel de PAGE que muestra la influencia de diferentes perfiles de pH en la eficiencia de enlaces transversales.

35 La figura 5 muestra una reproducción de un gel de PAGE que muestra la influencia de diferentes perfiles de pH en la eficiencia de enlaces transversales.

La figura 6 muestra una reproducción de un gel de PAGE que muestra la eficiencia de enlaces transversales con un pH 9.

40 La figura 7 muestra una reproducción de un gel de PAGE que muestra la eficiencia de enlaces transversales con un pH 10.

La figura 8 muestra una reproducción de un gel de PAGE que analiza el efecto de la ausencia de la plantilla cuando se utiliza una caja compresora de 10 mer.

45 La figura 9 muestra una reproducción de un gel de PAGE que analiza el efecto de una temperatura más alta de incubación en la eficiencia de enlaces transversales.

La figura 10 muestra una imagen de un gel de PAGE que muestra el efecto de una caja compresora de 5 mer en la eficiencia de enlaces transversales.

50 La figura 11 muestra una imagen de gel de PAGE que muestra el efecto de diferentes temperaturas en la eficiencia de enlaces transversales cuando se usa una caja compresora de 10 mer.

La figura 12 muestra un dibujo esquemático del principio general utilizado en los experimentos.

55 La figura 13 muestra un dibujo esquemático del uso de un dominio de dimerización en la síntesis de (A) una molécula portada y (B) una molécula polimérica.

La figura 14 muestra una sección preferida del principio general.

60 La figura 15 muestra un cromatograma de LC de la transferencia de 2 entidades funcionales idénticas a una molécula portadora.

La figura 16 presenta a 2 configuraciones oligo utilizadas en los ejemplos.

65 La figura 17 muestra los resultados del experimento A y B en el ejemplo 15.

La figura 18 muestra los resultados del experimento D, E y F reportados en el ejemplo 16.

La figura 19 muestra los resultados del experimento A y B reportado en el ejemplo 17.

La figura 20 muestra los resultados del ejemplo 17.

La figura 21 muestra los resultados de los experimentos realizados en el ejemplo 18.

La figura 22 muestra los resultados de los experimentos presentados en el ejemplo 19.

La figura 23 muestra los resultados de los experimentos A al B reportados en el ejemplo 20.

La figura 24 presenta los resultados de los experimentos E al H reportados en el ejemplo 21.

La figura 25 muestra los resultados del ejemplo 21.

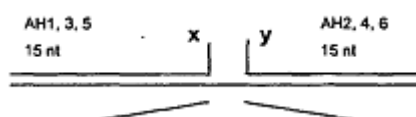
[0157] En la figura 13, se muestra un dibujo esquemático del uso de un dominio de dimerización en la síntesis de (A) una molécula portada y (B) una molécula polimérica. Cuando se modela a una molécula portada (que contiene en este ejemplo a 4 grupos reactivos del mismo tipo, Y), es conveniente utilizar a 4 bloques de construcción con cajas de compresión idénticas ("b"), y un bloque de construcción (que porte a los 4 grupos reactivos Y) con una caja compresora ("a") que es complementaria a ("b"). Cuando se modela a una molécula polimérica, una persona podría alternar entre la identidad compresora, es decir, el primer bloque de construcción que porta a una caja compresora ("a"), a un segundo bloque de construcción en la formación que porta a ("b") que se dimeriza con ("a"), a un 3<sup>er</sup> bloque de construcción que porta a ("a"), etcétera.

[0158] La sección preferida mostrada en la figura 14 incrementa la concentración local de los grupos reactivos X y Y, al traer a X y Y en una proximidad cercana a través de la dimerización de 2 cajas compresoras. En este ejemplo, 3 bloques de construcción son mostrados, donde cada uno porta a una caja de compresión, 2 de los cuales tienen a la misma secuencia ("a") y una es la secuencia complementaria ("b"). Primero, los bloques de construcción son recosidos a la plantilla a una temperatura media (donde la interacción entre las cajas compresoras es significativa). Entonces la temperatura es reducida a una temperatura más baja donde 2 dominios compresores complementarios ("a" (del primer bloque de construcción) y "b" (del segundo bloque de construcción)) se reconocen entre sí. Esto trae a X y a Y en una proximidad cercana, y X y Y pueden reaccionar para formar a YX. En el ejemplo, la reacción entre X y Y involucra una transferencia de X desde el primer bloque de construcción al segundo bloque de construcción que porta allí. Cuando la temperatura es incrementada a una temperatura media, la caja de compresión se disocia. Cuando la temperatura es reducida, el dominio compresor del segundo bloque de construcción podría recoserse a la caja compresora del 3<sup>er</sup> bloque de construcción (que porta a un grupo reactivo X). Como resultado, este X podría ahora ser transferido al segundo bloque de construcción, como resultado de la proximidad incrementada y por lo tanto la reactividad incrementada entre X y Y.

#### Ejemplos

#### Métodos generales y materiales para los ejemplos del 1 al 11.

[0159] Para examinar la eficiencia de la reacción entre 2 grupos reactivos, cada uno acoplado a un oligonucleótido, cuando los 2 oligos son recosidos a lugares cercanos en la misma plantilla, la configuración general mostrada a continuación fue la que se usó. Los oligos contienen a nucleótidos terminales (X, Y y Z) derivados con un ácido carboxílico o una amina, tal como se describe a continuación en la figura. Después de la reacción ("enlaces transversales") de los grupos reactivos de las terminales de los 2 oligos, la eficiencia de enlaces transversales fue analizada por medio de electroforesis de gel de poliacrilamida, en la forma en que los 2 oligos se acoplan como resultado de estos enlaces transversales, y por lo tanto migran en una forma más lenta a través de la columna.



Separación 0, 1, 2, 30 nt  
(Ah7,8,9,11, respectivamente)

#### Bloques de construcción:

[0160]

- Ah 1: 5'- GCTACTCGTACGAGX
- Ah 3: 5'- GCTACTCGTACGAGY
- Ah 5: 5'- GCTACTCGTACGAGZ
- 5 • Ah 2: 5'- XCACTTGCAGACAGC
- Ah 4: 5'- YCACTTGCAGACAGC
- Ah 6: 5'- ZCACTTGCAGACAGC
- Ah 14: 5'-GCTACTCGTACGAG
- Ah 23: 5'- GCTACTGGCATCGGX
- Ah 24:5'- GCTACTGGCATCGGY
- 10 • Ah 27:5'- YCACTTGCAGACAGC

[0161] En ejemplos relacionados a una caja de compresión las siguientes secuencias son utilizadas:

- AH36: 5'-CGACCTCTGGATTGCATCGGTCATGGCTGACTGTCCGTCGAA-TGTGTCCAGTTACX
- 15 • AH37:5'-ZGTAACTGGACTGTAAAGCTGCCTGTCAGTCGGTACTGACCT-GTCGAGCATCCAGCT
- AH51: 5'-ZGTAACACCTGTGTAAGCTGCCTGTCAGTCGGTACTGACCT-GTCGAGCATCCAGCT
- AH67: 5'- ZCATTGACCTGTGTAAGCTGCCTGTCAGTCGGTACTG-ACCTGTCGAGCATCCAGCT
- AH69:5'- AGZAACACCTGTGTAAGCTGCCTGTCAGTCGGTACTG-ACCTGTCGAGCATCCAGCT
- AH66: 5'-ZTTGTAACTGGACTGTAAAGCTGCCTGTCAGTCGGTACTGACC-TGTGAGCATCCAGCT
- 20 • AH65:5'-CGACCTCTGGATTGCATCGGTCATGGCTGACTGTCCGTCG-AATGTGTCCAGTTACTTX

[0162] Las secuencias de la caja de compresión están subrayadas.

- X= Carboxi-dT
- 25 • Y= Amino-Modificador C2 dT
- Z= Amino-Modificador C6 dT

30

35

40

45

50

55

60

65

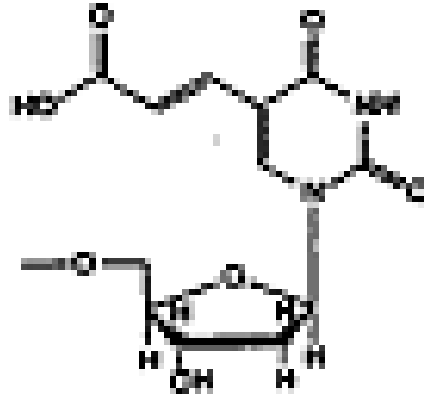
5

Carboxi-modificador C2 dt

10

15

20



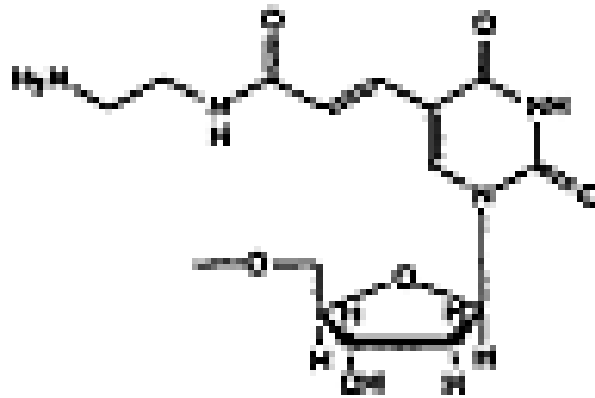
Amino-modificador C2 dT

25

30

35

40



Amino-modificador C6 dT

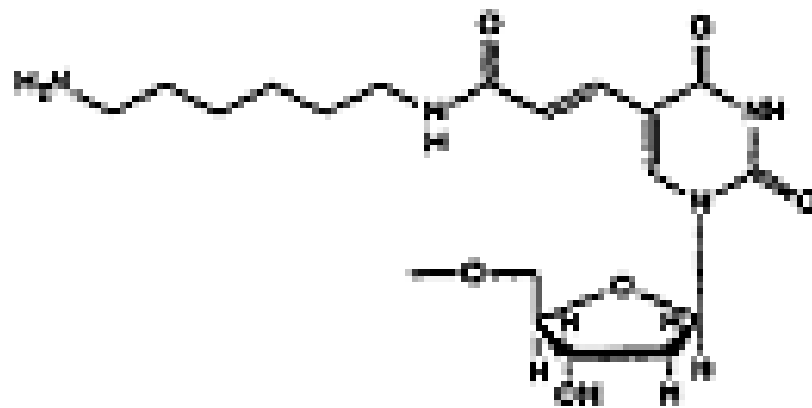
45

50

55

60

65



[0163] Los oligonucleótidos fueron preparados siguiendo el método convencional de fosfoamiditas. X fue incorporada utilizando a la fosfoamidita de carboxi-dT que está comercialmente disponible (10-1035-90 de Glen research). Los oligonucleótidos que terminan con Y y Z pueden ser preparados de los oligonucleótidos correspondientes que terminan en X utilizando el procedimiento general:

Plantillas:

[0164]

Ah 28: 5'-GCTGTCTGCAAGTGAACCGATGCCAGTAGC

Ah 38: 5'- AGCTGGATGCTCGACAGGTCCCGATGCAATCCAGAGG TCG

Ah7: 5'-GCTGTCTGCAAGTGAAC**T**CGTACGAGTAGCGACAGTCGACATCGGT**C**ACG-biotina-3'

Ah 8: 5'-GCTGTCTGCAAGT**G**ACT**C**GTACGAGTAGCGACAGTCGACATCGGT**C**ACG-biotina-3'

Ah 9: 5'-GCTGTCTGCAAGT**G**ACT**C**GTACGAGTAGCGACAGTCGACATCGGT**C**ACG-biotina-3'

**Ah 11: 5'-**

**GCTGTCTGCAAGTGACGACTGATCCAGTGACATGCGTACCATCGAACTCGTACGAGTA**

**GCGACAGTCGACATCGGT**C**ACG-** biotina-3'

[0165] La plantilla fue preparada por medio de una síntesis convencional de fosfoamiditas.

Amortiguadores

[0166]

Amortiguador A (100 mM de Hepes pH= 7,5, 1 M de NaCl)

Amortiguador B: (100 mM de NaPO4 pH=6, 1 M de NaCl)

Amortiguador C: (100 mM de NaBorate pH=9, 1 M de NaCl)

Amortiguador D: (100 mM de NaBorate pH=10, 1 M de NaCl)

Amortiguador E: (500 mM de NaPO4 pH=7, 1 M de NaCl)

Amortiguador F: (500 mM de NaPO4 pH=8, 1 M de NaCl)

Recosido de oligonucleótidos de ADN

[0167] Mezclar a los oligos en el amortiguador relevante y calentar a 80 °C y luego enfriar a 28 °C (-2 °C/30 segundos).

Marcación de 5' con <sup>32</sup>P

[0168] Mezclar 200 pmol del oligonucleótido, 2 µl de 10 x amortiguador de fosforilación (Promega cat#4103), 1 µl de quinasa de polinucleótido T4 (Promega cat#4103), 1 µl de γ-<sup>32</sup>P ATP, H2O ad 20 µl. Incubar a 37° C, 10-30 minutos.

Ejemplo 1.

[0170] Mezclar 2 µl del amortiguador A, 2 µl del oligo relevante 1 (2pmol/microlitros), 2 µl del oligo relevante 2 (2 pmol/microlitros), 4 µl del oligo relevante 3 (2 pmol/microlitro) (refiérase a la figura a continuación).

Tabla I:

Experimento	Oligo 1 (marcado <sup>32</sup> P)	Oligo 2	Oligo 3
A	Ah 3	Ah 4	Ah 7
B	Ah 5	Ah 6	Ah 7
C	Ah 5	Ah 6	Ninguno
D	Ah 5	Ah 6	Ah 8
E	Ah 5	Ah 6	Ah 9
F	Ah 14	Ah 6	Ah 7

[0171] Recoser tal como se describió anteriormente. Agregar 1 µl de 100 mM, 1 µl de 10 mM, o 0.1 µl de 10 mM de TSAT (aminotriacetato de tris-succinimidilo - Tris-succinimidyl aminotriacetate, Pierce cat#33063 disuelto en DMSO). Incubar a 25 °C durante alrededor de una hora, y luego analizar por medio de electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea.

5

[0172] Los resultados se muestran en la figura 1.

Ejemplo 2

[0173] Mezcle 2 µl del amortiguador A, 2 µl del oligo relevante 1 (0.2 pmol/ul), 1 µl del oligo relevante 2 (10 pmol/ ul), 1 µl del oligo relevante 3 (10 pmol/ul), 4 µl de H<sub>2</sub>O. (Refiérase a la tabla II, a continuación).

Tabla II:

Experimento	Oligo 1 (marcado <sup>32</sup> P)	Oligo 2	Oligo 3
G	Ah5	Ah6	Ninguno
H	Ah5	Ah6	Ah7
I	Ah5	Ah6	Ah8
J	Ah5	Ah6	Ah9
K	Ah5	Ah6	Ah11

15

20

[0174] Recoser como se describió anteriormente. Agregar 1 µl de 100 mM, 10 mM o 1 mM de TSAT (aminotriacetato de tris-succinimidilo - Tris-succinimidyl aminotriacetate, Pierce cat#33063 disuelto en DMSO). Incubar a 25 °C durante 5 horas, luego aplicar gel con un 10% de poliacrilamida de urea, tal como se describió anteriormente.

25

[0175] Los resultados se muestra en la figura 2.

Ejemplo 3:

[0176] Mezclar 2 µl de amortiguador A, 2 µl del oligo relevante 1 (0.2 pmol/ul), 1 µl del oligo relevante 2 (10 pmol/ul), 1 µl del oligo relevante 3 (10 pmol/ul), 4 µl de H<sub>2</sub>O. (Refiérase a la tabla II, a continuación).

Tabla III:

Experimento	Oligo 1 (marcado <sup>32</sup> P)	Oligo 2	Oligo 3
L	Ah 1	Ah 6	Ninguno
M	Ah 1	Ah 6	Ah 7
N	Ah 1	Ah 6	Ah 8
O	Ah 1	Ah 6	Ah 9
P	Ah 1	Ah 6	Ah 11

35

40

45

50

[0177] Recoser como se describió anteriormente. Agregar 1 µl de 1M, 100 mM, 10 mM o 1 mM de EDC (hidrocloruro de carbodiimida de (1-etil-3-(3-dimetilaminopropilo) - (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimide Hydrochloride, Fluka #03450) y 1 µl de 100 mM de NHS (N-hidroxisuccinida) (Aldrich cat # 13,067-2). Incubación a 25 °C durante 5 horas, y analizar por medio de electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea, tal como se describió anteriormente.

55

[0178] Los resultados se muestran en la figura 3.

60

Ejemplo 4:

[0179] Mezclar 2 µl del amortiguador A, B, C, D, E o F, 2 µl del oligo relevante 1 (0.2 pmol/ul), 1 µl del oligo relevante 2 (10 pmol/ul), 1 µl del oligo relevante 3 (10 pmol/ul), 4 µl de H<sub>2</sub>O. (Refiérase a la tabla IV, a continuación)

Tabla IV:

Experimento	Oligo 1 (marcado <sup>32</sup> P)	Oligo 2	Oligo 3
<b>Q</b>	<b>Ah 1</b>	<b>Ah 6</b>	<b>Ah 7</b>
<b>R</b>	<b>Ah 5</b>	<b>Ah 6</b>	<b>Ah 7</b>

[0180] Recoser tal como se describió anteriormente. Al experimento Q se le agrega 1 µl de 100 mM de NHS. Al experimento R se le agrega 1 µl de 100 mM de TSAT. Incubar a 25 °C durante alrededor de 1.5 horas, y luego analizar por medio de una electroforesis en gel con un 10% de poliacrilamida de urea.

[0181] Los resultados son mostrados en la figura 4.

Ejemplo 5:

[0182] Mezclar 2 µl del amortiguador A o D, 2 µl del oligo relevante 1 (0.2 pmol/ul), 2 µl del oligo relevante 2 (10 pmol/ul), 2 µl del oligo relevante 3 (10 pmol/ul), 2 µl de H<sub>2</sub>O. (Refiérase a la tabla V, a continuación).

Tabla V:

Experimento	Oligo 1 (marcado <sup>32</sup> P)	Oligo 2	Oligo 3
<b>S</b>	<b>Ah 5</b>	<b>Ah 6</b>	<b>Ah 7</b>
<b>T</b>	<b>Ah 14</b>	<b>Ah 6</b>	<b>Ah 7</b>

Ejemplo 6:

[0185] Mezclar 2 µl del amortiguador A, B o D, 1 µl del oligo relevante 1 (2 pmol/ul), 1 µl del oligo relevante 2 (10 pmol/ul), 1 µl del oligo relevante 3 (10 pmol/ul), 5 µl de H<sub>2</sub>O. (Refiérase a la tabla VI, a continuación).

Tabla VI

Experimento	Oligo 1 (marcado <sup>32</sup> P)	Oligo 2	Oligo 3
U <sub>A</sub> (amortiguador A)	Ah 23	Ah 27	Ah 28
V <sub>A</sub> (amortiguador A)	Ah 23	Ah 27	Ninguno
U <sub>B</sub> (amortiguador B)	Ah 23	Ah 27	Ah 28
V <sub>b</sub> (amortiguador B)	Ah 23	Ah 27	Ninguno
X (amortiguador D)	Ah 24	Ah 27	Ah 28
Y (amortiguador D)	Ah 24	Ah 27	Ninguno

[0186] Recoser tal como fue descrito anteriormente. Al experimento U y V se agrega 1 µl de 100 mM de EDC y 1 µl de 100 mM de NHS, se incuba durante alrededor de una hora a 24 °C, y luego se agregan 2 µl del amortiguador C, luego se incuba durante 30 minutos a 24 °C. Al experimento X y Y se le agregan 2 µl de 50 mM de TSAT. Se incuba a 24 °C durante 1.5 horas, y luego se analiza por medio de electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea, tal como se describió anteriormente.

[0187] Los resultados se muestran en la figura 6.

Ejemplo 7:

[0188] Mezclar 2 µl del primer amortiguador (refiérase a continuación), 1 µl de Ah 23 (2 pmol/ul), 1 µl de Ah 27 (10 pmol/ul), 1 µl de Ah28 (10 pmol/ul), 5 µl de H<sub>2</sub>O. Recoser tal como se describió anteriormente, luego agregar 1 µl de 100 mM de NHS y 1 µl de 1 M de EDC, incubar durante 30 minutos a 24 °C, luego agregar 3 µl del segundo amortiguador (refiérase a continuación). Incubar durante 40 minutos a 24 °C, y luego analizar por medio de electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea.



Tabla VII:

Experimentos	Primer amortiguador	segundo amortiguador
7-1	Amortiguador A	Amortiguador A
7-2	Amortiguador A	Amortiguador C
7-3	Amortiguador A	Amortiguador D
7-4	Amortiguador B	Amortiguador D
7-5	Amortiguador B	Amortiguador C

[0189] Los resultados se muestran en la figura 7.

#### 5 Ejemplo 8:

[0190]

Mezcla 8-1: 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 H<sub>2</sub>O.

10 Mezcla 8-2: Mezclar 2 µl del amortiguador B, 5 µl de Ah36 (0.4 pmol/ul), 1 µl de Ah37 (2 pmol/ul), 2 µl de H<sub>2</sub>O. Recoser al calentar a 80 °C, luego enfriar a 44 °C (-2 °C/30 segundos).

Agregar 1 µl de 100 mM de NHS y 1 µl de 1 M de EDC. Incubar a las temperaturas indicadas (refiérase a continuación) durante 45 minutos, luego agregar 2 µl del amortiguador D. Incubar durante alrededor de 2 horas, y luego analizar por medio de una electroforesis de gel con un 10% de poliácridamida de urea.

15

#### Temperaturas de incubación:

[0191]

45 °C, 48,2 °C, 53,0 °C, 58,5 °C, 63,1 °C, 65,6 °C

20

[0192] Los resultados se muestran en la figura 8.

#### Ejemplo 9:

[0193]

25 Mezcla 9-1: Mezclar 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 H<sub>2</sub>O.

Mezcla 9-2: Mezclar 2 µl del amortiguador B, 1 µl de Ah36 (2 pmol/ul), 1 µl de Ah51 (2 pmol/ul), 6 µl de H<sub>2</sub>O. Recoser al calentar a 80 °C, luego enfriar a 35 °C (-2 °C/30 segundos) (para las temperaturas 1 a la 6), o calentar a 80 °C, luego enfriar a 15 °C (-2 °C/30 segundos) (para las temperaturas de las 7 a las 12).

30 Agregar 1 µl de 100 mM de NHS y 1 µl de 1 M de EDC. Incubar a las temperaturas indicadas (refiérase a continuación) durante una hora, luego agregue 2 µl del amortiguador D. Incubar durante una hora, y entonces analice por medio de electroforesis de gel con un 10% de poliácridamida de urea, como se describió anteriormente.

Temperaturas de incubación:

35 [0194]

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

40 Mezcla 9-3: Mezclar 2 µl del amortiguador B, 0.5 microlitros de Ah36 (2 pmol/ul), 1 µl de Ah51 (2 pmol/ul), 1 µl de Ah38(2 pmol/ul), 5 µl de H<sub>2</sub>O.

Mezcla 9-4: Mezclar 2 µl del amortiguador B, 0.5 microlitros de Ah36 (2 pmol/ul), 1 µl de Ah51 (2 pmol/ul), 6 µl de H<sub>2</sub>O, recoser al calentar a 80 °C y luego enfriar a 5 °C (-2 °C/30 segundos).

45 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 agregue 2 µl del amortiguador D. Incumbe durante una hora, y luego analice por medio de electroforesis de gel con un 10% de poliácridamida de urea.

Temperaturas de incubación:

[0195]

50 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

[0196] Los resultados se muestran en la figura 9, A y B.

#### Ejemplo 10.

55 [0197] Mezclar 2 µl del amortiguador A, 1 µl del oligo relevante 1 (2 pmol/ul), 1 µl del oligo relevante 2 (10 pmol/ul), 1 µl del oligo relevante 3 (10 pmol/ul), 5 µl de H<sub>2</sub>O. (Refiérase a la tabla a continuación). Recoser tal como fue descrito anteriormente.

Agregar 1 µl de 100 mM de NHS y 1 µl de 1 M de EDC. Incubar 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 y luego a 35 °C durante un segundo.

Repita 99 veces. Analizar por medio de una electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea.

Tabla VIII:

Experimento	Oligo 1 (marcado <sup>32</sup> P)	Oligo 2	Oligo 3
10-1	Ah36	Ninguno	Ah38
10-2	Ah36	Ninguno	Ninguno
10-3	Ah36	Ah51	Ah38
10-4	Ah36	Ah51	Ninguno
10-5	Ah36	Ah67	Ah38
10-6	Ah36	Ah67	Ninguno
10-7	Ah36	Ah69	Ah38
10-8	Ah36	Ah69	Ninguno

[0198] Los resultados se muestran en la figura 10 A y la figura 10 B

#### 25 Ejemplo 11

[0199] Mezclar: 5 µl del amortiguador a, 1 µl del oligo relevante 1 (2 pmol/ul), 1 µl del oligo relevante 2 (10 pmol/ul), 1 µl del oligo relevante 3 (10 pmol/ul), 4.5 microlitros de H<sub>2</sub>O. (Refiérase a la tabla a continuación). Recosa al calentarse a 80 °C y luego enfriarse a 30 °C o a 55 °C. Agregue 1 µl de 100 mM de NHS y 1 µl de 1 M de EDC. Incube a 30 °C o a 55 °C. Entonces analice por medio de electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea.

Tabla IX:

Experimento	Oligo 1 (marcado <sup>32</sup> P)	Oligo 2	Oligo 3
11-1	Ah36	Ah37	Ah38
11-2	Ah36	Ah37	Ninguno
11-3	Ah65	Ah66	Ah38
11-4	Ah65	Ah66	Ninguno
11-5	Ah36	Ah66	Ah38
11-6	Ah36	Ah66	Ninguno
11-7	Ah65	Ah37	Ah38
11-8	Ah65	Ah37	Ninguno

50 [0200] Los resultados se muestran en la figura 11.

Debate de los resultados de los ejemplos 1 al 11

Influencia de la fortaleza del enlazador y de la separación entre los grupos reactivos en relación a la eficiencia de los enlaces transversales.

55 [0201] Primero examinamos el efecto del cambio de longitud del enlazador que conecta a la amina y al nucleótido. Los oligos Ah3 y Ah5 contienen una amina separada de la base del oligonucleótido por 7 y 11 enlaces, respectivamente (denominadas el modificador de amino C2 dT y el modificador de amino C6 dT, refiérase a las fórmulas que se mostraron anteriormente). Estos oligos fueron recogidos inmediatamente al oligo Ah 4 o Ah6 (que portan al modificador de amino C2 dT y el modificador de amino C6 dT, respectivamente), es decir, con una separación entre los 2 oligos de cero parejas de bases.

60 [0202] Tal como fue visto en la figura 1, las líneas A y B, la eficiencia de los enlaces transversales es aproximadamente igual para cualquiera de los modificadores de aminos. En todos los siguientes experimentos, el

oligo Ah5 (que contiene al modificador de aminos C6 dT) fue utilizado como la amina del grupo reactivo.

[0203] Luego, los 2 oligos fueron recosidos a plantillas con separaciones de 0, 1, 2 y 30 parejas de bases entre los 2 oligos, y la eficiencia de los enlaces transversales fue examinada. Primero, los enlaces transversales que usaron a TSAT (aminotriacetato de tris-succinimidilo - Tris-succinimidyl aminotriacetate, Pierce cat#33063 disuelto en DMSO) fueron investigados. Cuando los oligos Ah5 y Ah6 fueron utilizados, la eficiencia de la reacción de enlaces transversales fue la más alta con una separación de cero parejas de bases (figura 1, líneas B; figura 2, panel H), menos eficiente con una separación de una pareja de bases (figura 1, líneas D; figura 2, panel I), y muy ineficiente con separaciones de 2 y 30 parejas de bases (figura 1, líneas E y F; figura 2, panel J y K).

Segundo, los enlaces transversales de una amina y de un ácido carboxílico fueron examinados. En este experimento, se agregó EDC (hidrocloruro de carbodiimida de (1-etil-3-(3-dimetilaminopropilo) - (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimide Hydrochloride) y NHS (N-hidroxisuccimida) para hacer enlaces transversales entre los 2 grupos reactivos. Cuando los oligos Ah1 y Ah6 fueron utilizados, la eficiencia de los enlaces transversales fue nuevamente más alta para la separación más pequeña de cero parejas de bases (figura 3, panel M), relativamente alta para una separación de una pareja de bases (figura 3, panel N), y modesta e insignificante para separaciones de 2 y 30 parejas de bases, respectivamente (figura 3, panel o y P).

#### Optimización de la concentración de TSAT y de EDC

[0204] La importancia de la concentración de TSAT fue probada al utilizar a los oligos Ah5 y Ah6. Una concentración de uno o 10 mM de TSAT conlleva a enlaces transversales más eficientes que 0.1 mM y 100 mM de TSAT (figura 1 y 2). La eficiencia más baja de enlaces transversales obtenida fue cuando se usó la más alta concentración de TSAT (100 mM) lo cual podría explicarse por las 2 moléculas de TSAT que reaccionan con cada una de las aminas cercanas.

Luego, la importancia de la concentración de EDC fue examinada para enlaces transversales de un oligo que porta una amina (Ah6) y un oligo que porta a un ácido carboxílico (Ah1). Previamente, se ha descubierto que las concentraciones de NHS de alrededor de 10 mM suministran la más alta eficiencia de enlaces transversales cuando se usan junto con EDC. Tal como se muestra en la figura 3, 100 mM de EDC resulta en la eficiencia más alta de enlaces transversales cuando se compara a 0.1 mM, 1 mM y 10 mM de EDC.

#### Optimización del pH para reacciones de enlaces transversales de TSAT y de EDC/NHS

[0205] Luego, probamos la influencia de diferentes perfiles de pH para detectar eficiencias de enlaces transversales utilizando reactivos de EDC/NHS o TSAT.

Un pH de 10 suministra los enlaces transversales más eficientes de TSAT de 2 aminas (figura 4, panel R; figura 5, panel S). Los oligos Ah5 y Ah6 fueron utilizados en este estudio. En el experimento 6 (figura 6) una eficiencia de enlaces transversales del 80% es obtenida utilizando un pH 10, y una separación de cero parejas de bases entre los oligos Ah24 y Ah27 que portan aminas. En otros experimentos donde el enlazador que separa al elemento complementario (la región del oligo que se recose a la plantilla) y el grupo reactivo (aminas o ácidos carboxílicos) es mucho mayor (por ejemplo, la figura 11 y 12), la eficiencia de enlazado transversal es mucho menor.

Los oligos Ah1 y Ah6 fueron usados luego para examinar la influencia de diferentes perfiles de pH en la eficiencia de enlazado transversal utilizando a EDC/NHS. El pH constante que regula al enlazado transversal más eficiente es el pH 7.5 (figura 4, panel Q). Sin embargo, una eficiencia de enlazado transversal aún mejor es obtenida cuando el pH se mantiene inicialmente a un pH 6, y luego se incrementa a un pH 9 (figura 6) o 10 (figura 7). En los 2 últimos experimentos, se utilizaron a los oligos Ah23 y Ah27. Bajo aquellas condiciones, la eficiencia de enlazado transversal fue de casi el 100%. Tómese en cuenta, que en estos experimentos el enlazador que conecta al grupo reactivo y al elemento complementario es relativamente corto (por ejemplo, 11 enlaces para Ah27).

#### Examinación de la eficiencia de enlazado transversal al usar una secuencia de caja de compresión

[0206] Después de eso examinamos a la eficiencia de enlazado transversal utilizando oligos que portan a grupos reactivos (aminas o ácidos carboxílicos) donde el enlazador que conecta al grupo reactivo y a la región de recosido fueron de aproximadamente 25 nucleótidos.

En un primer experimento se utilizaron a los oligos Ah36 (que porta a un ácido carboxílico) y Ah67 (que porta a una amina). La plantilla utilizada (Ah38) recose a los 2 oligos que se encuentran justo al lado, es decir, con una separación de cero parejas de bases.

Bajo las condiciones del experimento, se observó menos de un 5% de eficiencia de enlazado transversal, y únicamente en la temperatura más alta que fue probada (figura 10, A y B, líneas 5).

Para mejorar la eficiencia de enlazado transversal, introdujimos a una secuencia denominada caja de compresión, en el extremo 5' y 3' de los oligos Ah67 y Ah36, respectivamente, las mismas terminales portan 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 más cercana. 2 largos diferentes de cajas de compresión fueron probados, específicamente una caja de compresión de 10' mer (Ah37/Ah66, donde Ah37 formó un dúplex de ADN de 10 parejas de bases) y la caja de compresión de 5' mer (formando un dúplex de ADN de 5 parejas de bases).

Refiérase a la figura 12. Además, diferentes diseños de cajas compresoras fueron probados, es decir, oligos en los cuales el grupo reactivo estaba adherido justo al lado de la caja compresora (Ah36, Ah37, Ah51), o estaban

ubicados 2 nucleótidos corriente arriba de la caja compresora (Ah65, Ah66), o ubicados en el medio de la caja compresora (Ah67).

Primero probamos el efecto lo de la caja compresora de 5' mer en la eficiencia de enlazado transversal. Tal como puede verse, la caja compresora de 5' mer mejora dramáticamente a la eficiencia de enlazado transversal (figura 10, A y B, compare a las líneas 3 y a las líneas 5). Note que la plantilla es absolutamente requerida para los enlaces transversales en todas las temperaturas probadas. La eficiencia más alta de enlazado transversal es obtenida cuando la temperatura entra en 99 ciclos variando la temperatura para arriba y para abajo entre 10 °C y 35 °C (figura 10B). Una eficiencia alta también es obtenida cuando la temperatura es mantenida constante a 21 °C o 26 °C (figura 10 A y B, líneas 3). La eficiencia de enlazado transversal no mejora más a temperaturas por sobre los 26 °C (figura 9, A y B).

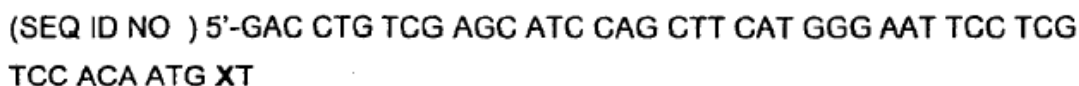
[0207] Luego probamos la eficiencia de enlazado transversal en el formato de caja compresora de 10' mer. Los oligos Ah36 y Ah37 fueron recosidos a la plantilla Ah38, y se examinó la eficiencia de enlazado transversal usando varias temperaturas. Un sorprendente nivel alto de enlazado transversal en la ausencia de la plantilla fue observado (figura 8. 45 °C y 48.2 °C Sin embargo, a temperaturas sobre los 58. 5 °C, no se observó ningún enlazado transversal en la ausencia de la plantilla.

[0208] Luego, las ubicaciones diferentes de los grupos reactivos en relación a la caja de compresión fueron probadas. Tal como se muestra en la figura 10, A y B, líneas 7, la eficiencia de enlazado transversal se reduce dramáticamente cuando uno de los 2 grupos reactivos está ubicado en el medio de la caja de compresión (es decir, cuando el grupo reactivo está adherido a un nucleótido involucrado en la formación de la hélice doble de ADN; Ah67).

La ubicación de los grupos reactivos en relación a la caja de compresión también fue probada en el contexto de la caja compresora 10' mer. En este contexto, cuando ambos grupos reactivos son separados de la caja compresora por 2 nucleótidos (Ah65, Ah66), la eficiencia de enlazado transversal es reducida ligeramente (figura 11, comparar las líneas 1 y 3). La eficiencia de enlazado transversal no cambia dramáticamente cuando diferentes combinaciones de Ah65, Ah66, Ah36 y Ah37 son probadas (es decir, cuando los grupos reactivos son ubicados justo al lado de la caja de compresión, o 2 nucleótidos corriente arriba). Note que la plantilla no es absolutamente requerida en todas las temperaturas en el contexto de la caja compresora de 10' mer. Esta independencia de la plantilla es particularmente pronunciada en la temperatura más baja (por ejemplo, la figura 11. 30 °C).

Ejemplo 12: Bloque de construcción portador de trisamina

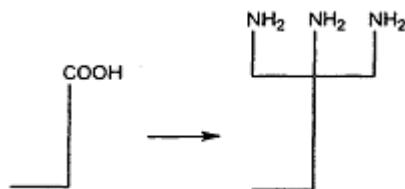
[0209] Un oligo que contenía a la base nitrogenada que tenía una partícula de ácido carboxílico fue sintetizada utilizando el método convencional de fosoramiditas:



[0210] X fue incorporado utilizando la fosoramidita de carboxi-dT que está disponible comercialmente (10-1035-90 de Glen research). La base nitrogenada subrayada representa a la región compresora.

Representación esquemática de la reacción

[0211]



[0212] El oligo que contiene a la base nitrogenada modificada con una partícula de ácido carboxílico (1 nmol) fue mezclada con agua (100 uL), amortiguador de Hepes (40 uL de 200 mM, pH=7.5), NHS (20 µl de una solución de 100 mM), EDC (20 µl de 1 M de una solución preparada recientemente) y tetrahidrocloruro de tetrakis(aminometil)metano (20 µl de una solución de 100 mM). La mezcla de la reacción fue dejada 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 al agregarse NH<sub>3</sub> conc. (20 µl) seguido por una purificación de HPLC. Fue posible aislar al y codón después de aproximadamente 6 minutos utilizando el siguiente gradiente: en los minutos 0-3 100% de A, luego 15% de A y 85% de B a los minutos 3-10, luego 100% de B en los minutos 10-15, luego 100% de A en los minutos 15-20. A = 2% de acetonitrilo de 10 mM de TEAA y B = 80% de acetonitrilo en 10 mM de TEAA.

Ejemplo 13: Procedimiento general para la adherencia de una entidad funcional a un oligo de tio.

[0213] Los siguientes oligos contenían una base nitrogenada modificada, con una partícula de tio protegida por S-trifenilmetilo, fueron sintetizados utilizando el método convencional de fosoramiditas:

(SEQ ID NO ) 5'-WCA TTG ACC TGT CTG CCB TGT CAG TCG GTA CTG TGG  
TAA CGC GGA TCG ACC T

(SEQ ID NO ) 5'-WCA TTG ACC TGA ACC ATG BTA AGC TGC CTG TCA GTC  
GGT ACT ACG ACT ACG TTC AGG CAA GA

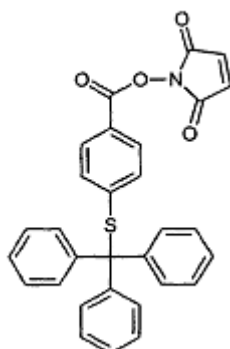
[0214] W fue incorporado utilizando a la fosoramidita modificadora de tiol la cual es comercialmente disponible (10-1926-90 de Glen research). Las bases nitrogenadas que están subrayadas indican a la región compresora.

[0215] El oligo de tiol protegido por S-trifenilmetilo (10 nmol) fue evaporado al vacío y re-suspendido en un amortiguador de TEAA (200 µl de una solución de 0.1 M, pH = 6.4). Se agregó AgNO<sub>3</sub> (30 uL de una solución de 1 M) y la mezcla fue dejada a la temperatura del cuarto durante 1-2 horas. Se agregó DTT (46 µl de una solución de 1M) y se dejó durante 5-10 minutos. La mezcla de la reacción fue centrifugada (20,000 G durante 20 minutos) y el sobrenadante fue recaudado. El sólido fue extraído con un amortiguador inicial de TEAA (100 µl de una solución de 0.1 M, pH = 6.4). El oligo de tio puro fue obtenido por medio de una precipitación convencional de EtOH.

[0216] Representación esquemática de la reacción de carga:

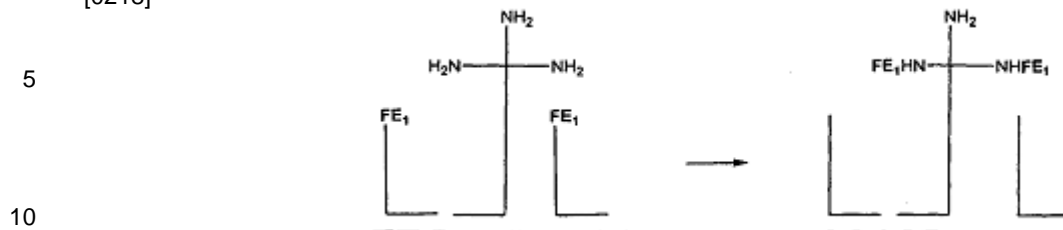


[0217] Cada uno de los oligos de tio (1 nmol) fue secado al vacío y tratado con una entidad química que comprende a la entidad funcional:



En dimetilformamida (50 µl de una solución de 0.1 M) y dejada a la temperatura del cuarto durante la noche. El bloque de construcción fue centrifugado (20,000 G durante 10 minutos) y el sobrenadante fue removido. Se agregó dimetilformamida (1 ml) y el bloque de construcción fue centrifugado (20,000 G durante 10 minutos). La dimetilformamida fue removida y el oligo de tio cargado fue re-suspendido en un amortiguador de TEAA (25 µl de una solución de 0.1 M, pH = 6.4) y analizada por HPLC.

Ejemplo 14: Síntesis de una molécula portada codificada  
[0218]



Plantilla

15 [0219] El oligo plantilla 5'-BTCTTGCCTGAACGTAGTCGTAGGTCGATCCGCGTTACCAGAGCTGGATGCTC  
GACAGGTCCCGATGCAATCCAGAGGTCTG (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO) (1 nmol) fue mezclado  
con los bloques de construcción preparados en el ejemplo 13 y con el bloque de construcción portador preparado en  
el ejemplo 12 (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 bloques de construcción 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 entonces durante la noche a una  
20 temperatura fluctuante (10  $^{\circ}$ C durante un segundo y entonces 35  $^{\circ}$ C durante un segundo). El complejo de oligos fue  
adherido a estreptavidina mediante la adición de microesferas de estreptavidina (100  $\mu$ l, pre lavado con 2x 1 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 bloque de construcción que portaba a la trisamina fue separado del complejo enlazado a la  
estreptavidina al agregarse agua (200  $\mu$ l) seguido de un calentamiento a 70  $^{\circ}$ C. El agua fue transferida y evaporada  
25 al vacío, re - suspendida en un amortiguador de TEAA (45  $\mu$ l de una solución de 0.1 M) y la formación de producto  
fue analizada por medio de HPLC (refiérase a la figura 15).

30 [0220] El cromatograma de HPLC muestra la transferencia de 2 entidades funcionales a un bloque de construcción  
portador. El cromatograma superior muestra al bloque de construcción portador referencial. El cromatograma inferior  
muestra al bloque de construcción portador purificado con estreptavidina después de la transferencia parcial de las  
entidades funcionales 1 (pico a 7.94 minutos) y 2 (pico a los 10.76 minutos). El siguiente gradiente fue utilizado: en  
los minutos 0-3 un 100% de A, entonces un 15% de A y un 85% de B en los minutos 3-10, entonces un 100% de B  
en los minutos 10-15. A = 2% de acetonitrilo en 10 mM de TEAA y B = 80% de acetonitrilo en 10 mM de TEAA.

35 [0221] Debido a la naturaleza lipófila de las entidades funcionales, se observó un tiempo de retención más largo, en  
el cromatograma de HPLC, de la molécula portada con 2 entidades funcionales comparadas a una entidad funcional.  
La eficiencia de la síntesis modelada de una molécula portada con 2 entidades funcionales idénticas fue de  
alrededor del 25% (pico a los 10.76 minutos en la figura 15).

40 Métodos generales y materiales para los ejemplos 15 al 21:

[0222] Para examinar a la eficiencia de la reacción entre 2 grupos reactivos, cada uno acoplado a un oligonucleótido,  
cuando los 2 oligos son recosidos en la misma plantilla, las 2 configuraciones mostradas en la figura 16 fueron  
45 utilizadas (la configuración A y la configuración B). Los 2 oligos contienen nucleótidos terminales derivados con un  
ácido carboxílico o una amina. Después de la reacción ("enlace transversal" de los grupos reactivos en la terminal de  
los 2 oligos, la eficiencia de los enlaces transversales podría ser analizada por medio de gel de poliacrilamida de  
electroforesis, en la forma en que los 2 oligos se acoplan como resultado de este enlace transversal, y migran, por lo  
tanto, en una forma más lenta a través de la columna.

50 Oligos de ADN:

[0223]

X = carboxi-dT

Z = modificador de aminos C6

6 = amino-modificador 5 cat. Nr. 10-1905

55 [0224] Las secuencias de cajas compresoras son indefinidas. Tome en cuenta que cuando las cajas compresoras de  
bloques de construcción interactúan con las cajas compresoras en la plantilla, la longitud del dúplex de cajas de  
compresión es un nucleótido más que es indefinido.

60

65

5 AH36: 5'-  
CGACCTCTGGATTGCATCGGTCATGGCTGACTGTCCGTCGAATGTGTCCAGT-  
TACX

10 AH51: 5'-  
ZGTAACACCTGTGTAAGCTGCCTGTCAGTCGGTACTGACCTGTCGAGCATC-  
CAGCT

15 AH82: 5'- ZGTAACACCTGGACCTGTCGAGCATCCAGCT  
AH 201: 5'-TCTGGATTGCATCGGGAGTTACX

20 AH133: 5'-  
ZGTAACICCTGTGTAAGCTGCCTGTCAGTCGGTACTGACCTGTCGAGCATC-  
CAGCT

25 AH134: 5'-  
ZGTAACCTGCTGTGTAAGCTGCCTGTCAGTCGGTACTGACCTGTCGAGCATC-  
CAGCT

30 AH135: 5'-  
ZGTAACCTGGTGTGTAAGCTGCCTGTCAGTCGGTACTGACCTGTCGAGCATC-  
CAGCT

35 AH 142: 5'-  
CGACCTCTGGATTGCATCGGTCATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCTGACTGTC  
CGTCGAATGTGTCCAGTTACX

40 AH 156: 5'-ZGACCTGTCGAGCATCCAGCT  
AH 202: 5'-TCTGGATTGCATCGGGTTACX  
AH 203: 5'-TCTGGATTGCATCGGTTTTTX  
AH 236: 5'- 6GTAACACCTGGACCTGTCGAGCATCCAGCT  
AH 240: 5'- CGACCTCTGGATTGCATCGGGCACGGTTACX  
AH 249: 5'-ZCTGGACAGCTCGTAGGTCGTTTTTTTTTTTT  
45 AH 251: 5'- ZGACCTGTCGAGCATCCAGCT  
AH 252: 5'- XGACCTGTCGAGCATCCAGCT  
AH 255: 5'-CGACCTCTGGATTGCATCGGTGTTACZ  
AH 258: 5'-ACGACTACGTTACAGGCAAGAGTTACZ  
AH 260: 5'-XCTGGACAGCTCGTAGGTCGTTTTTTTTTTTT  
AH 261: 5'-CGACCTCTGGATTGCATCGGZ  
50 AH 262: 5'-CGACCTCTGGATTGCATCGGTACZ  
AH 270: 5'- 6GTAACGACCTGTCGAGCATCCAGCT  
AH 271: 5'- 6GTAACCTGGACCTGTCGAGCATCCAGCT  
AH 272: 5'-ACGACTACGTTACAGGCAAGAGTTACX  
AH 273: 5'-ACGACTACGTTACAGGCAAGAGCGTTACX  
55 AH 274: 5'-ACGACTACGTTACAGGCAAGAGCACGGTTACX  
AH 275: 5'-CGACCTCTGGATTGCATCGGGCGTTACX  
AH 276: 5'-CTGGTAACGCGGATCGACCTGCACGGTTACX  
AH 277: 5'-CTGGTAACGCGGATCGACCTGCCTGTTACX

60 [0225] Los oligonucleótidos fueron preparados siguiendo el método convencional de fosforamiditas. X representa a la fosforamidita de carboxi-dT la cual es comercialmente disponible (10-1035-90 de Glen research). Z representa al modificador de aminos C6 dT (10-1039-de Glen Research). 6 representa el amino-modificador 5 (10-1905 de Glen Research).

65

[0226] Las secuencias de cajas compresoras son subrayadas:

AH38: 5'- AGCTGGATGCTCGACAGGTCCCGATGCAATCCAGAGGTCG

5 AH140: 5'-  
AGCTGGATGCTCGACAGGTCAGGTCGATCCGCGTTACCAGTCTTGCCTGAACG  
TAGTCGTCCGATGCAATCCAGAGGTCG

10 AH 154: 5'-  
AGCTGGATGCTCGACAGGTCAAGTAACAGGTCGATCCGCGTTACCAGTCTTGC  
15 CTGAACGTAGTCGTCCGATGCAATCCAGAGGTCG

AH 250: 5'-CGACCTACGAGCTGTCCAGAAGTAACAGGTCGATCC

20 AH 256: 5'-  
AGCTGGATGCTCGACAGGTCAAGTAACACCAGGTCGATCCGCGTTACCAGTCT  
TGCCTGAACGTAGTCGTCCGATGCAATCCAGAGGTCG

25 AH 263: 5'-  
CGACCTACGAGCTGTCCAGAAGTAACAGGTCGATCCGCGTTACCAGTCTTGCC  
30 TGAACGTAGTCGTCTGGTCACGTGGATCCTTGA

AH 278: 5'-  
35 AGCTGGATGCTCGACAGGTCGAGGTCGATCCGCGTTACCAGTCTTGCCTGAAC  
GTAGTCGTCCGATGCAATCCAGAGGTCG

40 AH 279: 5'-  
CGACCTACGAGCTGTCCAGAAGTAACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT  
TTTTTTTTCTGGTCACGTGGATCCTTGA

45 [0227] Las plantillas fueron preparadas por medio de una síntesis convencional de fosforamiditas.  
Amortiguadores:

[0228]

50 Amortiguador A (100 mM de Hepes pH= 7,5; 1 M de NaCl)  
Amortiguador B (20 mM de Hepes pH= 7,5; 200 mM de NaCl)  
Marcación de 5' con <sup>32</sup>P

55 [0229] Mezclar a 5 pmol del oligonucleótido, 2 µl de 10 x amortiguador de fosforilación (Promega cat#4103), 1 µl de  
quinasa de polinucleótidos (Promega cat#4103), 1 µl de γ-<sup>32</sup>P ATP, se agrega H<sub>2</sub>O a 20 µl. Se incuba a 37 °C,  
durante 10-30 minutos.  
PAGE (electroforesis de gel de poliacrilamida - polyacrylamide gel electrophoresis).

60 [0230] Las muestras o mezclas 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), incubado a 80 °C durante 2 minutos, y se ejecutó en un  
gel de desnaturalización con un 10% de poliacrilamida. Se desarrolló el gel utilizando auto - radiografía (Kodak,  
BioMax film).

Ejemplo 15

65 [0231] Para examinar los efectos que tiene la concentración en la eficiencia de recosido, en la eficiencia de la



reacción y en la dependencia de la plantilla en el contexto de la configuración B, hicimos el siguiente experimento, que incluyó i) el recosido y la reacción con concentraciones altas de bloques de construcción y de plantillas (experimentos A y B), ii) el recosido a altas concentraciones, seguido con una dilución de 100 veces y la reacción de esta baja concentración (E y F), y iii) el recosido y la reacción con bajas concentraciones (C y D). Para examinar la magnitud con la cual reacciones independientes de plantillas ocurren, también incluimos un complejo de control, que consistió de una plantilla competidora y un oligo competidor que portaba a un grupo reactivo (una amina). Experimental.

[0232] Mezcle a 10 µl del amortiguador a, a los oligos relevantes con varias concentraciones (refiérase a la tabla X, a continuación), y agregue H<sub>2</sub>O hasta 50 µl.

Experimento	Oligo 1 (marcado con <sup>32</sup> P) (BB1)	Oligo 2 (BB0)	Oligo 3 (plantilla)	Oligo 4 (oligo competidor)	Oligo 5 (plantilla competidora)
A	Ah 202 (1 pmol)	Ah 156 (5 pmol)	Ah 154 (5 pmol)	Ah 249 (500 pmol)	Ah 250 (500 pmol)
B	Ah 202 (1 pmol)	Ah 156 (5 pmol)	Ah 154 (5 pmol)	Ah 249 (500 pmol)	
C	Ah 202 (0,01 pmol)	Ah 251 (0,05 pmol)	Ah 256 (0,05 pmol)	Ah 249 (5 pmol)	Ah 257 (5 pmol)
D	Ah 202 (0,01 pmol)	Ah 251 (0,05 pmol)	Ah 256 (0,05 pmol)	Ah 249 (5 pmol)	
E	Ah 202 (1 pmol)	Ah 251 (5 pmol)	Ah 154 (5 pmol)		
F	Ah 202 (1 pmol)	Ah 251 (5 pmol)	Ah 154 (5 pmol)	Ah 249 (500 pmol)	Ah 263 (500 pmol)

[0233] Recosa desde 80 °C a 20 °C (-1 °C/30 segundos) para A-D y desde 80 °C a 20 °C (-1 °C/un minuto) para E y F. E y F son diluidos 100 veces después del recosido en el amortiguador B. Luego se agrega 5 µl de 500 mM de DMT-MM (preparado de acuerdo a Kunishima *et al. Tetrahedron (Tetraedro)* (2001), 57, 1551) disuelto en H<sub>2</sub>O. Incubar a varias temperaturas durante la noche, luego analizar por medio de una electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea.

[0234] Los resultados se muestra en la figura 17 (experimento A y B) y la figura 18 (experimento C, D, E y F).

Conclusiones:

[0235] Una reacción independiente de modelación es menudo observada a 20 °C. Este artefacto presumiblemente no regulado por la caja de compresión en la plantilla, tal como se observa aun cuando la plantilla competidora (que portaba la caja de compresión) no es incluida en la mezcla de incubación (refiérase, por ejemplo, a la figura 17, exp. B, línea 1). El recosido a una concentración alta, seguido por una dilución y una reacción con la concentración baja resultante elimina las reacciones independientes de plantillas, pero mantiene un recosido deficiente de los oligos de bloques de construcción en la plantilla antes del paso de reacción (compare los enlaces transversales eficientes y la ausencia de reacciones independientes de plantillas de los experimentos E y F con los experimentos menos atractivos A, B, C y D).

Ejemplo 16

[0236] Para examinar el efecto de la caja compresora en la configuración B, cuando el bloque de construcción del recosido en la posición 3, un experimento fue realizado utilizando 2 oligos diferentes de la caja de compresión, uno de los cuales tenía una caja compresora 6-mérica (6 nucleótidos del oligo del bloque de construcción se recose a la caja compresora complementaria en la plantilla), y una de las cuales no tiene una caja de compresión. Experimental.

[0237] Mezclar 10 µl del amortiguador A, oligos relevantes en varias concentraciones (refiérase a la tabla II, a continuación), y agregar H<sub>2</sub>O a 50 µl.

Tabla XI

Experimento	Oligo 1 (marcado con <sup>32</sup> P) (BB1)	Oligo 2 (BB0)	Oligo 3 (Plantilla)	Oligo 4 (Oligo competidor)
A	Ah 202 (0,01 pmol)	Ah 156 (0,05 pmol)	Ah 256 (0,05 pmol)	Ah 249 (5 pmol)
B	Ah 261 (0,01 pmol)	Ah 252 (0,05 pmol)	Ah 256 (0,05 pmol)	Ah 260 (5 pmol)

[0238] Recoser desde 80 °C a 20 °C (-1 °C/30 segundos) luego agregar a 5 µl de 500 mM de DMT-MM (preparado de acuerdo a Kunishima *et al. Tetrahedron (Tetraedro)* (2001), 57, 1551) disuelto en H<sub>2</sub>O. Se incuba a varias temperaturas durante la noche, luego se analiza por medio de electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea.

[0239] Los resultados se muestran en la figura 19.

Conclusiones.

[0240] El experimento A utiliza un bloque de construcción que porta a una caja compresora 6-mérica, y una eficiencia de enlace transversal de alrededor de 30% fue observada (experimento A, línea 2-4). Cuando un bloque de construcción sin una caja compresora es utilizado (experimento B), no se observaron enlaces transversales (el lugar en la línea 3-4 es un artefacto en la lámina, y no representa un enlace transversal). No se observa ningún enlace transversal, e incluso a 20 °C no se observan una reacción (posiblemente debido a que el bloque de construcción no porta a una caja compresora).

Ejemplo 17:

[0241] Hemos examinado la eficiencia de enlaces transversales utilizando longitudes de cajas compresoras de 5, 6 o 7 nucleótidos, en la configuración B, utilizando bloques de construcción que recosen en la posición 3. Experimental.

[0242] Mezclar 10 µl del amortiguador A, oligos relevantes en varias concentraciones (refiérase a la tabla XII, a continuación), y agregar H<sub>2</sub>O a 50 µl.

Tabla XII:

Experimento	Oligo 1 (marcado con <sup>32</sup> P) (BB1)	Oligo 2 (BB0)	Oligo 3 (plantilla)	Oligo 4 (oligo competidor)	Oligo 5 (plantilla competidora)
A	Ah 262 (1 pmol)	Ah 252 (5 pmol)	Ah 154 (5 pmol)		
B	Ah 262 (1 pmol)	Ah 252 (5 pmol)	Ah 154 (5 pmol)	Ah 260 (500 pmol)	Ah 263 (500 pmol)
C	Ah 202 (1 pmol)	Ah 251 (5 pmol)	Ah 154 (5 pmol)		
D	Ah 202 (1 pmol)	Ah 251 (5 pmol)	Ah 154 (5 pmol)	Ah 249 (500 pmol)	Ah 263 (500 pmol)
E	Ah 255 (1 pmol)	Ah 252 (5 pmol)	Ah 154 (5 pmol)		
F	Ah 255 (1 pmol)	Ah 252 (5 pmol)	Ah 154 (5 pmol)	Ah 260 (500 pmol)	Ah 263 (500 pmol)

[0243] Recoser desde 80 °C a 20 °C (-1 °C/minuto) diluir 100 veces en el amortiguador B + 50 mM de DMT-MM (preparado de acuerdo a Kunishima *et al. Tetrahedron (Tetraedro)* (2001), 57, 1551). Incubar a varias temperaturas durante la noche, luego analizar por medio de electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea

[0244] Los resultados se muestran en la figura 20.

Conclusiones.

[0245] Las cajas compresoras con 5, 6 o 7 nucleótidos de longitud regulan a enlaces transversales eficientes en el rango de temperatura de 24-28 °C (figura 20, panel A, C, E). Bajo estas condiciones (cuando el recosido es a una alta concentración y los enlaces transversales a una baja concentración), no se observan enlaces transversales al complejo competidor (figura 20, panel B, D y F).

Ejemplo 18:

[0246] En este experimento analizamos la eficiencia de enlaces transversales de varias longitudes de enlazadores con la configuración A (el enlazador conecta al anti-codón y a la caja compresora).

Experimental

[0247] Mezclar 10 µl del amortiguador a, a oligos relevantes en varias concentraciones (refiérase a la tabla XIII, a continuación), y agregar H<sub>2</sub>O a 50 µl.

Tabla XIII:

Experimento	Oligo 1 (marcado con <sup>32</sup> P) (BB1)	Oligo 2 (BB0)	Oligo 3 (plantilla)
1	Ah 202 (1 pmol)	Ah 270 (10 pmol)	Ah 140 (5 pmol)
2	Ah 202 (1 pmol)	Ah 270 (10 pmol)	Ah 278 (5 pmol)
3	Ah 275 (1 pmol)	Ah 271 (10 pmol)	Ah 140 (5 pmol)
4	Ah 275 (1 pmol)	Ah 271 (10 pmol)	Ah 278 (5 pmol)
5	Ah 240 (1 pmol)	Ah 236 (10 pmol)	Ah 140 (5 pmol)
6	Ah 240 (1 pmol)	Ah 236 (10 pmol)	Ah 278 (5 pmol)
7	Ah 240 (1 pmol)	Ah 236 (10 pmol)	
8	Ah 272 (1 pmol)	Ah 270 (10 pmol)	Ah 140 (5 pmol)
9	Ah 272 (1 pmol)	Ah 270 (10 pmol)	Ah 278 (5 pmol)
10	Ah 273 (1 pmol)	Ah 271 (10 pmol)	Ah 140 (5 pmol)
11	Ah 273 (1 pmol)	Ah 271 (10 pmol)	Ah 278 (5 pmol)
12	Ah 274 (1 pmol)	Ah 236 (10 pmol)	Ah 140 (5 pmol)
13	Ah 274 (1 pmol)	Ah 236 (10 pmol)	Ah 278 (5 pmol)
14	Ah 274 (1 pmol)	Ah 236 (10 pmol)	
15	Ah 155 (1 pmol)	Ah 270 (10 pmol)	Ah 140 (5 pmol)
16	Ah 155 (1 pmol)	Ah 270 (10 pmol)	Ah 278 (5 pmol)
17	Ah 277 (1 pmol)	Ah 271 (10 pmol)	Ah 140 (5 pmol)
18	Ah 277 (1 pmol)	Ah 271 (10 pmol)	Ah 278 (5 pmol)
19	Ah 276 (1 pmol)	Ah 236 (10 pmol)	Ah 140 (5 pmol)
20	Ah 276 (1 pmol)	Ah 236 (10 pmol)	Ah 278 (5 pmol)
21	Ah 276 (1 pmol)	Ah 236 (10 pmol)	

[0248] Recoser desde 80 °C a 20 °C (-1 °C/minuto). Agregar 5 µl de 500 mM de DMT-MM (preparado de acuerdo a Kunishima *et al. Tetrahedron (Tetraedro)* (2001), 57, 1551). Incubar a 10 °C durante 5 segundos, y luego a 35 °C durante un segundo. Repítase durante la noche, luego se analiza por medio de electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea.

[0249] Los resultados se muestran en la figura 20.

Conclusiones.

[0250] 2 aspectos son examinados: i) se examinó la influencia de la longitud del enlazador en la eficiencia de enlaces transversales (enlazadores con longitudes 0, 2, y 5 nucleótidos fueron examinados), ii) la importancia de separaciones entre los 2 bloques de construcción que reaccionan. La figura 21, líneas 1-6 involucran a un oligo de bloque de construcción recosido a la posición 3; la línea 7 involucra al mismo bloque de construcción, sin embargo, ninguna plantilla está presente en la línea 7. Las líneas 8-13 involucran a un oligo de bloque de construcción recosido a la posición 2; la línea 14 involucra al mismo oligo de bloque de construcción, sin embargo, ninguna plantilla está presente. Las líneas 15-20 involucran a un oligo de bloque de construcción recosido a la posición 1; la línea 21 involucra al mismo oligo, y ninguna plantilla está presente. Las líneas 1, 3, 5, 8, 10, 12, 15, 17, 19 utilizan a plantillas donde la separación entre los oligos enlazados de bloques de construcción tienen más nucleótidos que las plantillas utilizadas en los experimentos de las líneas 2, 4, 6, 9, 11, 13, 16, 18, y 20.

## ES 2 571 933 T3

[0251] La longitud óptima de enlazadores en lo que se refiere a la eficiencia de enlaces transversales es de cero nucleótidos en todas las posiciones (la figura 21, líneas 1, 2 para la posición 3; líneas 8, 9 para la posición 2; las líneas 15, 16 para la posición 1. Las separaciones de cero o un nucleótido entre los bloques de construcción enlazados a la posición 1 y 0, no tienen efecto en la eficiencia de enlaces transversales entre los 2 bloques de construcción (figura 21, comparar, por ejemplo, a las líneas 1 y 2). Eficiencias muy altas de enlaces transversales son observadas, en todas las tres posiciones. Utilizando una caja de compresión de 5 nucleótidos, la eficiencia de la reacción es aproximadamente del 50%, del 95% y el 95% cuando el oligo del bloque de construcción es recosido en la posición 3, 2 y 1, respectivamente, y la longitud del enlazador es cero nucleótidos (figura 21, líneas 1, 2 y 8, 9 y 15, 16).

### Ejemplo 19:

[0252] En este ejemplo, en los experimentos 5, 8, 14 y 17, analizamos la eficiencia de enlaces transversales de varias longitudes en la configuración B.

Experimental.

[0253] Mezclar 10 µl del amortiguador, los oligos relevantes en varias concentraciones (refiérase a la tabla XIV, a continuación), y agregar H<sub>2</sub>O hasta llegar a 50 µl.

Tabla XIV:

Experimento	Oligo 1 (marcado con <sup>32</sup> P) (BB1)	Oligo 2 (BB0)	Oligo 3 (plantilla)
1	Ah 240 (5 pmol)		
2	Ah 240 (5 pmol)	Ah 82 (10 pmol)	Ah 136 (10 pmol)
3	Ah 240 (5 pmol)	Ah 82 (10 pmol)	Ah 140 (10 pmol)
4	Ah 240 (5 pmol)	Ah 82 (10 pmol)	
5	Ah 240 (5 pmol)	Ah 156 (10 pmol)	Ah 154 (10 pmol)
6	Ah 240 (5 pmol)	Ah 156 (10 pmol)	
7	Ah 202 (5 pmol)		
8	Ah 202 (5 pmol)	Ah 156 (10 pmol)	Ah 154 (10 pmol)
9	Ah 203 (5 pmol)	Ah 156 (10 pmol)	
10	Ah 203 (5 pmol)		
11	Ah 203 (5 pmol)	Ah 156 (10 pmol)	Ah 154 (10 pmol)
12	Ah 203 (5 pmol)	Ah 156 (10 pmol)	
13	Ah 36 (5 pmol)		
14	Ah 36 (5 pmol)	Ah 156 (10 pmol)	Ah 154 (10 pmol)
15	Ah 36 (5 pmol)	Ah 156 (10 pmol)	
16	Ah 142 (5 pmol)		
17	Ah 142 (5 pmol)	Ah 156 (10 pmol)	Ah 154 (10 pmol)
18	Ah 142 (5 pmol)	Ah 156 (10 pmol)	

[0254] Recoser desde 80 °C a 20 °C (-1 °C/minuto). Agregar 5 µl de 500 mM de DMT-MM (preparado de acuerdo a Kunishima et al. Tetrahedron (Tetraedro) (2001), 57, 1551). Incubar a 10 °C durante 5 segundos, y entonces a 35 °C durante un segundo. Repetir durante la noche, analizar entonces por medio de electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea.

[0255] Los resultados se muestran en la figura 22.

### Conclusiones

[0256] Los experimentos miden la eficiencia de reacción entre el oligo del bloque de construcción en la posición 3 y la configuración B del oligo. Las fuerzas del enlazador de 0, 5, 30 y 50 nucleótidos regula a las deficiencias de reacción de aproximadamente el 90% (línea 8), 50% (línea 5), 20-40% (línea 14) y 20-40% (línea 17)

respectivamente. En otras palabras, una longitud del enlazador de cero nucleótidos es óptima para la configuración B, tal como también fue observado en la configuración A. En la configuración B, se alcanzaron las eficiencias de reacción desde la posición 2 y la posición 1 de aproximadamente 75% y 90% (no se muestran los datos).

5 Ejemplo 20:

[0257] Probamos la magnitud de las reacciones independientes de plantillas en varias temperaturas, utilizando longitudes de cajas de compresión de 5, 6, 7 u 8 nucleótidos, bajo condiciones donde se observaron reacciones independientes de plantillas (es decir, el recosido y reacción se realizan a temperaturas altas y a concentraciones altas de bloques de construcción).

Experimental.

15 [0258] Mezclar 2 µl del amortiguador, los oligos relevantes a varias concentraciones (refiérase a la tabla XV, a continuación), y agregar H<sub>2</sub>O hasta alcanzar 10 µl.

Tabla XV:

Experimento	Oligo 1 (marcado con <sup>32</sup> P) (BB1)	Oligo 2 (BB0)	Oligo 3 (plantilla)
A	Ah 36 (2 pmol)	Ah 51 (10 pmol)	Ah 38 (10 pmol)
B	Ah 36 (2 pmol)	Ah 51 (10 pmol)	
C	Ah 36 (2 pmol)	Ah 133 (10 pmol)	Ah 38 (10 pmol)
D	Ah 36 (2 pmol)	Ah 133 (10 pmol)	
E	Ah 36 (2 pmol)	Ah 134 (10 pmol)	Ah 38 (10 pmol)
F	Ah 36 (2 pmol)	Ah 134 (10 pmol)	
G	Ah 36 (2 pmol)	Ah 135 (10 pmol)	Ah 38 (10 pmol)
H	Ah 36 (2 pmol)	Ah 135 (10 pmol)	

[0259] Recoser de 80 °C a 20 °C (-1 °C/minuto). Agregar 1 µl de 500 mM de DMT-MM (preparado de acuerdo a Kunishima *et al.* *Tetrahedron (Tetraedro)* (2001), 57, 1551). Incubar a varias temperaturas durante la noche, analizar entonces por medio de electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea.

[0260] Los resultados se muestran en la figura 23 y 24.

Conclusiones:

[0261] Utilizando una caja de compresión 5-mérica (experimentos A y B), no se observó ninguna reacción independiente de plantillas para las temperaturas entre 9.9 °C y 50.8 °C (figura 23, líneas 1-12). Utilizando una caja compresora con una longitud de 6, 7 u 8 nucleótidos, se observó una reacción independiente de plantillas en el rango de temperaturas de 5-28 °C, 5-32 °C y 5-35 °C, respectivamente. Cuando se realicen las reacciones modeladas que no podían ser iniciadas por el experimentador (por ejemplo, al agregar un reactivo), se recomienda, por lo tanto, realizar el recosido y la reacción a una temperatura que no contiene a una reacción independiente de plantillas (por ejemplo, 25 °C, 30 °C, 34 °C y 37 °C para longitudes de cajas compresoras de 5, 6, 7, y 8 nucleótidos, respectivamente).

[0262] Cuando se realizan las reacciones que pueden ser iniciadas por el experimentador (por ejemplo, al agregar un reactivo o al exponer a ultravioleta) los complejos pueden ser formados a temperaturas más bajas, para asegurar un nivel alto de formación de complejos caja compresora-caja compresora, donde después el exceso de bloques de construcción-oligos podrían ser removidos lavándose, y luego la reacción puede ser iniciada. Dada la concentración más baja de bloques de construcción-oligos después del lavado, la reacción independiente de plantillas será mucho menos significativa.

Ejemplo 21:

[0263] En un procedimiento de varios pasos (donde los bloques de construcción-oligos son agregados al complejo portador de la plantilla y reaccionan uno a la vez), es importante que los oligos (utilizados en el paso anterior, y todavía enlazados a la plantilla) no interfieran con la reacción del último bloque de construcción-oligo agregado. Aquí examinamos si la eficiencia de los enlaces transversales entre los oligos de los bloques de construcción enlazados a la posición 2 y a la posición 0 son afectados por los oligos de bloques de construcción enlazados a la posición 3, en las configuraciones A y B.

Experimental.

[0264] Mezclar 10 µl del amortiguador A, los oligos relevantes en varias concentraciones (refiérase a la tabla XVI, a continuación), y agregar H<sub>2</sub>O a 50 µl.

5 Tabla XVI:

Experimento	Oligo 1 (marcado con <sup>32</sup> P) (BB1)	Oligo 1+	Oligo 2 (BB0)	Oligo 3 (plantilla)	Oligo 4 (oligo competidor)	Oligo 5 (plantilla competidora)
A	Ah 258 (1 pmol)	Ah 202 (10 pmol)	Ah 252 (10 pmol)	Ah 154 (5 pmol)		
10 B	Ah 258 (1 pmol)		Ah 252 (10 pmol)	Ah 154 (5 pmol)		
C	Ah 258 (1 pmol)	Ah 202 (10 pmol)	Ah 252 (10 pmol)	Ah 154 (5 pmol)	Ah 260 (10 pmol)	Ah 279 (5 pmol)
15 D	Ah 258 (1 pmol)	252	Ah 252 (10 pmol)	Ah 154 (5 pmol)	Ah 260 (10 pmol)	Ah 279 (5 pmol)
E	Ah 272 (1 pmol)	Ah 255 (10 pmol)	Ah 270 (10 pmol)	Ah 140 (5 pmol)		
20 F	Ah 272 (1 pmol)		Ah 270 (10 pmol)	Ah 140 (5 pmol)		

[0265] Recoser desde 80 °C a 30 °C (-1 °C/minuto) sin BB1. Agregar BB1 y recoser nuevamente desde 55 °C a 30 °C (-1 °C/minutos). Diluir 100 veces el amortiguador B + 50 mM de DMT-MM (preparado de acuerdo a Kunishima *et al. Tetrahedron (Tetraedro)* (2001), 57, 1551). Incubar 30 °C durante la noche para A y D, y a 10 °C durante 5 segundos y 35 °C durante un segundo, repetir durante la noche para E y F, y entonces analizar por medio de electroforesis de gel con un 10% de poliacrilamida de urea.

[0266] Los resultados se muestran en la figura 25.

Conclusiones.

30 [0267] Una posición ocupada 3 no interfiere con los enlaces transversales de los bloques de construcción enlazados a la posición 2 y 0 (figura 25, comparado la línea A con la línea B, a la línea C con la línea D, a la línea E con la línea F).

LISTAS SECUENCIALES

35 [0268]

<110> Nuevolution A/S

<120> UN MÉTODO MEJORADO PARA LA SÍNTESIS DE MOLÉCULAS MODELADAS

40 <130> TM3-PCT

<140> PCT/DK03/00172

<141> 2003-03-14

45 <150> DK PA 2002 0415

<151> 2002-03-15

50 <150> DK PA 2002 00952

<151> 2002-06-20

<150> US 60/389,885

<151> 2002-06-20

55 <150> DK PA 2002 01347

<151> 2002-09-12

<150> US 60/409,968

<151> 2002-09-12

60 <150> US 60/364,056

<151> 2002-03-15

<150> PCT/DK 02/00419

# ES 2 571 933 T3

<151> 2002-06-20  
<150> US 10/175,539  
<151> 2002-06-20  
5 <160> 61  
<170> Versión de patente 3.2  
10 <210> 1  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
15 <220>  
<223> Oligos de bloques de construcción utilizados en los ejemplos 1 a 11  
<220>  
<221> característica\_misc  
20 <222> (15)..(15)  
<223> Carboxi-modificador C2 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1035-90)  
<400> 1  
gctactcgta cgagn 15  
25 <210> 2  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
30 <220>  
<223> Oligos de bloques de construcción utilizados en los ejemplos 1 a 11  
<220>  
<221> característica\_misc  
35 <222> (15)..(15)  
<223> Amino-modificador C2 dT (obtenido de Glen Research catálogo # 10-1037-90)  
<400> 2  
gctactcgta cgagn 15  
40 <210> 3  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
45 <220>  
<223> Oligos de bloques de construcción utilizados en los ejemplos 1 a 11  
<220>  
<221> característica\_misc  
50 <222> (15)..(15)  
<223> Modificador de aminos C6 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1039-90)  
<400> 3  
gctactcgta cgagn 15  
55 <210> 4  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
60 <220>  
<223> Oligos de bloques de construcción utilizados en los ejemplos 1 a 11  
<220>  
65 <221> característica\_misc  
<222> (1)..(1)

# ES 2 571 933 T3

<223> Carboxi-modificador C2 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1035-90)

<400> 4  
ncacttgacg acagc 15

5

<210> 5  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Oligos de bloques de construcción utilizados en los ejemplos 1 a 11

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (1)..(1)  
<223> Amino-modificador C2 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1037-90)

15

<400> 5  
ncacttgacg acagc 15

20

<210> 6  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> Oligos de bloques de construcción utilizados en los ejemplos 1 a 11

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (1)..(1)  
<223> Modificador de aminos C6 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1039-90)

30

<400> 6  
ncacttgacg acagc 15

35

<210> 7  
<211> 14  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40

<220>  
<223> Oligos de bloques de construcción utilizados en los ejemplos 1 a 11

<400> 7  
gctactcgta cgag 14

45

<210> 8  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50

<220>  
<223> Oligos de bloques de construcción utilizados en los ejemplos 1 a 11

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (15)..(15)  
<223> Carboxi-modificador C2 dT (contenido de Glen Research, catálogo # 10-1035-90)

55

<400> 8  
gctactggca tcggn 15

60

<210> 9  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

65

<220>  
<223> Oligos de bloques de construcción utilizados en los ejemplos 1 a 11



# ES 2 571 933 T3

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (15)..(15)  
 5 <223> Amino-modificador C2 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1037-90)  
  
 <400> 9  
 gctactggca tcggn 15  
  
 10 <210> 10  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligos de bloques de construcción utilizados en los ejemplos 1 a 11  
  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(1)  
 20 <223> Amino-modificador C2 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1037-90)<400> 10  
  
 nacttgacg acagc 15  
  
 <210> 11  
 25 <211> 56  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligos de bloques de construcción utilizados en los ejemplos 1 a 11  
  
 30 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (56)..(56)  
 <223> Carboxi-modificador C2 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1035-90)  
 35 <400> 11  
 cgacctctgg attgcatcgg tcatggctga ctgtccgtcg aatgtgtcca gttacn 56  
  
 <210> 12  
 40 <211> 56  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligos de bloques de construcción utilizados en los ejemplos 1 a 11  
 45 <220>  
 <221> Secuencia artificial  
 <222> (1)..(1)  
 <223> modificador de aminos C6 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1039-90)  
 50 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(1)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 55 <400> 12  
 ngtaactgga ctgtaagctg cctgtcagtc ggtactgacc tgtcgagcat ccagct 56  
  
 <210> 13  
 60 <211> 56  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 65 <223> característica\_misc

# ES 2 571 933 T3

- <220>  
<221> característica\_misc
- 5 <222> (1)..(1)  
<223> modificador de aminos C6 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1039-90)
- <400> 13  
ngtaacacct gtgtaagctg cctgtcagtc ggtactgacc tgctgagcat ccagct 56
- 10 <210> 14  
<211> 56  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 15 <220>  
<223> Oligos de bloques de construcción utilizados en los ejemplos 1 a 11
- 20 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (1)..(1)  
<223> modificador de aminos C6 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1039-90)
- <400> 14  
ncattgacct gtgtaagctg cctgtcagtc ggtactgacc tgctgagcat ccagct 56
- 25 <210> 15  
<211> 56  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>  
<223> Oligos de bloques de construcción utilizados en los ejemplos 1 a 11
- 35 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (3)..(3)  
<223> modificador de aminos C6 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1039-90)
- <400> 15  
agnaacacct gtgtaagctg cctgtcagtc ggtactgacc tgctgagcat ccagct 56
- 40 <210> 16  
<211> 58  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>  
<223> Oligos de bloques de construcción utilizados en los ejemplos 1 a 11
- 50 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (1)..(1)  
<223> modificador de aminos C6 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1039-90)
- <400> 16  
nttgtaactg gactgtaagc tgcctgtcag tcggtactga cctgtcagc atccagct 58
- 55 <210> 17  
<211> 58  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 60 <220>  
<223> Oligos de bloques de construcción utilizados en los ejemplos 1 a 11
- 65 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (58)..(58)  
<223> Amino-modificador C2 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1035-90)

<400> 17  
 cgacctctgg atgcatcgg tcatggctga ctgtccgtcg aatgtgtcca gttacttn 58

5 <210> 18  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

10 <223> Plantillas utilizadas en los ejemplos del 1 al 11

<400> 18  
 gctgtctgca agtgaaccga tgccagtagc 30

15 <210> 19  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

20 <223> Plantillas utilizadas en los ejemplos del 1 al 11

<400> 19  
 agctggatgc tcgacaggtc ccgatgcaat ccagaggctg 40

25 <210> 20  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Plantillas utilizadas en los ejemplos del 1 al 11

<220>  
 <221> característica\_misc  
 35 <222> (51)..(51)  
 <223> Fosforamidita de biotina (obtenida de Glen Research, catálogo # 10-1953-95)

<400> 20  
 gctgtctgca agtgaactcg tacgagtagc gacagtcgac atcggtcacg n 51

40 <210> 21  
 <211> 52  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Plantillas utilizadas en los ejemplos del 1 al 11

<220>  
 <221> característica\_misc  
 50 <222> (51)..(51)  
 <223> Fosforamidita de biotina (obtenida de Glen Research, catálogo # 10-1953-95)

<220>  
 <221> característica\_misc  
 55 <222> (52)..(52)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 <400> 21  
 gctgtctgca agtgacactc gtacgagtag cgacagtcga catcggtcac gn 52

60 <210> 22  
 <211> 53  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Plantillas utilizadas en los ejemplos del 1 al 11

<220>  
 <221> característica\_misc  
 5 <222> (53)..(53)  
 <223> Biotina-amedita  
 <400> 22  
 gctgtctgca agtgacgact cgtacgagta gcgacagtcg acatcggta cgn 53

10 <210> 23  
 <211> 81  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

15 <223> Plantillas utilizadas en los ejemplos del 1 al 11

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (81)..(81)  
 20 <223> Fosforamidita de biotina (obtenida de Glen Research, catálogo # 10-1953-95)  
 <400> 23

gctgtctgca agtgacgact gatccagtgat catgcgtacc atcgaactcg tacgagtagc 60  
 gacagtcgac atcggtcacg n 81

25 <210> 24  
 <211> 47  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Bloque de construcción de oligos portan trisamina utilizados en el ejemplo 12

<220>  
 35 <221> característica\_misc  
 <222> (46)..(46)  
 <223> Carboxi-modificador C2 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1035-90)  
 <400> 24

40 gacctgtcga gcatccagct tcatgggaat tcctcgtcca caatgnt 47

<210> 25  
 <211> 52  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>

<223> Oligo de bloques de construcción utilizado en el ejemplo 13

50 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Modificador de tiol (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1053-95)

55 <400> 25  
 ncattgacct gtctgcbbtg tcagtcggta ctgtggaac gcggatcgac ct 52

<210> 26  
 <211> 62  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

# ES 2 571 933 T3

<223> Oligo de bloques de construcción utilizado en el ejemplo 13

<220>  
 <221> característica\_misc  
 5 <222> (1)..(1)  
 <223> Modificador de tiol (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1053-95)  
 <400> 26

```

ncattgacct gaaccatggt aagctgctg tcagtcggta ctacgactac gttcaggcaa      60
ga                                                                           62

```

10 <210> 27  
 <211> 81  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Oligo plantilla utilizado en el ejemplo 14

<220>  
 <221> característica\_misc  
 20 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforamidita de biotina (obtenida de Glen Research, Catalogue # 10-1953-95)  
 <400> 27

```

ntcttgctg aacgtagtcg taggtcgatc cgcgttacca gagctggatg ctcgacaggt      60
cccgatgcaa tccagaggtc g                                                  81

```

25 <210> 28  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20

35 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(1)  
 <223> modificador de aminos C6 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1039-90)

40 <400> 28  
 ngtaacacct ggacctgtcg agcatccagc t 31

<210> 29  
 <211> 23  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20

50 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (23)..(23)  
 <223> Carboxi-modificador C2 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1035-90)

55 <400> 29  
 tctggattgc atcgggagtt acn 23

60 <210> 30  
 <211> 56  
 <212> ADN

# ES 2 571 933 T3

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20  
 5  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Modificador de aminos C6 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1039-90)  
 10  
 <400> 30  
 ngtaactcct gtgtaagctg cctgtcagtc ggtactgacc tgtcgagcat ccagct 56  
 <210> 31  
 <211> 56  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20  
 20  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Modificador de aminos C6 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1039-90)  
 25  
 <400> 31  
 ngtaactgct gtgtaagctg cctgtcagtc ggtactgacc tgtcgagcat ccagct 56  
 <210> 32  
 <211> 56  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Modificador de aminos C6 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1039-90)  
 40  
 <400> 32  
 ngtaactggt gtgtaagctg cctgtcagtc ggtactgacc tgtcgagcat ccagct 56  
 <210> 33  
 <211> 76  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (76)..(76)  
 <223> Carboxi-modificador C2 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1035-90)  
 55  
 <400> 33  
 cgacctctgg attgcatcgg tcattttttt tttttttttt ttttggctga ctgtccgctg 60  
 aatgtgtcca gttacn 76

# ES 2 571 933 T3

<210> 34  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20

<220>

10 <221> característica\_misc  
<222> (1)..(1)  
<223> modificador de aminos C6 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1039-90)

<400> 34  
15 ngacctgtcg agcatccagc t 21

<210> 35  
<211> 21  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20

<220>

25 <221> característica\_misc  
<222> (21)..(21)  
<223> Carboxi-modificador C2 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1035-90)

<400> 35  
30 tctggattgc atcgggttac n 21

<210> 36  
<211> 21  
<212> ADN  
35 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20

<220>

40 <221> característica\_misc  
<222> (21)..(21)  
<223> Carboxi-modificador C2 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1035-90)

<400> 36  
45 tctggattgc atcggtttt n 21

<210> 37  
<211> 31  
<212> ADN  
50 <213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20

<220>

<221> característica\_misc  
<222> (1)..(1)  
60 <223> modificador de aminos 5 (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1905-90)

<400> 37  
ngtaacacct ggacctgtcg agcatccagc t 31

<210> 38  
65 <211> 31

## ES 2 571 933 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (31)..(31)  
10 <223> Carboxi-modificador C2 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1035-90)

<400> 38  
cgacctctgg attgcatcgg gcacggttac n 31

15 <210> 39  
<211> 31

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20

<220>  
25 <221> característica\_misc  
<222> (1)..(1)  
<223> modificador de aminos C6 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1039-90)

<400> 39  
30 nctggacagc tcgtaggtcg tttttttt t 31

<210> 40  
<211> 21  
<212> ADN  
35 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20

40 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (1)..(1)  
<223> Modificador de aminos C6 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1039-90)

45 <400> 40  
ngacctgtcg agcatccagc t 21

<210> 41  
<211> 21  
<212> ADN  
50 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20

55 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (1)..(1)  
<223> Carboxi-modificador C2 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1035-90)

60 <400> 41  
ngacctgtcg agcatccagc t 21

<210> 42  
65 <211> 27  
<212> ADN



# ES 2 571 933 T3

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20

5 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (27)..(27)  
<223> Modificador de aminos C6 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1039-90)

10 <400> 42  
cgacctctgg attgcatcgg tgttacn 27

15 <210> 43  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (26)..(26)

25 <223> modificador de aminos C6 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1039-90)

<400> 43  
acgactacgt tcaggcaaga gttacn 26

30 <210> 44  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (1)..(1)

40 <223> Carboxi-modificador C2 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1035-90)

<400> 44  
nctggacagc tcgtaggtcg tttttttt t 31

45 <210> 45  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (21)..(21)

55 <223> Modificador de aminos C6 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1039-90)

<400> 45  
cgacctctgg attgcatcgg n 21

60 <210> 46  
<211> 25  
<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

## ES 2 571 933 T3

- <220>  
<223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20
- 5 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (25)..(25)  
<223> modificador de aminos C6 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1039-90)<400> 46  
cgacctctgg attgcatcgg ttacn 25
- 10 <210> 47  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 15 <220>  
<223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20
- 20 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (1)..(1)  
<223> Modificador de aminos 5 (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1905-90)  
<400> 47  
ngtaacgacc tgtcgagcat ccagct 26
- 25 <210> 48  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>  
<223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20
- 35 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (1)..(1)  
<223> Modificador de aminos 5 (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1905-90)
- 40 <400> 48  
ngtaactgga cctgtcgagc atccagct 28
- 45 <210> 49  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>  
<223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20
- 55 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (26)..(26)  
<223> Carboxi-modificador C2 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1035-90)  
<400> 49  
acgactacgt tcaggcaaga gttacn 26
- 60 <210> 50  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 65 <220>  
<223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20

## ES 2 571 933 T3

- <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (28)..(28)  
5 <223> Carboxi-modificador C2 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1035-90)
- <400> 50  
acgactacgt tcaggcaaga gcgttacn 28
- 10 <210> 51  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 15 <220>  
<223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20
- <220>  
20 <221> característica\_misc  
<222> (31)..(31)  
<223> Carboxi-modificador C2 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1035-90)
- <400> 51  
25 acgactacgt tcaggcaaga gcacggttac n 31
- <210> 52  
<211> 28  
<212> ADN  
30 <213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> Oligos de ADN para los bloques de construcción utilizados en los ejemplos 15 al 20
- 35 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (28)..(28)  
<223> Carboxi-modificador C2 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1035-90)
- 40 <400> 52  
cgacctctgg attgcatcgg gcgttacn 28
- <210> 53  
<211> 31  
45 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> Bloque de construcción de oligos utilizado en los ejemplos 15 al 20
- 50 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (31)..(31)  
<223> Carboxi-modificador C2 dT (obtenido de Glen Research, catálogo # 10-1035-90)
- 55 <400> 54  
ctggaacgc ggatcgacct gcgttacn 28
- <210> 55  
60 <211> 80  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
65 <223> Bloque de construcción de oligos utilizado en los ejemplos 15 al 20

# ES 2 571 933 T3

	<400> 55	
	agctggatgc tcgacaggtc aggtcgatcc gcgttaccag tcttgccctga acgtagtcgt	60
5	ccgatgcaat ccagaggctcg	80
	<210> 56	
	<211> 87	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Bloque de construcción de oligos utilizado en los ejemplos 15 al 20	
15	<400> 56	
	agctggatgc tcgacaggtc aagtaacagg tcgatccgcg ttaccagtct tgccctgaacg	60
20	tagtcgtccg atgcaatcca gaggtcg	87
	<210> 57	
	<211> 36	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Bloque de construcción de oligos utilizado en los ejemplos 15 al 20	
30	<400> 57	
	cgacctacga gctgtccaga agtaacaggc cgatcc 36	
35	<210> 58	
	<211> 90	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Bloque de construcción de oligos utilizado en los ejemplos 15 al 20	
	<400> 58	
45	agctggatgc tcgacaggtc aagtaacacc aggtcgatcc gcgttaccag tcttgccctga	60
	acgtagtcgt ccgatgcaat ccagaggctcg	90
50	<210> 59	
	<211> 86	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Bloque de construcción de oligos utilizado en los ejemplos 15 al 20	
	<400> 59	
60	cgacctacga gctgtccaga agtaacaggc cgatccgcgt taccagtctt gccctgaacgt	60
	agtcgtctgg tcacgtggat ccttga	86
65		

# ES 2 571 933 T3

<210> 60  
<211> 81  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Bloque de construcción de oligos utilizado en los ejemplos 15 al 20

<400> 60

10

agctggatgc tgcacaggtc gaggtcgatc cgcgttacca gtcttgccctg aacgtagtcg 60

tccgatgcaa tccagaggtc g 81

15

<210> 61  
<211> 85  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20

<220>  
<223> Bloque de construcción de oligos utilizado en los ejemplos 15 al 20

<400> 61

25

cgacctacga gctgtccaga agtaactttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 60

tttttctggt cacgtggatc cttga 85

30

35

40

45

50

55

60

65

**Reivindicaciones**

1. Una biblioteca de diferentes complejos bifuncionales, donde cada complejo bifuncional comprende a una molécula portada que está adherida covalentemente a una plantilla de nucleótidos y que está adherida covalentemente a una plantilla complementaria de nucleótidos,

Donde el número de diferentes complejos bifuncionales en la biblioteca es de por lo menos  $10^3$ ,

Donde las moléculas portadas son seleccionadas de un grupo que consiste de policiclos alifáticos; policiclos aromáticos; poliheterociclos; hidrocarburos de cadena abierta monofuncionales, difuncionales, o trifuncionales; carbociclos no aromáticos monofuncionales, difuncionales o trifuncionales; hidrocarburos monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos; hidrocarburos policíclicos conectados; heterociclos no aromáticos monofuncionales, difuncionales, o trifuncionales; heterociclos monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos; heterociclos policíclicos conectados; carbociclos aromáticos monofuncionales, difuncionales o trifuncionales; carbociclos aromáticos monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos; heterociclos monofuncionales, difuncionales o trifuncionales; heterociclos monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos; quelatos; fullerenos; esteroides; y análogos de ciclosporina, y

Donde una plantilla de nucleótidos enlazada a una molécula portada permite una identificación de la molécula portada por medio de una determinación de la secuencia de nucleótidos de la plantilla de nucleótidos.

2. La biblioteca de acuerdo a la reivindicación 1 donde un ligando conocido que tienen una afinidad para con una molécula objetivo forma parte de las moléculas portadas en la biblioteca, donde dicho ligando es capaz de guiar a las moléculas cortadas a una parte definida de la molécula objetivo.

3. Un método para seleccionar moléculas portadas de la biblioteca de acuerdo a la reivindicación 1, donde dicho método comprende los pasos de:

i) Suministrar una biblioteca de acuerdo a la reivindicación 1, donde un ligando conocido que tienen una afinidad para con una molécula objetivo forma parte de las moléculas portadas de la biblioteca,

ii) Suministrar una molécula objetivo de interés,

iii) Guiar a las moléculas portadas a una parte definida de la molécula objetivo de interés, y

iv) Seleccionar moléculas portadas que se enlazan a la parte de la molécula objetivo que tiene una afinidad para con el ligando.

4. Un método para incrementar la afinidad de una molécula objetivo para con un ligando que tiene una función biológica deseable, pero una potencia demasiado baja para enlazarse a la molécula objetivo cuando no forma parte de una molécula portada, donde dicho método comprende los pasos de:

i) Suministrar a la biblioteca de acuerdo a la reivindicación uno, y

ii) Realizar el método de la reivindicación 3 para seleccionar a las moléculas portadas,

iii) Donde dicho método resulta en la selección de ligandos que tienen una función biológica deseable, pero muy baja potencia para enlazarse a una molécula objetivo cuando no forman parte de las moléculas portadas de la biblioteca de acuerdo a la reivindicación 1.

FIGURA 1

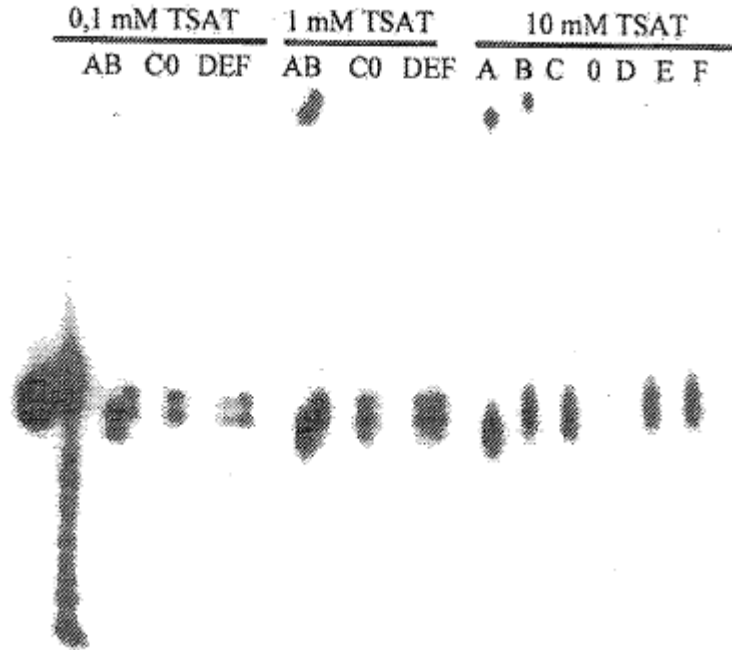


FIGURA 2

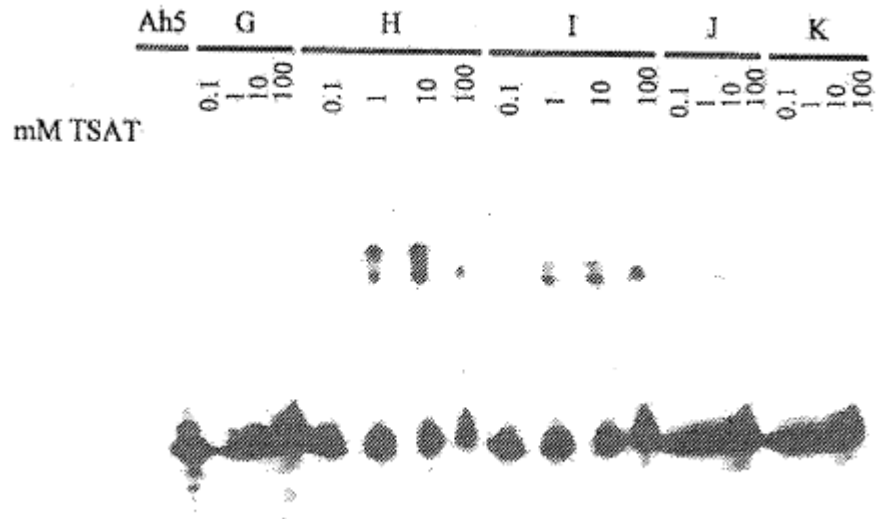




FIGURA 3

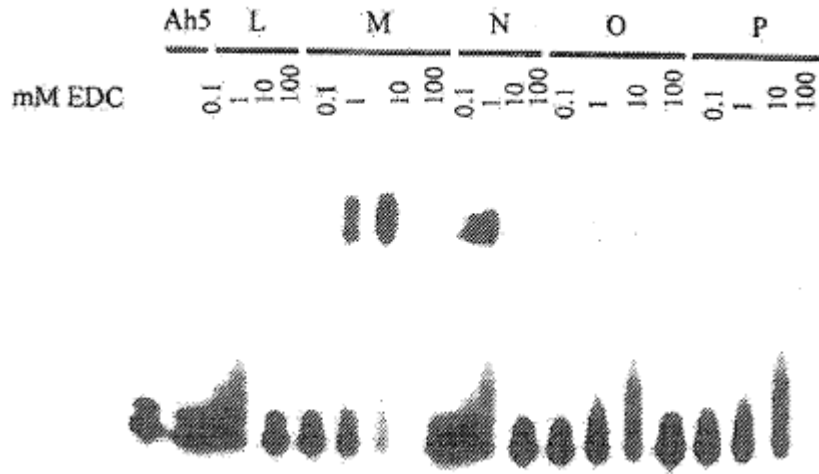


FIGURA 4

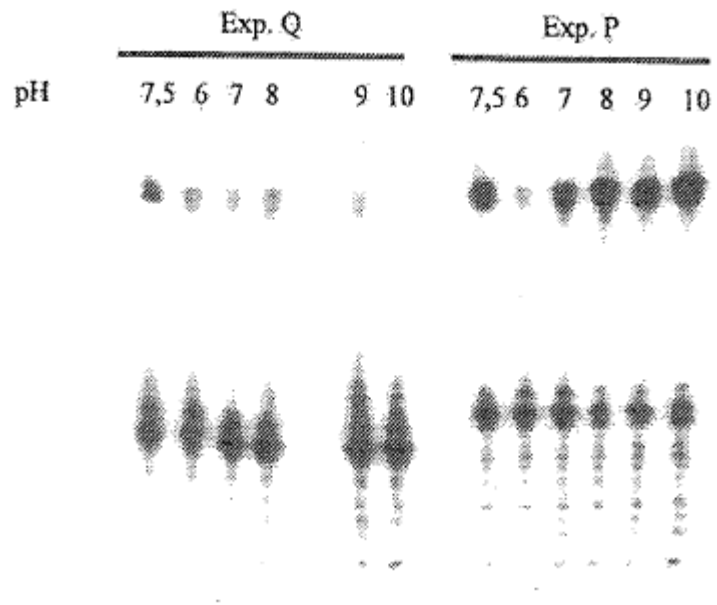


FIGURA 5

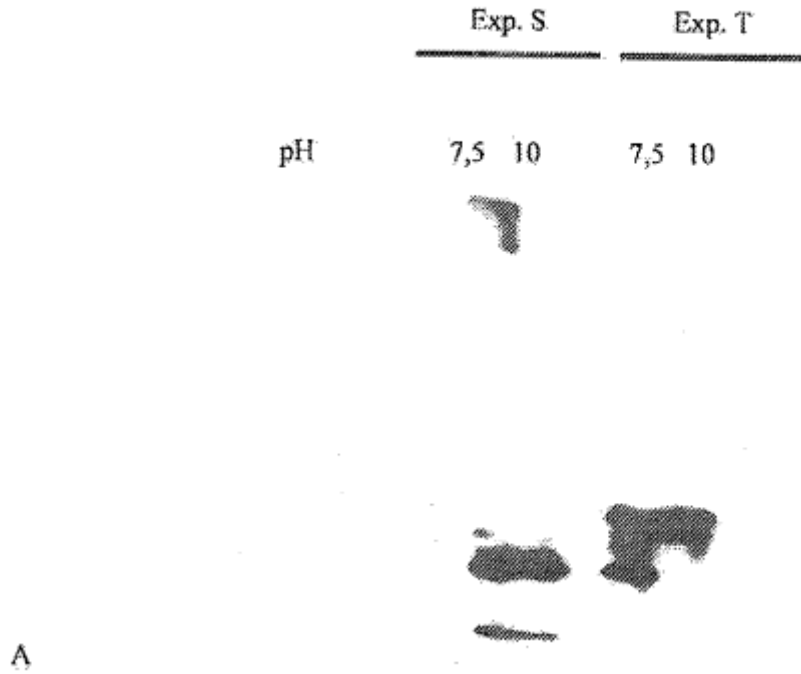


FIGURA 6

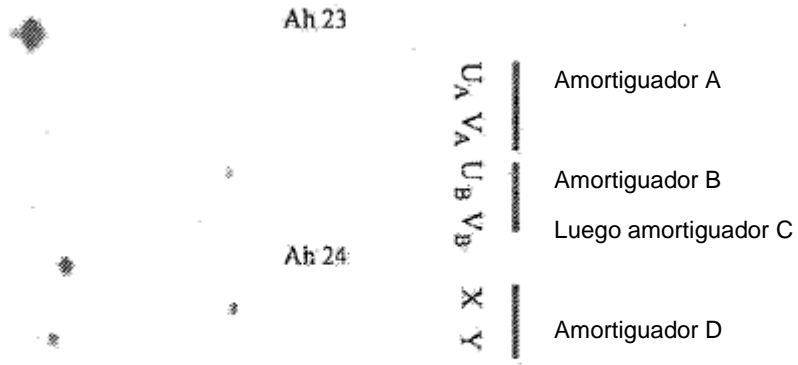


FIGURA 7

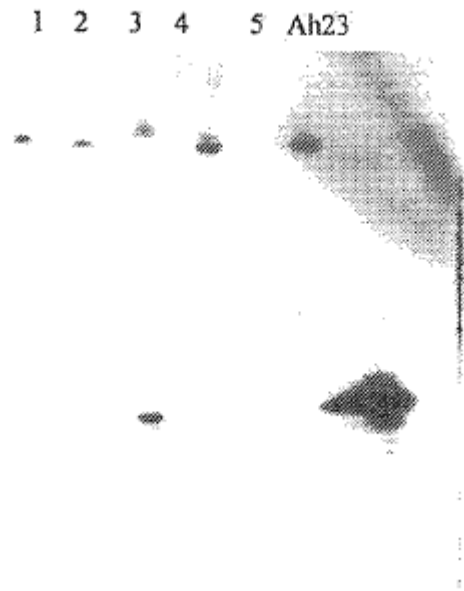


FIGURA 8

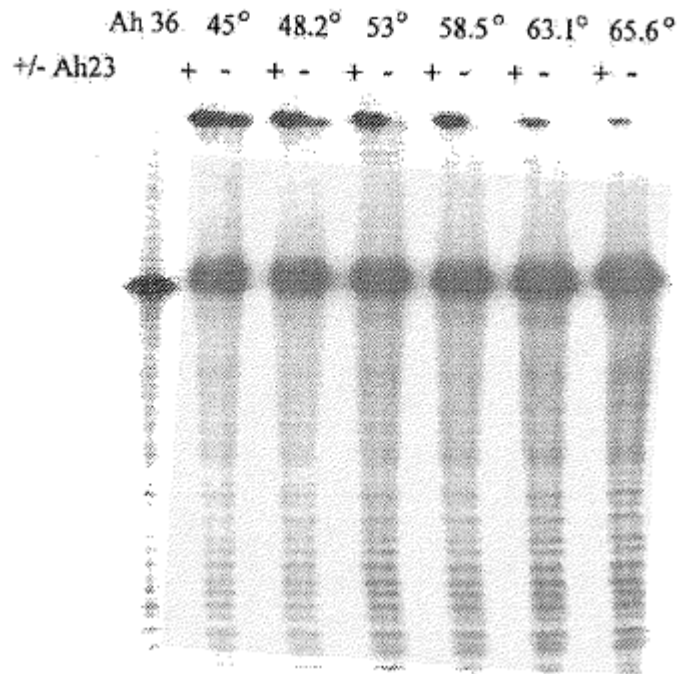


FIGURA 9A

Temperatura de incubación

+/- Ah38

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12  
+- +- +- +- +- +- +- +- +- +- +- +-

\* \* \* \*



--- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --

FIGURA 9B

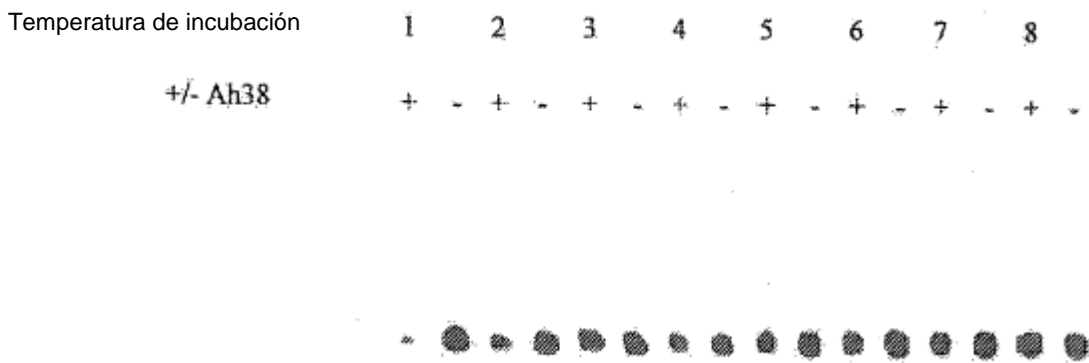




FIGURA 10A

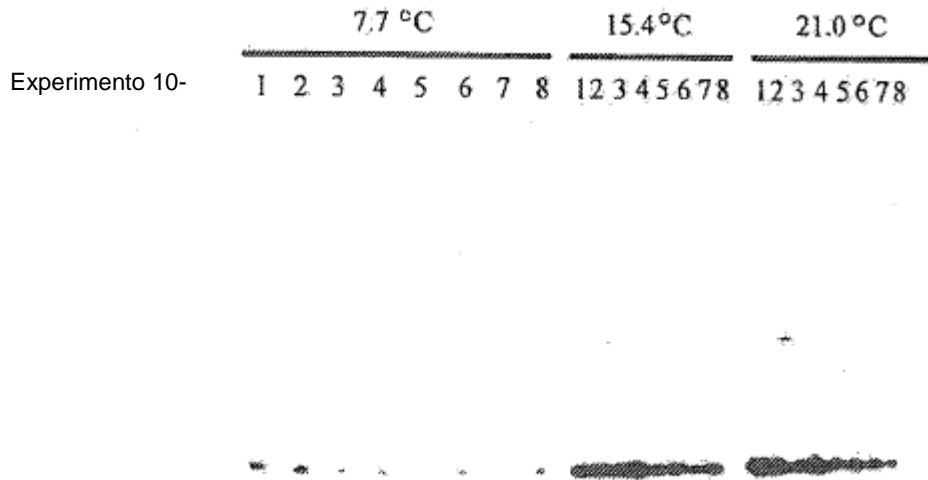


FIGURA 10B

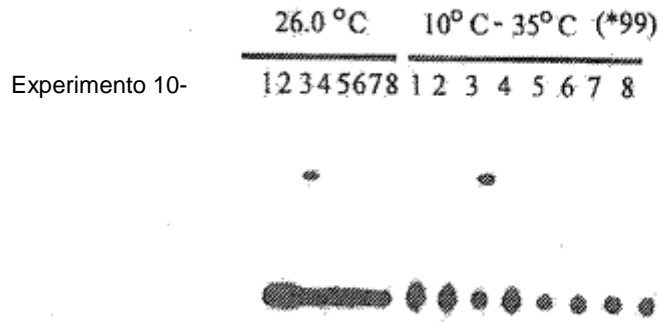


FIGURA 11

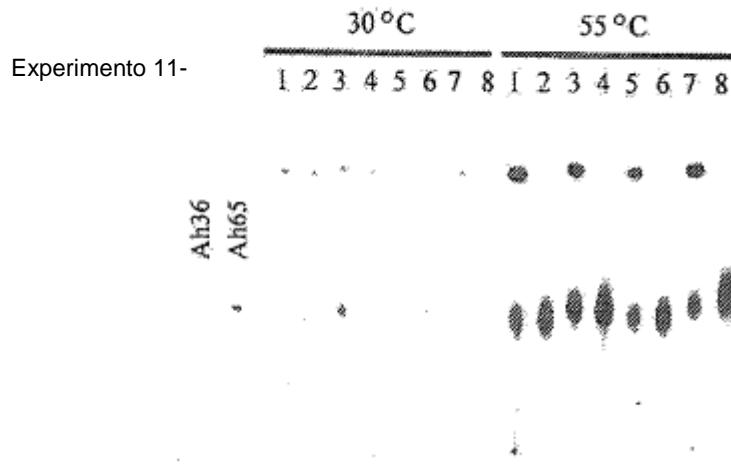


Fig. 12

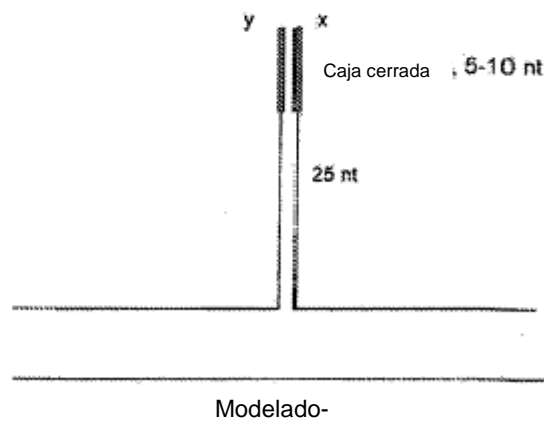


FIGURA 13A-1

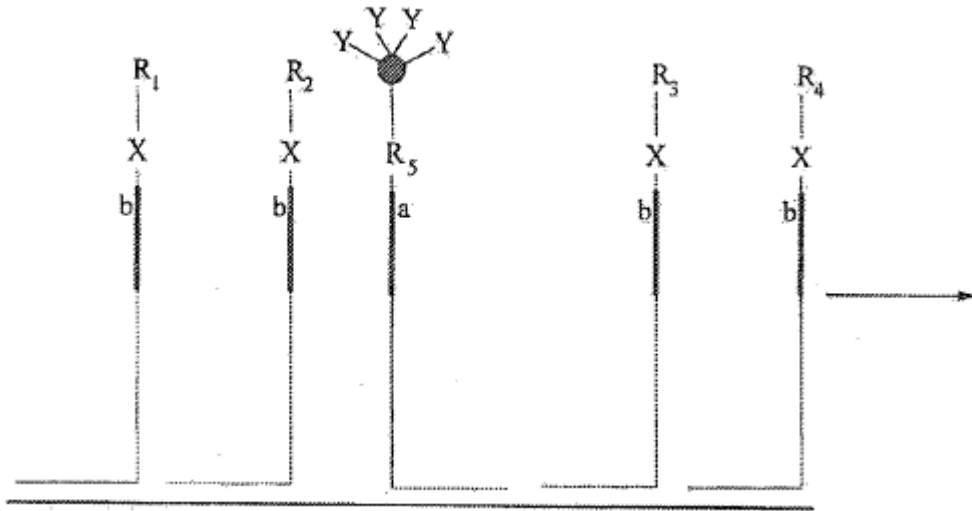


FIGURA 13A-2

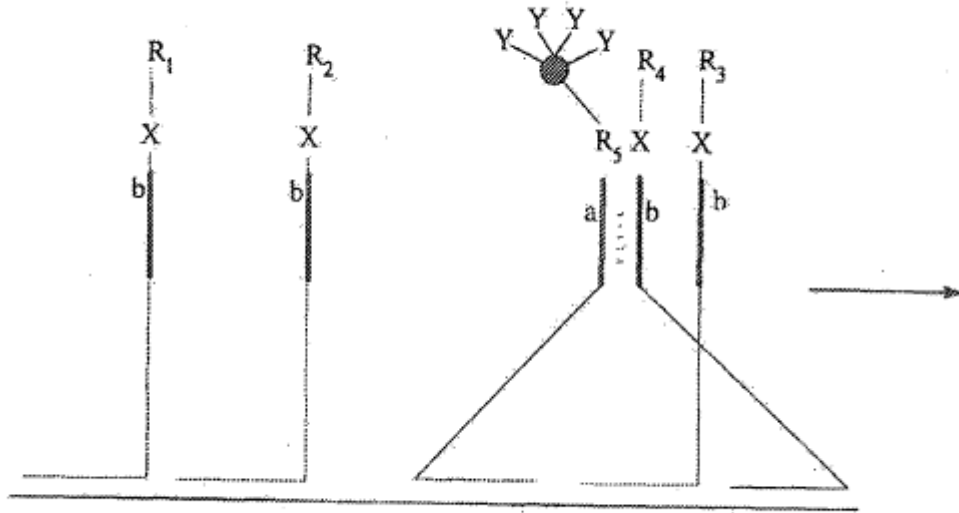


FIGURA 13-A3

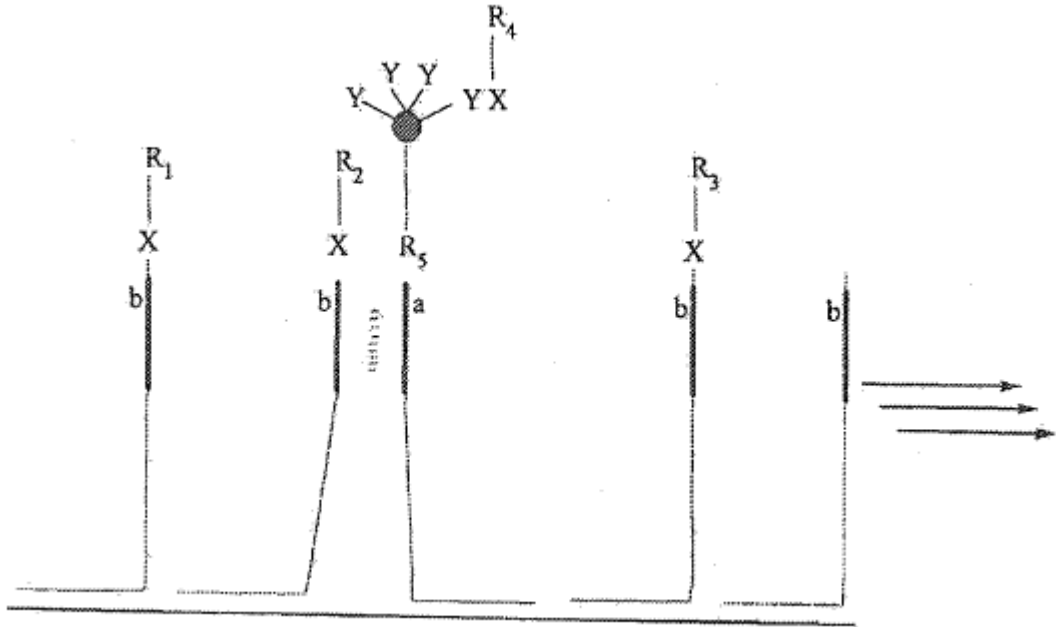


FIGURA 13-A4

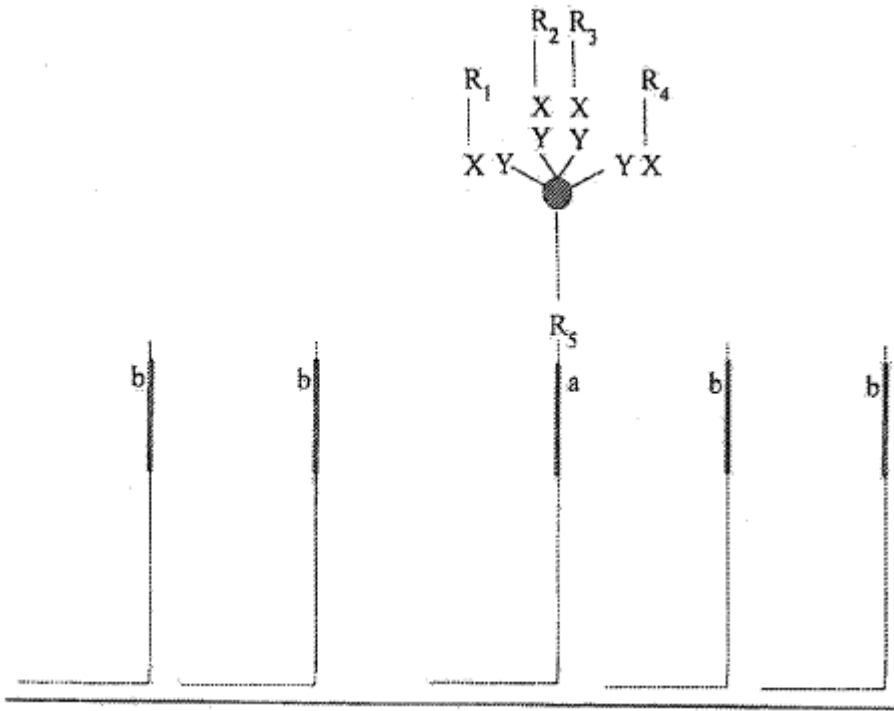




FIGURA 13-B1

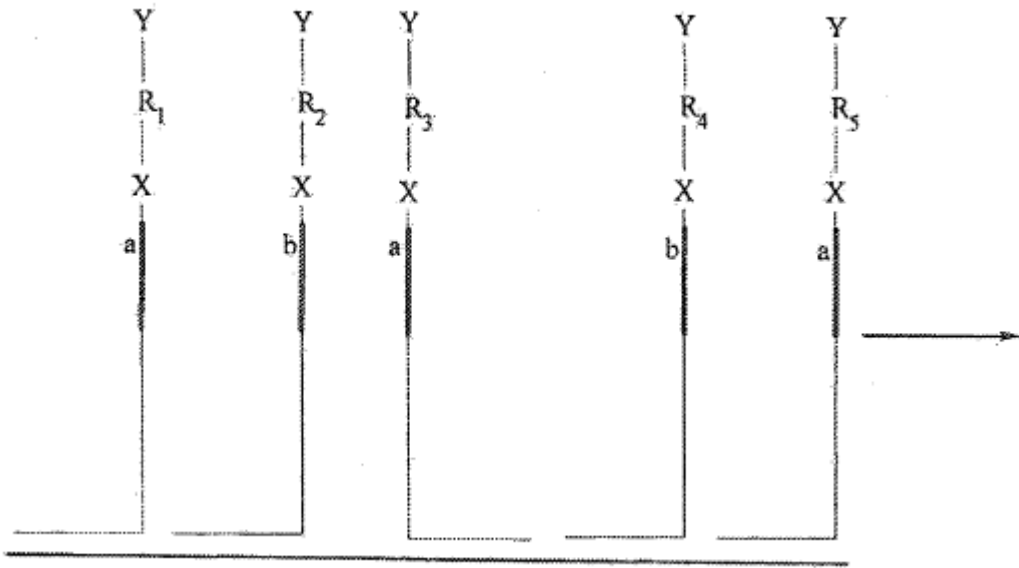


FIGURA 13-B2

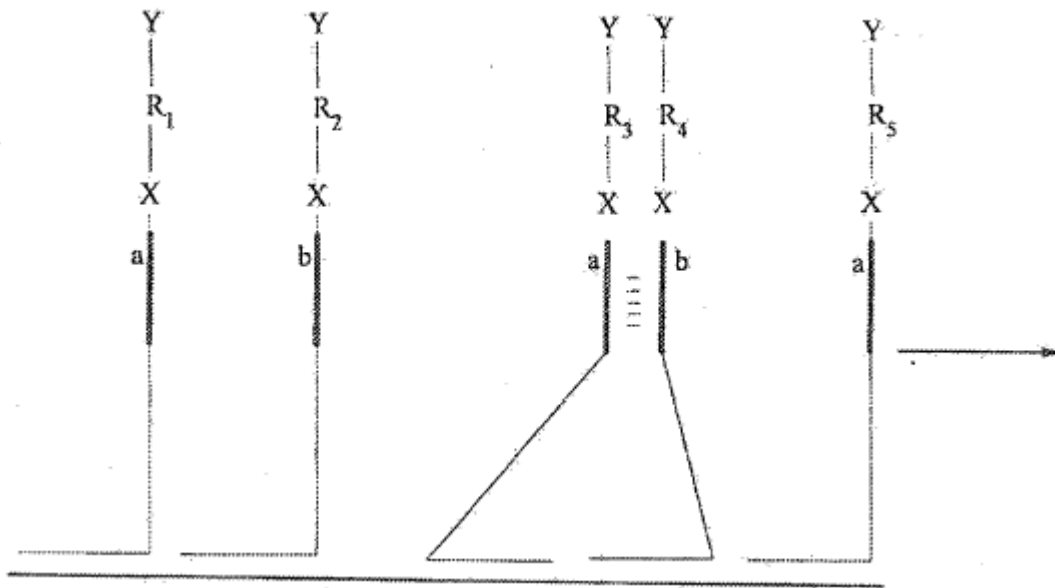


FIGURA 13-B3

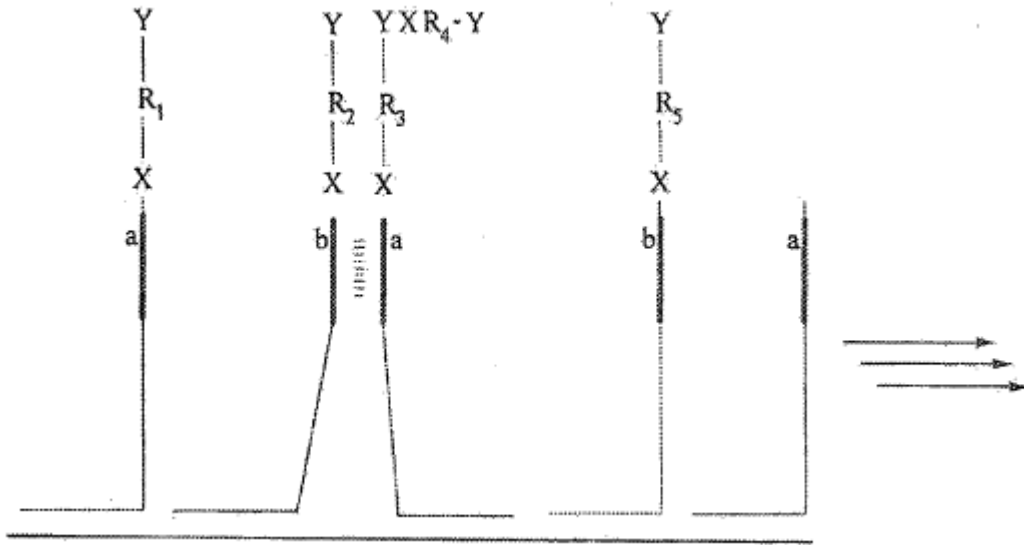


FIGURA 13-B4

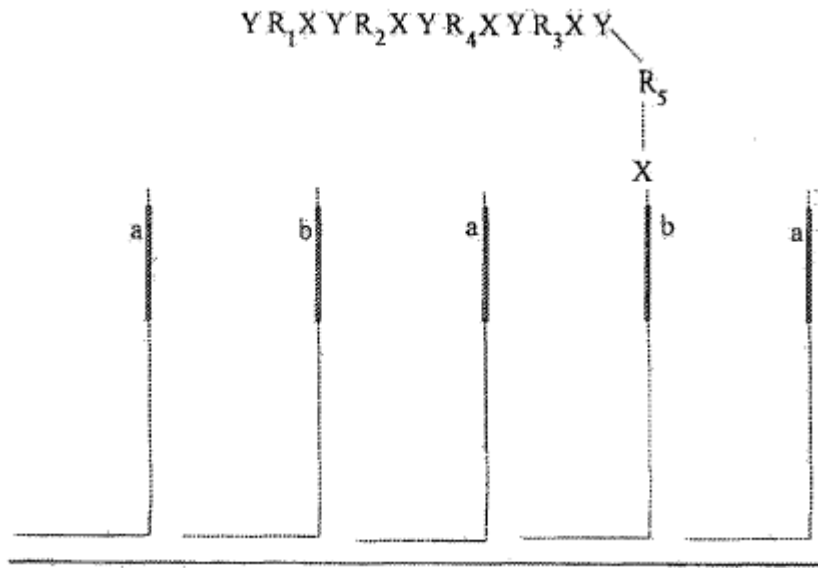


Figura 14 El principio de la caja cerrada

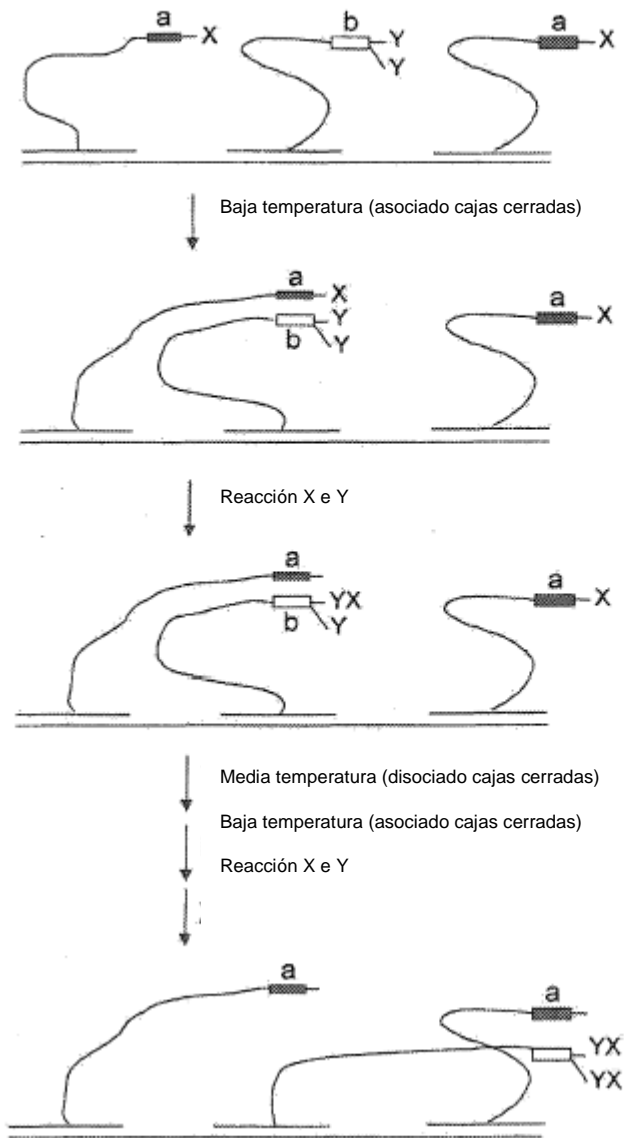


FIGURA 15

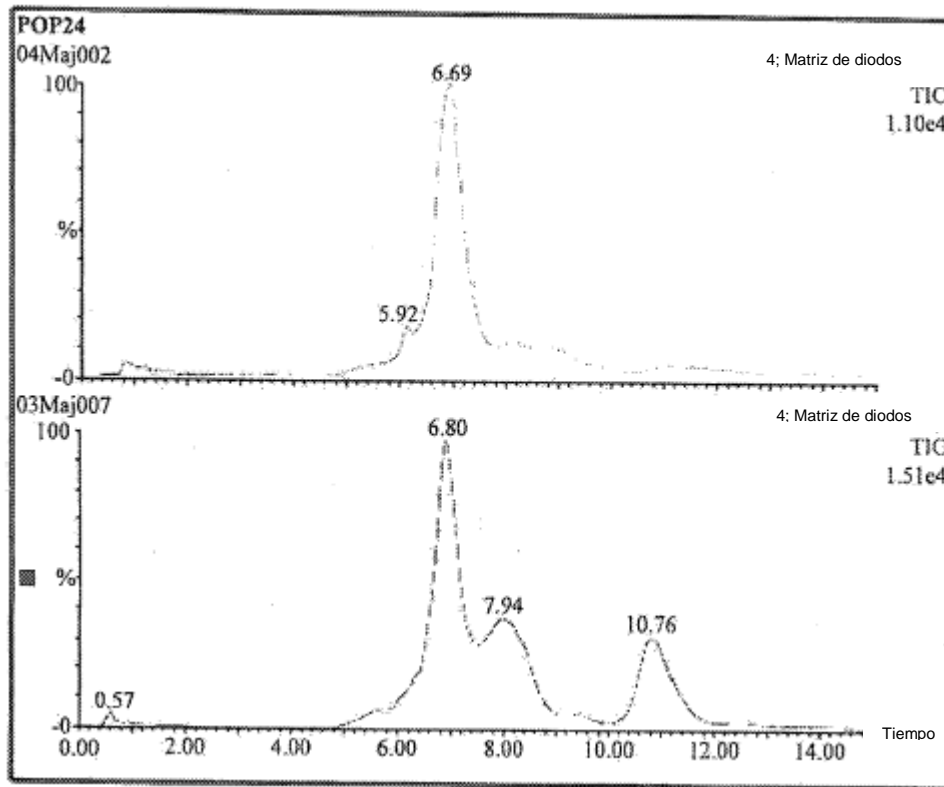
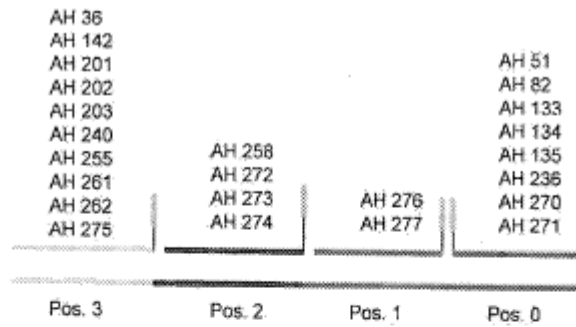


Fig. 16

Configuración A



Configuración B

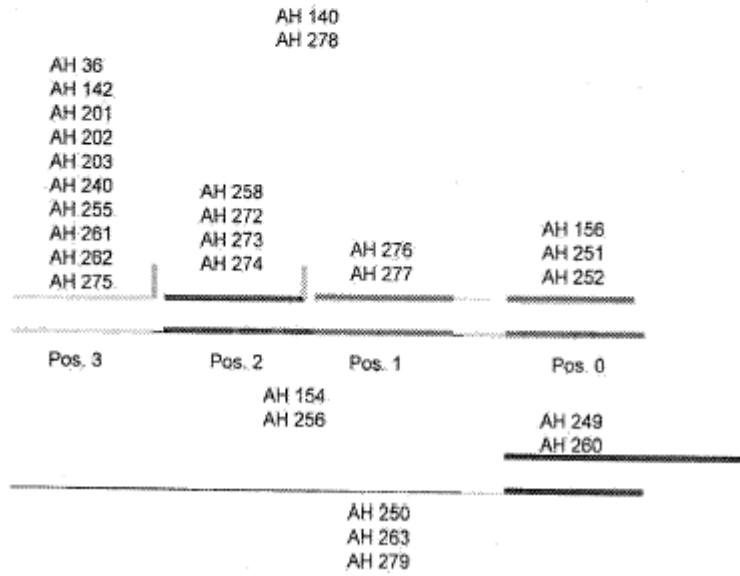


Fig. 17

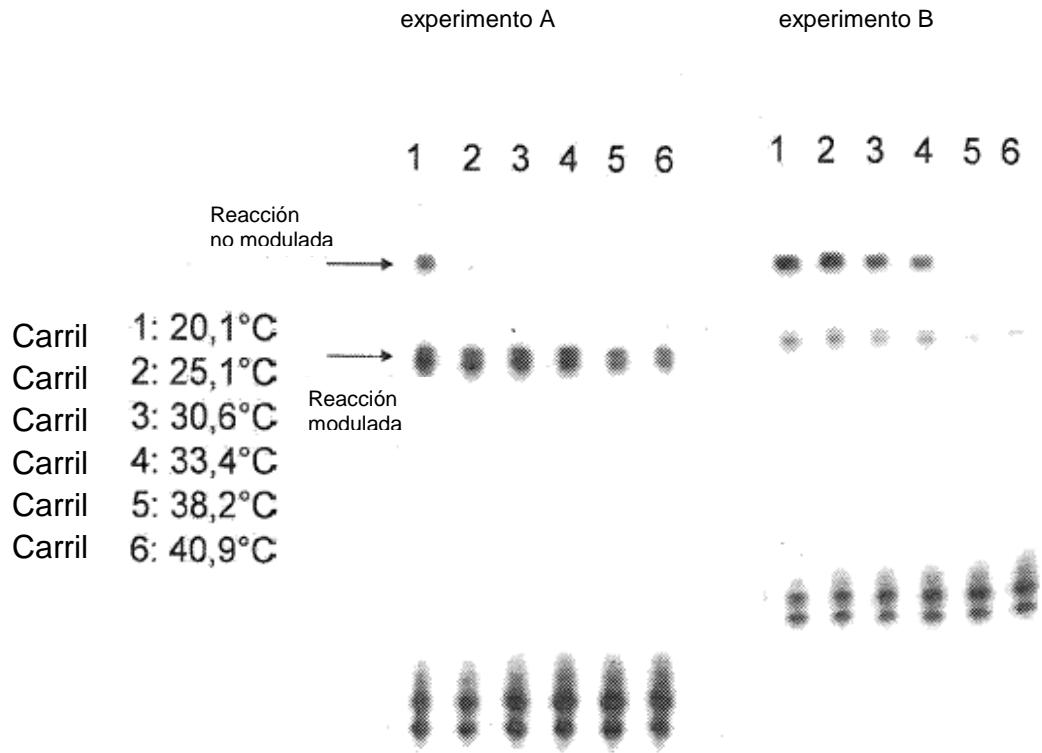




Fig. 18

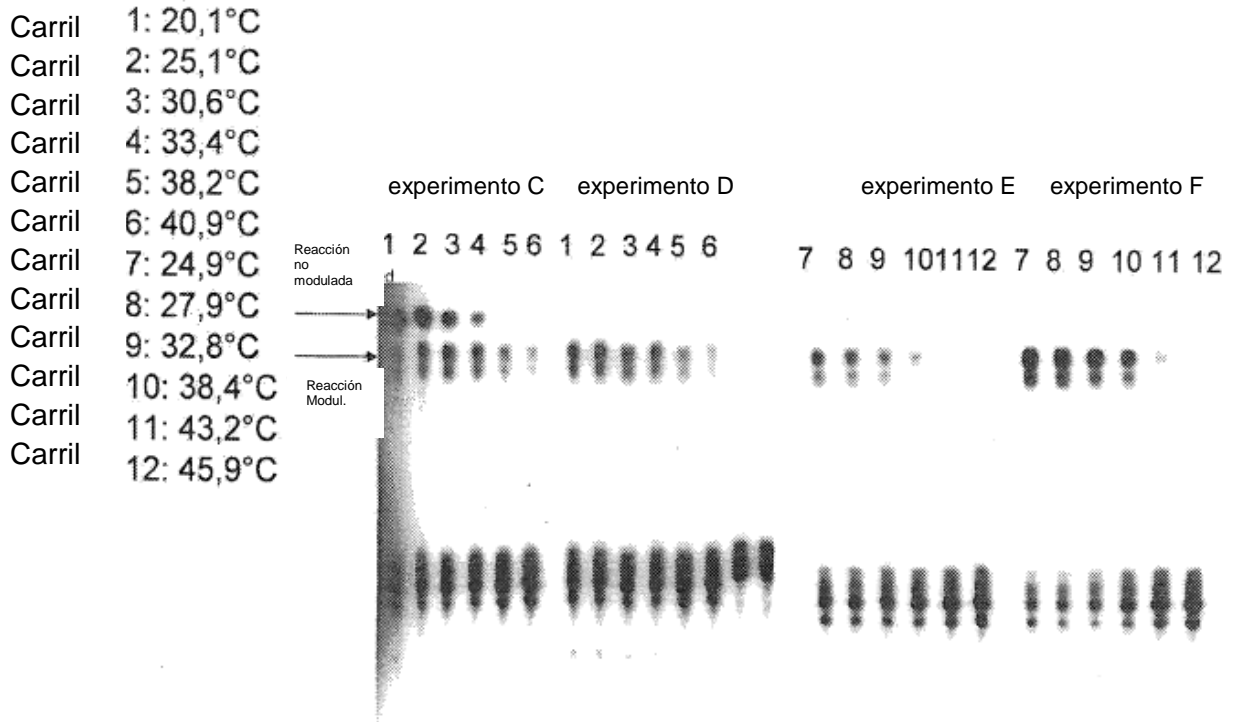


Fig. 19

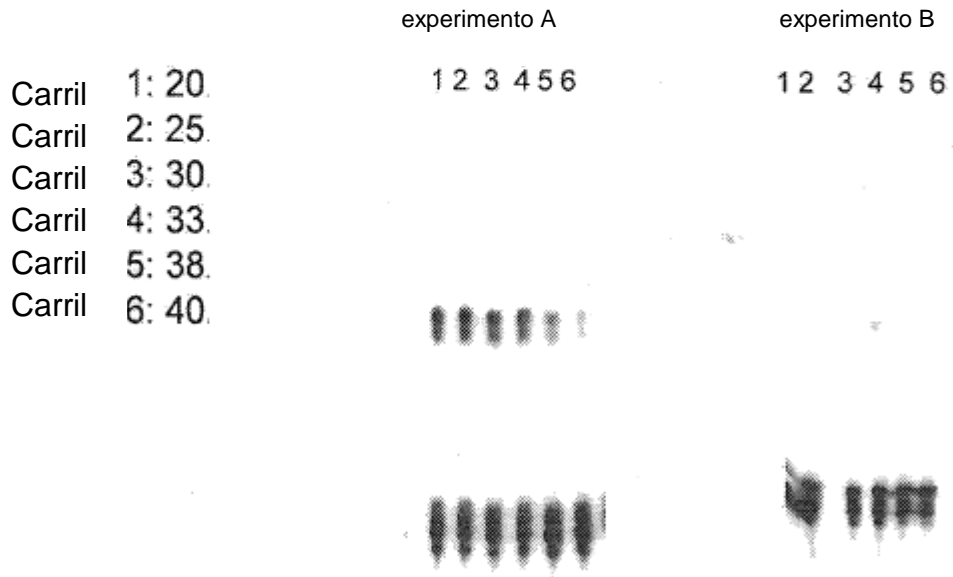


Fig. 20

Carril 1: 24,9°C  
Carril 2: 27,9°C  
Carril 3: 32,8°C  
Carril 4: 38,4°C  
Carril 5: 43,2°C  
Carril 6: 45,9°C

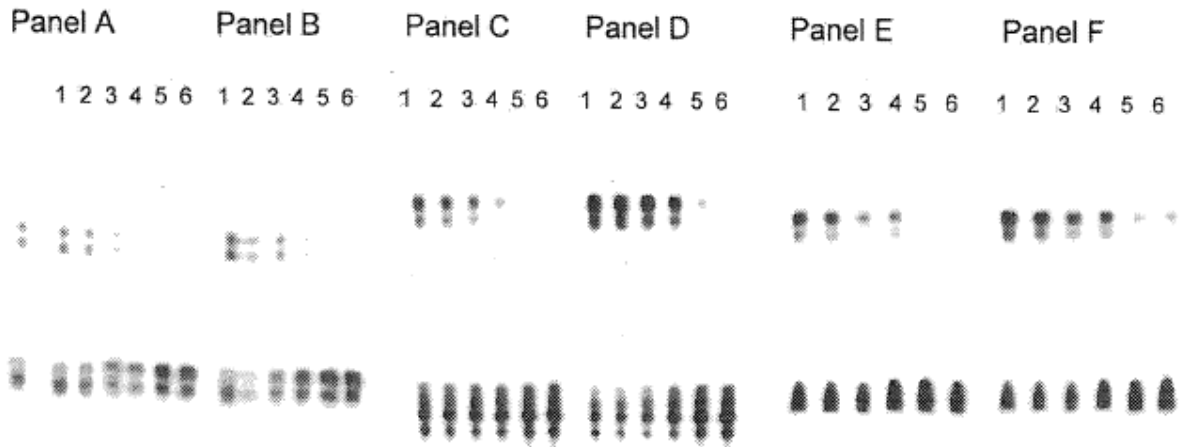


Fig. 21

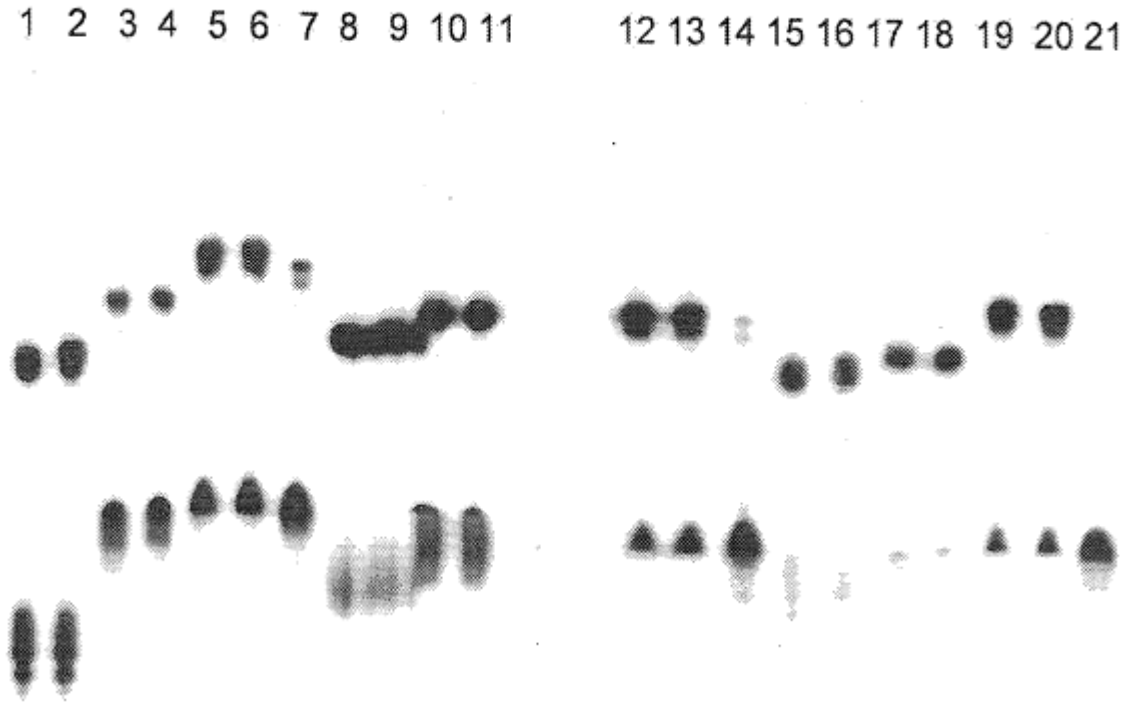


Fig. 22

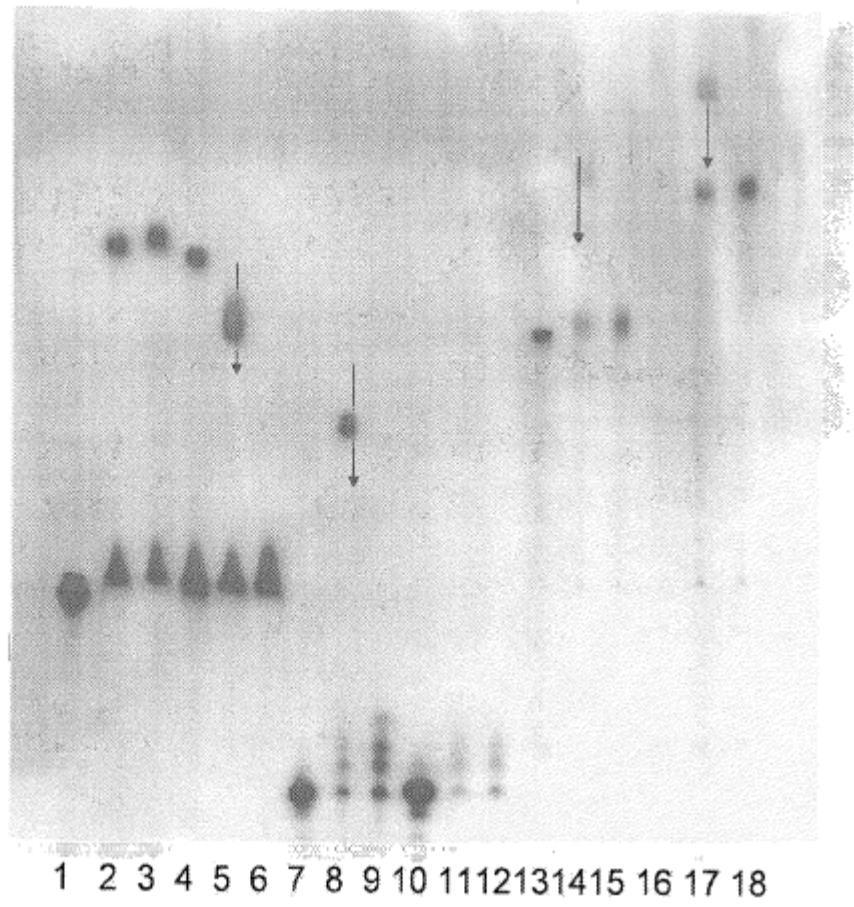


Fig. 23

- |           |            |
|-----------|------------|
| 1: 9,9°C  | 7: 33°C    |
| 2: 15°C   | 8: 35,3°C  |
| 3: 17,6°C | 9: 40,7°C  |
| 4: 23,3°C | 10: 43,4°C |
| 5: 28,3°C | 11: 46,0°C |
| 6: 31,7°C | 12: 50,8°C |

experimento A

experimento B

experimento c

experimento d

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12  
AB AB AB AB AB AB AB AB AB AB AB AB

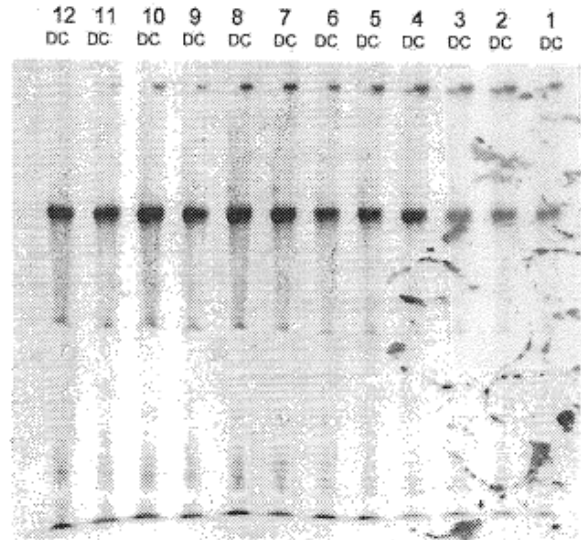


Fig. 24

- |           |            |
|-----------|------------|
| 1: 9,9°C  | 7: 33°C    |
| 2: 15°C   | 8: 35,3°C  |
| 3: 17,6°C | 9: 40,7°C  |
| 4: 23,3°C | 10: 43,4°C |
| 5: 28,3°C | 11: 46,0°C |
| 6: 31,7°C | 12: 50,8°C |

experimento E    experimento F

experimento G    experimento H

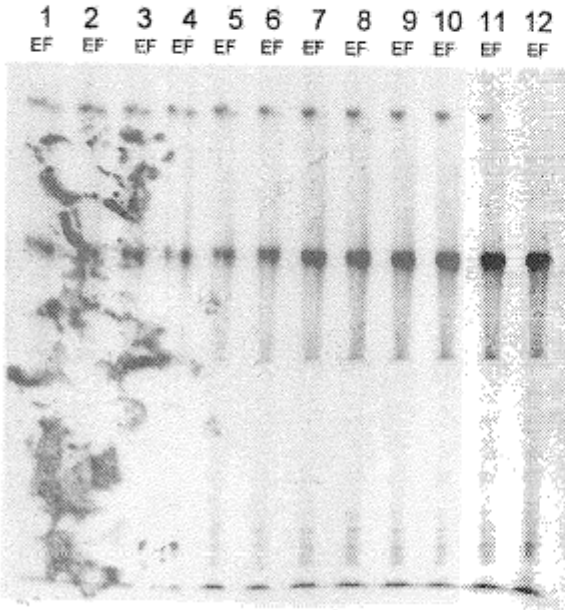


Fig. 25

