(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 572 203**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)
C40B 40/06 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2003** **E 03766117 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016** **EP 1539980**

(54) Título: **Biblioteca de complejos que comprende pequeñas moléculas no péptidas y oligonucleótidos de doble cadena para identificación de las moléculas**

(30) Prioridad:

01.08.2002 DK 200201171
01.08.2002 US 399692 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.05.2016

(73) Titular/es:

NUEVOLUTION A/S (100.0%)
RØNNEGADE 8, 5TH FLOOR
2100 COPENHAGEN, DK

(72) Inventor/es:

PEDERSEN, HENRIK

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 572 203 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).

Biblioteca de complejos que comprende pequeñas moléculas no péptidas y oligonucleótidos de doble cadena para identificación de las moléculas

Descripción

Ámbito técnico

[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento para la generación de una biblioteca de complejos. Cada complejo de la biblioteca comprende una molécula moldeada unida al molde que dirige la síntesis de la misma. La biblioteca de la invención es útil en la búsqueda de nuevos compuestos activos biológicos, como los fármacos.

Antecedentes de la técnica

[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] DE19646372 (Evotec Biosystems CMBH; 19 de junio 1997) se refiere a un compuesto que comprende una unidad estructural A (genotipo) y una unidad estructural B adicional (fenotipo), en el que el genotipo y el fenotipo están permanentemente unidos entre sí, donde la unidad estructural A muestra, además de otras regiones, la región codificante \-1 para la molécula polimérica \-1 construida a partir de unidades de aminoácidos y las regiones codificantes son traducibles, y además se encuentra una primera subunidad estructural (terminador) en una sección no traducida de la unidad estructural A, que une de forma permanente la unidad estructural B como un producto de traducción de estructural A a la unidad estructural A.

[0007] El documento WO 00/61775 (Sergeev Pavel; 19 de octubre de 2000) se refiere a un procedimiento de síntesis de sustancias biológicamente activas de determinada estructura directamente en las células de organismos vivos que contienen moléculas específicas de ARN o ADN de determinada secuencia. El procedimiento se basa en

la hibridación de dos o más oligómeros unidos con precursores biológicamente inactivos de sustancias biológicamente activas para ARN o ADN específico in vivo en las células de organismos vivos.

[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.

[0009] Keiler et al. (Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA; Science; Estados Unidos, 16 de febrero de 1996, vol. 271, núm. 5251, p. 990-993) revela que las variantes del represor lambda y citocromo b562 traducidas a partir de los ARN mensajeros sin codones de parada se modificaron mediante la adición de carboxilo terminal de una marca de péptido codificado por ssrA y posteriormente degradadas por proteasas específicas del terminal carboxilo presentes en el citoplasma y el periplasma de Escherichia coli.

[0010] El documento WO98/31700 (Gen Hospital Corp; 23 de julio de 1998) se refiere a los procedimientos y reagentes para la selección de moléculas de proteína que hacen uso de fusiones de ADN-proteína.

[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.

[0012] WO00/32823 (Phylos; 8 de junio de 2000) se refiere a procedimientos para proteínas etiquetadas de forma covalente con sus secuencias de ADN de codificación.
Estas fusiones de ADN-proteína se pueden utilizar en técnicas de evolución y reconocimiento molecular.

[0013] Kurz et al. (cDNA - protein fusions: covalent protein - gene conjugates for the in vitro selection of peptides and proteins", Chembiochem - European Journal of Chemical Biology, vol. 2, núm. 9, 3 de septiembre de 2001, p. 666-672) se refiere a un método para la síntesis de fusiones de ADNc-proteína covalente para aplicaciones de presentación en proteína. Se desarrolló un molde de ARNm ramificado que transporta un aceptador de peptidil y un cebador de transcripción inversa en el 3' final.

[0014] Noren et al. (A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into protein; Science American Association for the Advancement of Sciente; vol. 244, 14 de abril de 1989, p. 182-188) se refiere a un procedimiento que hace que sea posible incorporar aminoácidos artificiales a las proteínas específicamente en el sitio. Los aminoácidos sintéticos se incorporan en la enzima beta-lactamasa mediante el uso de un ARN de transferencia supresor químicamente acilado que inserta el aminoácido en respuesta a un codón de parada sustituido por el codón que codifica el residuo de interés.

[0015] El documento W090/05785 (Univ. California; 31 de mayo de 1990) se refiere a los procedimientos para la producción de proteínas, con un contenido de aminoácidos artificiales en sitios específicos. Los métodos pueden utilizar ARNt de aminoacil modificado capaz de polimerizar un aminoácido no natural deseado en los codones únicos dentro de una secuencia de ARNm.

[0016] Yamane et al. (Discrimination between D- and L-tyrosyl transfer ribonucleic acids in peptide chain elongation; Biochemistry; 8 de diciembre de 1981, vol. 20, núm. 25, p. 7059-7064) revela que D-Tyr-ARNt puede formar parte en la formación de un enlace peptídico con N-AcPhe-ARNt en los ribosomas programados con el hexanucleótido UUUUAC.

[0017] Bain et al. (Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide"; Journal of the American Chemical Society, vol. 111, núm. 20, 1989, p. 8013-8014) se refiere a métodos para la incorporación específica del sitio de un aminoácido no natural en polipéptidos.

[0018] La presente invención tiene por objeto obtener una biblioteca de compuestos que no solo se codifiquen por una marca adecuada unida a cada compuesto, sino que también se dirijan. La síntesis dirigida de los compuestos de la biblioteca permite la síntesis renovada de moléculas moldeadas tras una ronda de selección. Además, la presente invención aumenta la probabilidad de conexión de entidades moleculares que aparecen finalmente en la molécula moldeada debido a una mayor concentración local de los grupos reactivos implicados en la formación de la conexión.

Revelación de la invención

[0019] La presente invención se refiere a un procedimiento para la generación de una biblioteca de complejos que comprende moléculas moldeadas, dicho procedimiento comprende los pasos de

a) proporcionar una pluralidad de moldes distintos que comprende una serie de regiones codificantes y un grupo reactivo, en el que cada región codificante de un molde específico precisa un codón único,
b) proporcionar una pluralidad de componentes básicos distintos, cada componente comprende un anticodón, una entidad funcional y un enlace que conecta el anticodón y la entidad funcional, en el que el anticodón de cada componente complementa a un codón único de un molde, y la entidad funcional comprende al menos un grupo reactivo.
c) poner en contacto la pluralidad de distintos moldes con un subconjunto de la pluralidad de distintos componentes básicos, dicho subconjunto cuenta con anticodones que complementan el codón único de una región codificante específica, dicho contacto se realiza en condiciones que permitan una hibridación específica de los anticodones a los codones únicos de los moldes,
d) reaccionar el grupo reactivo del molde y el grupo reactivo del componente para obtener una conexión química,
e) poner en contacto en condiciones que permitan una hibridación específica a la pluralidad de distintos moldes que albergan las moléculas moldeadas nacientes con un subconjunto adicional de la pluralidad de componentes básicos, dicho subconjunto cuenta con anticodones complementarios a los codones únicos de una región codificante en la proximidad de la región codificante que alberga las moléculas moldeadas nacientes,
f) permitir que las entidades funcionales del subconjunto de nuevos componentes básicos formen una conexión química para las moléculas moldeadas nacientes,
g) opcionalmente, partir uno o más de los enlacees, siempre y cuando al menos un enlace siga conectado a la molécula moldeada naciente con el molde que dirige la síntesis del mismo,
h) repetir opcionalmente los pasos e) a g),
i) obtener una molécula moldeada unida a través del enlace de uno o más componentes básicos para el molde que dirige la síntesis de los mismos.

[0020] La presente invención permite una síntesis moldeada de múltiples etapas de una biblioteca de moléculas sin la necesidad de una etapa de división, que es laboriosa y consume mucho tiempo, del procedimiento de división y mezcla tradicional. El procedimiento proporciona además la posibilidad de acercar las entidades funcionales de componentes básicos, permitiendo así la conexión facilitada de entidades funcionales en las inmediaciones de ambas.
Al ponerlo en las proximidades de los componentes básicos proporciona un aumento de la concentración local de los grupos químicos activos, lo que aumenta la probabilidad de que dos grupos reactivos estarán tan cerca que se producirá una reacción.

[0021] Los distintos moldes de la presente invención están construidos, a grandes rasgos, para seguir un esquema general. Según el esquema, en el molde se proporcionan una serie de regiones codificantes. A su vez, cada una de las regiones codificantes especifica uno o más codones únicos. Por lo tanto, un molde específico comprende un número determinado de codones únicos. La pluralidad de moldes se puede, en su conjunto, caracterizar por ser una biblioteca que comprende la suma total de las distintas combinaciones de codones únicos posibles, o cualquier subconjunto de las mismas. Las regiones codificantes están bien colocadas en una secuencia lineal, de modo que las regiones codificantes individuales están colocadas inmediatamente la una junto a la otra. En algunas realizaciones, puede resultar ventajoso utilizar un molde ramificado para asegurar la proximidad de grupos reactivos, la introducción de catalizadores en las inmediaciones de los grupos reactivos o la introducción como tercer reactante.

[0022] Además de las regiones codificantes, los moldes utilizados en la presente invención incluyen un grupo reactivo. El grupo reactivo compuesto por el molde puede ser unirse a este de forma covalente o no covalente. La unión covalente puede ser preferible cuando la molécula moldeada tenga que unirse al molde de manera efectiva, ya que un enlace covalente permitirá la selección de afinidad utilizando condiciones más duras. La unión covalente del grupo reactivo se puede realizar en una región terminal del molde o en una región central del mismo.
En un aspecto de la invención, el grupo reactivo no se une de forma covalente al molde utilizando un elemento complementario hibridado al molde. Más concretamente, es preferible que el grupo reactivo del molde sea parte de un componente básico hibridado al molde.

[0023] Las regiones codificantes pueden estar espaciadas con una región de espaciadora adecuada. La región espaciadora puede ser un identificador para la región codificante de lo que puede ser una región que no transporta ninguna información, pero que sirve para acercar las entidades funcionales a la proximidad deseada o para proporcionar al molde una característica física deseada, como una conexión rígida de las regiones codificantes, o como alternativa, una conexión flexible entre dos regiones codificantes.

[0024] El molde puede comprender regiones flanqueantes. Una de las regiones flanqueantes puede, en un aspecto de la invención, servir para inmovilizar el molde a una superficie de un apoyo sólida. En otro aspecto de la invención, la región flanqueante puede abarcar un grupo de señales, como un fluoróforo o un grupo radioactivo, para permitir una detección directa de la presencia del molde.

[0025] La pluralidad de moldes utilizada en la presente invención puede estar representada en una realización por la fórmula general:

F-(región codificante 1)-(S1)-(región codificante 2)-(S2)...-(región codificante n)-(Sn)-F'

[0026] En el que
Cada región codificante 1 a través de la región codificante n de manera independiente especifica codones únicos m,
F and F' son regiones flanqueantes opcionales,
S1 a Sn son grupos espaciadores opcionales,
n es un entero de por lo menos 2, y
m es un entero de por lo menos 1.

[0027] Los codones únicos de los moldes se componen preferiblemente de una secuencia de monómeros de ácido nucleico, como los nucleótidos. Cada codón es único en el sentido de que dentro de la misma región codificante no hay otros codones que tengan una secuencia y una longitud idéntica de monómeros de ácido nucleico. Preferiblemente, un codón único no tiene una secuencia correspondiente en ningún lugar de la pluralidad de moldes. Para evitar la hibridación entre los moldes individuales también es deseable diseñar cada uno de los codones únicos de tal manera que la secuencia complementaria de los mismos no exista en ningún otro molde.

[0028] El número de regiones codificantes puede seleccionarse en función de, entre otros, el número de compuestos moldeados finales deseados, los componentes básicos disponibles y la estructura prevista del compuesto moldeado. De acuerdo con la invención, el número de regiones codificantes es preferiblemente de por lo menos 3 para lograr la diversidad deseada.
El límite superior para el número de regiones codificantes aún no se ha dilucidado; sin embargo, se cree que un número superior a 100 puede plantear problemas prácticos. En general, se prefiere el uso de moldes que tienen entre 3 y 50 regiones codificantes, más preferiblemente entre 3 y 30 y aún más preferiblemente entre 4 y 15.

[0029] Dentro de cada una de las regiones codificantes, el número de codones únicos puede seleccionarse en función de la necesidad de diversidad. El número de codones únicos en cada una de las regiones codificantes puede ser similar o diferente. El número de codones únicos puede reducirse a uno. Esta podrá ser la opción cuando un denominado andamio participe en la molécula moldeada evolutiva. El límite superior para el número de codones únicos se puede decidir dejar alto siempre que se produzca la hibridación específica de oligonucleótidos de los anticodones para sus complementos en los moldes. Un ejemplo de un límite superior puede ser 10.000, pero puede elegirse por debajo o por encima de este límite según la necesidad.

[0030] Los componentes básicos esenciales para la presente invención se componen por lo general de tres elementos, a saber, un anticodón, una entidad funcional, y un enlace que conecta el anticodón y la entidad funcional. El anticodón es una secuencia de monómeros de ácido nucleico complementaria a la secuencia de un codón único en al menos una de la pluralidad de moldes. En un aspecto de la invención, se proporcionan los componentes básicos, que poseen anticodones que complementan a todos los codones únicos de la variedad de moldes. En otro aspecto, no están presentes algunos de los componentes básicos que transportan anticodones para codones únicos seleccionados. Esta última situación se puede producir cuando se desea la terminación de la síntesis en las distintas etapas o cuando son deseables las ausencias de determinadas entidades funcionales en la molécula moldeada. Además, los anticodones no asociados a cualquier entidad funcional pueden estar presentes por razones estéricas o para evitar eventos de hibridación no deseados.

[0031] El diseño de los anticodones y los codones únicos complementarios pueden destinarse a la obtención de, esencialmente, la misma temperatura de alineamiento para todos o algunos de los híbridos codón:anticodón para garantizar que todos los anticodones se han alineado al molde antes de que las entidades funcionales se conecten entre sí a través de una reacción química. En un aspecto de la invención, la temperatura de alineamiento de los híbridos codón:anticodón dentro de la misma región codificante está diseñada para tener distinta temperatura de alineamiento. La reacción separada puede ser cómplice al elevar inicialmente la temperatura por encima de la temperatura de alineamiento para todos los híbridos y disminuyendo lentamente la temperatura hasta que el primer conjunto de anticodones se alinee a sus moldes. Tras la conexión de la entidad funcional a otra entidad funcional o a una molécula moldeada naciente, la temperatura disminuye lo suficiente para permitir que otros componentes esenciales se alineen a una región codificante en las inmediaciones. El diseño anterior ofrece la posibilidad de que los grupos funcionales de distintos moldes, pero dentro de la misma región codificante, se sometan a diferentes condiciones de reacción.

[0032] Un diseño adicional implica temperaturas de alineamiento distintas para cada una de las regiones codificantes, pero similares dentro de una región codificante específica. Tras un diseño adecuado, es posible alinear paso a paso los componentes básicos individuales, disminuyendo gradualmente la temperatura desde por encima de la temperatura de alineamiento para el total de los híbridos codón:anticodón a una temperatura igual o inferior en la que todos los híbridos codón:anticodón se han formado dentro de la misma región codificante. Posterior o simultáneamente con el régimen de temperatura seleccionado, se realiza una conexión entre las entidades funcionales y las otras entidades funcionales o moléculas moldeadas nacientes. En cada paso de la disminución

gradual de la temperatura, se alinea un nuevo componente básico al molde y se realiza una conexión posterior. Este diseño permite la adición simultánea de todos los componentes básicos a la pluralidad de moldes y, por lo tanto, se omite la adición gradual de componentes básicos.

[0033] Se encuentra dentro de la capacidad de la persona experta en la materia construir el diseño deseado. Cuando se desee una temperatura de alineamiento específica, se trata de un procedimiento estándar para sugerir composiciones apropiadas de monómeros de ácido nucleico y la longitud de las mismas. La construcción de un diseño adecuado podrá estar asistida por un software, como Vector NTI Suite o la base de datos pública en la dirección de Internet http://www.nwfsc.noaa.gov/protocols/oligoTMcalc.html.

[0034] La entidad funcional del componente básico ejerce la función de ser una precursora para la entidad estructural que se incorpora finalmente a la molécula moldeada.

[0035] La entidad funcional está diseñada para ser capaz de conectarse a una entidad funcional de otro componente básico o a una molécula moldeada naciente. La conexión se apoya en uno o más grupos reactivos de la entidad funcional. El número adecuado de grupos reactivos que aparecen en la entidad funcional es de uno a diez. Un componente básico que solo ofrece un grupo reactivo se utiliza, entre otros, en las posiciones finales de polímeros o andamios, mientras que los componentes básicos que tienen dos grupos reactivos son adecuados para la formación de la parte del cuerpo de un polímero o andamios capaces de volver a reaccionar. Dos o más grupos reactivos destinados a la formación de conexiones suelen estar presentes en los andamios. Un andamio es una estructura central, que forma la base para la creación de múltiples variantes. Las formas variantes del andamio se forman, por lo general, a través de la reacción de los grupos reactivos del andamio con grupos reactivos de otros componentes básicos, mediados opcionalmente por grupos o catalizadores de relleno, bajo la creación de una conexión entre las entidades. Las entidades funcionales que se conectan al andamio pueden contener uno, dos o varios grupos reactivos capaces de formar conexiones.

[0036] Algunos de los enlacees son estables durante toda la síntesis para garantizar la conexión entre la molécula de andamio y el molde. Es esencial para la invención que se mantenga al menos un enlace para garantizar el acoplamiento de la molécula moldeada al molde que dirige la síntesis del mismo. En un estado final de la producción de la molécula moldeada, puede sustituirse al menos un enlace que emane de un componente básico por otra entidad que garantice la adherencia de la molécula moldeada al molde. Los enlacees estables son escindibles preferiblemente en una etapa final para separar la molécula moldeada del molde o de un molde complementario. Por lo tanto, los enlacees estables pueden denominarse como enlacees escindibles selectivamente. Preferiblemente, algunos de los enlacees de los componentes básicos son también escindibles durante la síntesis de la molécula moldeada, es decir, la entidad funcional podrá liberarse desde el componente básico para permitir la síntesis de la molécula moldeada.

[0037] El enlace puede estar unido al anticodón a una zona central del mismo o a uno de los extremos. En un aspecto de la invención, el anticodón y el enlace es un oligonucleótido contiguo, es decir, una parte del nucleótido complementa una secuencia del molde y otra parte es no complementaria para evitar la hibridación de la parte de oligonucleótido al molde.
Este diseño de los componentes básicos es una forma cómoda de diseño que no requiere ninguna etapa de reacción separada para la unión del enlace al anticodón. En otro aspecto de la invención, el enlace se une a una parte central del anticodón para permitir la ligadura de anticodones vecinos utilizando enzimas adecuadas para producir un molde complementario.

[0038] El enlace puede estar unido a la entidad funcional según las funcionalidades deseadas. En un aspecto, el enlace se une a la entidad funcional a través de un grupo reactivo capaz de formar una conexión con otra entidad funcional o una molécula moldeada naciente. Ejemplos de grupos reactivos adecuados son grupos imina (-NH-) y grupos disulfuro (-S-S-). La unión de la entidad funcional al enlace puede escindirse simultáneamente con la reacción del grupo reactivo interespaciador o la escisión puede realizarse en un paso separado.
De aquí en adelante, los enlacees conectados a una entidad funcional a través de un grupo reactivo que se escinde simultáneamente con la formación de la conexión se denominarán como enlacees de translocación. Los enlacees de translocación permiten la producción de polímeros moldeados, que están conectados al molde que dirige la síntesis del mismo a través del componente básico terminal, cuando un grupo reactivo de una entidad funcional en las inmediaciones reacciona para formar una conexión. La formación separada de la conexión entre una entidad funcional y otra entidad funcional o molécula moldeada evolutiva y la escisión del enlace es una ventaja porque se puede formar más de una conexión antes de la escisión.

[0039] Un subconjunto de los componentes básicos se pone en contacto con la pluralidad de moldes en la fase inicial de la producción de la biblioteca. El subconjunto de la cantidad total de componentes básicos se selecciona para que tenga anticodones que complementen a los codones únicos de una región codificante específica en el molde. Puede resultar ventajoso tener los componentes básicos en las inmediaciones del grupo reactivo del molde. En caso de que el grupo reactivo del molde sea una parte de un componente básico, es preferible que los componentes básicos que se van a vincular se unan en las inmediaciones de ambos para garantizar la suficiente proximidad de las entidades funcionales. Preferiblemente, el subconjunto comprende componentes básicos que

tienen anticodones que forman híbridos con codones únicos en regiones codificantes vecinas. El subconjunto puede proporcionarse mediante la adición de los componentes básicos por separado o, de manera alternativa, mediante la adición de todos los componentes básicos o de una parte principal de los mismos y luego dirigiendo el alineamiento de los componentes básicos individuales mediante un diseño adecuado de los híbridos codón:anticodón, tal como se describe anteriormente.

[0040] Las condiciones que permiten la hibridación específica de los codones y los anticodones únicos se ven influidas por una serie de factores, como la temperatura, la concentración de sal, el tipo de inhalador y la acidez. Se encuentra dentro de las capacidades de la persona experta en la materia seleccionar las condiciones adecuadas para garantizar que el contacto entre los moldes y los componentes esenciales se realizan en condiciones de hibridación.

[0041] Cuando dos componentes básicos en la etapa inicial del presente procedimiento se hibridan a un molde, las entidades funcionales de cada uno de los componentes esenciales permiten formar una conexión química. La conexión entre dos entidades funcionales se produce normalmente por una reacción entre los grupos reactivos presentes en cada entidad funcional. No obstante, sería conveniente hacer el puente entre dos grupos reactivos de entidades funcionales separadas a través de un grupo de relleno adecuado. Esta última situación se puede producir, por ejemplo, cuando dos grupos reactivos similares, como dos grupos amina, no son capaces de reaccionar entre sí directamente. Sin embrago, los dos grupos amina pueden conectarse entre sí a través de un ácido dicarboxílico, como el ácido oxálico, para crear uniones amida.

[0042] Tras la conexión correcta de dos entidades para la formación del compuesto moldeado naciente, puede escindirse uno de los enlacees conectado al mismo. No obstante, este paso es opcional. Es posible continuar con la incorporación de otros componentes básicos sin este paso de escisión. En un aspecto de la invención, la conexión de las entidades funcionales y la escisión de uno de los enlacees se producen de manera simultánea. Este aspecto de la invención es de especial importancia cuando el grupo reactivo capaz de reaccionar con otro grupo reactivo de una entidad funcional en la proximidad de la misma sea el grupo puente al enlace.

[0043] La parte de propagación del método se inicia poniendo en contacto la pluralidad de distintos moldes que albergan los compuestos moldeados nacientes con un subconjunto adicional de la pluralidad de componentes básicos, dicho subconjunto cuenta con anticodones complementarios a los codones únicos de una región codificante en la proximidad de la región (o regiones) codificante que alberga las moléculas moldeadas nacientes. Para aumentar la proximidad, puede ser adecuado para hibridar los componentes básicos adicionales a una región codificante vecina del componente (o componentes) básico que alberga la molécula moldeada naciente. El subconjunto de componentes básicos puede proporcionarse mediante la adición de componentes básicos por separado que se hibridan a una región codificante específica. Como alternativa, se pueden seleccionar las distintas condiciones de rigor combinadas con un diseño apropiado de los híbridos codón:anticodón individuales para permitir el alineamiento predominante de un subconjunto de componentes básicos a las regiones codón seleccionadas. La manera alternativa de formar un subconjunto tiene la ventaja de que todos o al menos una parte importante de los componentes básicos se pueden añadir al recipiente de reacción. Un ejemplo de dirigir el alineamiento es diseñar las primeras dos regiones codificantes de modo que tengan una temperatura de alineamiento relativamente alta, mientras que los componentes básicos posteriores que se van a alinear tienen una temperatura de alineamiento que disminuye gradualmente.

[0044] Cuando el componente básico adicional se hibrida a un molde también alberga la molécula moldeada evolutiva, la entidad funcional del componente básico adicional permite formar una conexión química para la molécula moldeada naciente. La formación de la conexión química procede normalmente por reacción entre los grupos reactivos presentes en la entidad funcional y la molécula moldeada naciente, respectivamente. Sin embargo, sería conveniente hacer el puente entre dos grupos reactivos a través de un grupo espaciador adecuado. Esta última situación se puede producir, por ejemplo, cuando dos grupos reactivos similares, como dos grupos amina, no son capaces de reaccionar entre sí directamente. Sin embrago, los dos grupos amina pueden conectarse entre sí a través de un ácido dicarboxílico, como el ácido oxálico, para crear uniones amida.

[0045] Tras la conexión entre la molécula moldeada naciente y la entidad funcional adicional, uno o más de los enlacees pueden escindirse opcionalmente, no obstante, es necesario asegurarse de que al menos un enlace es estable. La parte de propagación del procedimiento se puede repetir el número de veces que se desee para evolucionar la molécula moldeada. Cada repetición de la propagación se inicia poniendo en contacto el molde con un nuevo subconjunto de componentes básicos adicionales.

[0046] A la etapa de propagación le sigue la etapa de terminación. Dependiendo del grado de escisión durante la propagación, la unión de la molécula moldeada o el molde complementario es diferente. En un extremo, no se escinde ningún enlace durante la síntesis, que es cuando no se realiza la escisión opcional de enlacees del paso g). Esto puede dar lugar a una molécula moldeada unida a un número de enlace similar al número de componentes básicos involucrados en la síntesis.
En el otro extremo, los complejos obtenidos en el paso i) comprenden moléculas moldeadas unidas al molde que moldearon las síntesis del mismo a través del enlace de un único componente básico. El número de enlacees puede

estar en cualquier lugar entre estos dos extremos de la molécula moldeada. En algunas aplicaciones resulta ventajoso tener más de un enlace, por ejemplo, cuando la conformación de la molécula moldeada se puede estabilizar o incluso alterar. En general, es suficiente para la molécula moldeada que se va a unir al molde a través de un único enlace para permitir que el proceso de enriquecimiento posterior continúe de manera eficiente.

[0047] La unión a través de un componente básico implica el uso de enlaces de hidrógeno entre el codón y el anticodón para garantizar el acoplamiento del molde y la molécula moldeada. Como es bien sabido en la materia, los enlaces de hidrógeno son uniones débiles que pueden interrumpirse con facilidad. Por lo tanto, en un aspecto de la invención, el componente básico que finalmente alberga la molécula moldeada puede unirse al molde a través de un híbrido codón:anticodón que tenga una temperatura de alineamiento superior a los otros híbridos codón:anticodón del molde. Como alternativa, y preferiblemente en algunas aplicaciones, la molécula moldeada está conectada al molde que dirige la síntesis del mismo a través de un enlace covalente. El enlace covalente puede ser además un enlace de hidrógeno o el enlace covalente puede ser una sustitución. La presencia de un enlace covalente permite un tratamiento químico más duro del complejo. En un aspecto de la invención, el enlace covalente es escindible selectivamente para proporcionar una separación de la molécula moldeada desde el molde complementario.

[0048] El procedimiento según la presente invención puede implicar la etapa adicional de escindir todos menos un enlace después de la formación de la molécula templada. Esta etapa adicional implica que todos o algunos de los enlacees del paso g) no se escindan durante la síntesis de la molécula moldeada.

[0049] El procedimiento según la invención puede implicar, como paso adicional, la transferencia de la molécula moldeada a un punto de anclaje en el molde, o a una secuencia que complemente al molde, para establecer una conexión química eficaz entre el molde y la molécula moldeada. Puede resultar conveniente un acoplamiento eficaz de la molécula moldeada al molde o una secuencia complementaria al molde para permitir la desnaturalización de condiciones de enriquecimiento o la desnaturalización de la modificación postmodelizante de la molécula generada. El anclaje puede implicar la presencia de un grupo reactivo en la molécula moldeada y una pareja de reacción en el molde, por lo que la reacción entre estos grupos reactivos establecerá un enlace covalente. Como alternativa, el punto de anclaje puede estar presente en una secuencia complementaria hibridada al molde. En una realización preferida, la secuencia complementaria tiene una temperatura de alineamiento superior a uno o varios componentes básicos, en particular al componente básico terminal, para permitir el uso de un mayor rigor durante el enriquecimiento y, opcionalmente, la retirada de componentes básicos utilizados.

[0050] Tras la escisión del enlace, los anticodones pueden permanecer hibridados a los codones únicos o pueden separarse del molde. Cuando se elige separar los anticodones, preferiblemente se eliminan de la solución para evitar cualquier rehibridación o interferencia con los ácidos nucleicos destinados a participar en un evento de hibridación. En un aspecto de la invención, los anticodones que siguen a la escisión del enlace unidos al mismo permanecen hibridados a los codones únicos ya que los anticodones unidos a los moldes se pueden ligar juntos para crear un molde complementario. La ligadura de los anticodones puede realizarse después de que se hayan incorporado todos o la mayoría de los componentes básicos o, como alternativa, la ligadura puede realizarse tras la incorporación de cada componente básico nuevo. Además, en algunas ocasiones, puede resultar ventajoso ligar los anticodones juntos antes de la escisión de los enlacees. La ligadura de los todos los anticodones proporcionan un enlace covalente directo entre el molde complementario y la molécula moldeada.
El enlace covalente está diseñado preferiblemente para permitir la separación de la molécula moldeada del molde complementario. La separación de la molécula moldeada se realizará, por lo general, durante un proceso de enriquecimiento que aparece como uno de los pasos posteriores. Por lo tanto, es de gran importancia en la mayoría de aplicaciones que el enlace covalente sea escindible selectivamente, es decir, escindible bajo determinadas condiciones químicas no utilizadas en los pasos de enriquecimiento anteriores. En un aspecto de la invención, la molécula moldeada es liberada por el uso de enzimas. Como ejemplo, las nucleasas de restricción pueden utilizarse mediante la incorporación de un sitio de restricción cerca de la molécula moldeada. Otro ejemplo es el uso de una fosfodiesterasa para llevar a cabo una digestión total o parcial del molde o el molde complementario.

[0051] El uso de la ligadura también tiene otra ventaja, ya que es posible utilizar anticodones que tienen una secuencia más corta de nucleótidos. Un ejemplo de un anticodón típico tendrá de 15 a 25 nucleótidos en secuencia para obtener una temperatura de alineamiento adecuada de alrededor de 40 a 70 °C. Al ligar componentes básicos en las inmediaciones de ambos usando una ligasa o un enlace cruzado químico, es posible incorporar anticodones muy pequeños (por ejemplo, 4-10 nucleótidos) con alta especificidad y eficiencia. La ligadura de un anticodón pequeño a otro anticodón o a un molde complementario aumenta la temperatura de alineamiento total. Un resultado del uso de anticodones pequeños es que se incrementa la concentración local de entidades funcionales, y por lo tanto, la eficacia de la reacción entre los grupos reactivos se vuelve más eficaz.

[0052] Otra manera de aumentar aún más la proximidad es proporcionar componentes básicos destinados a interactuar entre sí, con un par molécula de interacción reversible. El par molécula permite a un componente básico formar un acoplamiento reversible para otro componente básico en las inmediaciones del mismo a través de la interacción de las dos partes del par situadas en cada componente básico. Preferiblemente, el par molécula también se denomina dominio de dimerización y se encuentra en la entidad funcional o es una porción del enlace que está cerca de la entidad funcional. Los dominios de dimerización de dos componentes básicos destinados a reaccionar

entre sí están diseñados para tener una afinidad entre sí. Los ejemplos de dominios de dimerización incluyen áreas ricas en leucina, estructuras de hélice superenrollada, pares anticuerpo-antígeno, secuencias complementarias de nucleótidos, etc. La afinidad de la dimerización de dos componentes básicos es preferiblemente más baja que la afinidad entre el codón y el anticodón para permitir las parejas de dimerización cambiantes aunque se realicen ciclos de temperatura. Cuando los dominios de dimerización de dos componentes básicos destinados a interactuar son secuencias de nucleótidos, se puede elegir la longitud de las secuencias para obtener una temperatura de alineamiento por debajo de temperatura ambiente, pero preferiblemente por encima de 5 °C, por ejemplo, entre 10 °C y 20 °C. Cuando el dominio de dimerización incluye dos oligonucleótidos complementarios, el dominio también se conoce como "caja con cremallera".

[0053] Un esquema de temperatura adecuado para la etapa de propagación de la presente invención es añadir un componente básico al molde a una temperatura por encima de la temperatura de alineamiento para dicho componente básico. Después se disminuye la temperatura por debajo de la temperatura de alineamiento para permitir el nuevo componente básico y el componente básico que alberga la molécula moldeada naciente para encontrar y unirse a sus respectivas partes del molde. Es preferible lavar el exceso de componentes básicos y desechos. A continuación, la temperatura disminuye por debajo de la temperatura de alineamiento del dominio de dimerización y en consecuencia aumenta la probabilidad de que las entidades funcionales estén conectadas. Potencialmente, las condiciones en el recipiente de reacción, a excepción de la temperatura, se pueden cambiar para proporcionar la conexión.
Tras la conexión entre las entidades funcionales/moléculas moldeadas, la temperatura se eleva y se repite el esquema de la temperatura.

[0054] Otro método para aumentar aún más la proximidad es aplicar un enlace "rígido" unido al anticodón con bisagras moleculares. Un resultado de usar un enlace rígido es que la entidad funcional muestrea un espacio tridimensional más pequeño. De ese modo aumenta la probabilidad de que dos entidades funcionales en las inmediaciones de ambas y su unión a un enlace rígido estén lo suficientemente cerca entre sí para proceder a una reacción. Un enlace rígido puede prepararse mediante diversos procedimientos disponibles para la persona experta en la materia. Un ejemplo es el uso de un oligonucleótido de doble cadena.
En una realización preferida, el anticodón y el enlace se realizan de un oligonucleótido contiguo, en el que el dominio anticodón del oligonucleótido es capaz de hibridar con un codón único de un molde y un dominio más rígido es capaz de hibridarse a un oligonucleótido complementario adicional del mismo. Cualquier grupo que permita fundamentalmente la rotación sin obstáculos alrededor de al menos una unión podrá proporcionar las bisagras. Puede proporcionarse una bisagra en la realización preferida anterior mediante la separación del dominio anticodón y el dominio más rígido con al menos un nucleótido. En otras palabras, puede proporcionarse una bisagra mediante una región de una única cadena situada entre el híbrido codón:anticodón único de doble cadena y el enlace rígido de doble cadena.

[0055] En un aspecto de la invención, el molde se conecta de forma covalente al molde complementario. La conexión puede realizarse mediante la unión covalente de dos cadenas hibridadas entre sí. Como alternativa, el molde puede estar en un extremo diseñado con un bucle en horquilla para permitir la ligadura del extremo del molde a un anticodón.
De acuerdo con este aspecto, la molécula moldeada estará vinculada a un molde de doble cadena. El molde de doble cadena puede ser una ventaja ya que es más estable y permite reacciones químicas más versátiles.

[0056] En un aspecto de la invención, se puede obtener una biblioteca de complejos de los procedimientos anteriores.

[0057] La biblioteca se puede utilizar para una variedad de aplicaciones, incluida la búsqueda de compuestos para su uso en procedimientos terapéuticos o de diagnóstico y compuestos fitosanitarios, como los pesticidas, los fungicidas, etc. La biblioteca puede comprender cualquier número de complejos de acuerdo con la invención. En un extremo, la biblioteca consta de solo dos complejos. En el otro extremo, la biblioteca puede constar de hasta 1018 complejos. Por lo general, el número de complejos se selecciona entre estos dos extremos.

[0058] Un procedimiento para identificar los compuestos más activos que pueden utilizarse, por ejemplo, en aplicaciones terapéuticas es someter la biblioteca a un tratamiento de enriquecimiento. De acuerdo con un aspecto de la invención, un enriquecimiento de una biblioteca de complejos que comprende moléculas moldeadas con respecto a una actividad predeterminada comprende las etapas de:

i) establecer una primera biblioteca de complejos que comprenden moléculas moldeadas complejas, dicha biblioteca se obtiene conforme a cualquier de los procedimientos de la invención,
ii) exponer la biblioteca a condiciones para enriquecerla con complejos que tienen la actividad complementaria,
iii) amplificar los complejos de la biblioteca enriquecida,
iv) opcionalmente, repetir el paso ii) a iii), y
v) obtener una biblioteca enriquecida que tenga una proporción más alta de complejos que comprenden moléculas moldeadas con la actividad predeterminada.

[0059] Por lo general, se prefiere la amplificación, aunque no siempre es necesaria. Especialmente, cuando se realizan varios ciclos de enriquecimiento resulta ventajoso hacer una amplificación para obtener suficientes complejos. En un aspecto preferido de la invención, la amplificación de los complejos de la biblioteca enriquecida comprende los pasos de poner en contacto la biblioteca de complejos con los medios de amplificación, lo que amplifica los moldes o los moldes complementarios y lleva a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención usando el producto de amplificación como moldes. Los medios de amplificación pueden ser cualquiera de los medios de amplificación de ácido nucleico adecuados para la amplificación del molde, como la PCR. Preferiblemente, la amplificación del complejo comprende una amplificación de 10 hasta 1015 veces.

[0060] Para permitir múltiples ciclos de enriquecimiento, se repiten los pasos ii) y iii) al menos 2, 3, 5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces. Los complejos pueden identificarse tras la finalización de cada ciclo o solo podrán identificarse tras el último ciclo. No hay necesidad explícita de identificaciones intermedias puesto que la amplificación puede llevarse a cabo sin conocer la secuencia del molde o una secuencia complementaria al molde, si el molde o el complemento del mismo está provisto de regiones de cebadoras adecuadas. La identificación tras del proceso de enriquecimiento implica la determinación de la secuencia del molde y/o la determinación estructural de la molécula moldeada y/o todo el complejo que tiene la actividad predeterminada.

[0061] Preferiblemente, las condiciones que enriquecen la biblioteca comprenden el poner en contacto una pareja de unión con las moléculas moldeadas de interés. La pareja de unión puede estar en disolución o puede inmovilizarse directa o indirectamente sobre un soporte. En general, el enriquecimiento se lleva a cabo usando un ensayo de afinidad o actividad. En un aspecto de la invención, el enriquecimiento se lleva a cabo mediante el cribado de complejos que tienen una afinidad (o un efecto) para una molécula diana o una entidad diana. En otro aspecto, el enriquecimiento se lleva a cabo mediante la selección de la actividad catalítica. Como alternativa, las condiciones que enriquecen la biblioteca implica una o más separaciones electroforéticas, filtración de gel, inmunoprecipitación, isoelectroenfoque, centrifugación e inmovilización.

[0062] El proceso de enriquecimiento puede involucrar células. Por lo tanto, en una realización, las condiciones que enriquecen la biblioteca comprende el proporcionar células capaces de internalizar la molécula moldeada, o realizar una interacción con la molécula moldeada que tiene la actividad predeterminada deseada.

[0063] Cuando la biblioteca de complejos se ha enriquecido para un grupo pequeño que comprende complejos que presentan una actividad predeterminada, es conveniente obtener cada uno de los complejos por separado. Por lo tanto, la invención también conlleva un procedimiento para la generación de un complejo de una molécula moldeada unida al molde que dirige la síntesis del mismo, dicho procedimiento comprende los pasos de

a) proporcionar un molde que comprende una serie de regiones codificantes y un grupo reactivo, en el que cada región codificante precisa un codón único,
b) proporcionar una pluralidad de componentes básicos distintos, cada componente comprende un anticodón, una entidad funcional y un enlace que conecta el anticodón y la entidad funcional, en el que el anticodón de cada componente complementa a un codón único del molde, y la entidad funcional comprende al menos un grupo reactivo.
c) poner en contacto al molde con componente básico que tenga un anticodón que complemente al codón único de una región codificante específica, dicho contacto se realiza en condiciones que permitan una hibridación específica del anticodón al codón único de los moldes,
d) reaccionar el grupo reactivo del molde y el grupo reactivo del componente para obtener una conexión química,
e) poner en contacto en condiciones que permitan una hibridación específica al molde que alberga la molécula moldeada naciente con un componente básico adicional que cuente con un anticodón complementario al codón único de una región codificante en la proximidad de la región codificante que alberga la molécula moldeada naciente,
f) permitir que la entidad funcional del nuevo componente básico forme una conexión química para la molécula moldeada naciente,
g) opcionalmente, partir uno o más de los enlacees, siempre y cuando al menos un enlace siga conectado a la molécula moldeada naciente con el molde que dirige la síntesis del mismo,
h) repetir opcionalmente los pasos e) a g),
i) obtener una molécula moldeada unida a través del enlace de uno o más componentes básicos para el molde que dirige la síntesis de los mismos.

[0064] La molécula moldeada puede obtenerse a partir del complejo mediante la escisión del enlace (o enlacees) de uno o varios componentes básicos para liberar la molécula moldeada del molde.

Divulgación detallada de la invención

Codón

[0065] Los codones que se producen en la naturaleza consisten en una secuencia de tres monómeros de ácido nucleico. La longitud de la secuencia de codón puede ser del mismo orden de acuerdo con la presente invención, pero es preferible que sea más larga para obtener una temperatura de alineamiento adecuada. Preferiblemente, la secuencia se selecciona para producir una temperatura de alineamiento por encima de la temperatura ambiente normal.
Aquí se pueden usar indistintamente los términos de la temperatura de alineamiento y de la temperatura de fusión; dicha temperatura se define como el máximo de la primera derivada de la absorbancia frente a la curva de temperatura. Los distintos codones no tienen que ser de la misma longitud, es decir, que comprendan el mismo número de monómeros de ácido nucleico.
Sin embargo, un número habitual de monómeros de ácido nucleico en la secuencia de codón normalmente está por encima de 6 pero por debajo de 25.

[0066] Cada monómero de ácido nucleico suele componerse de tres partes, a saber, una parte de núcleobase, un parte de azúcar y un enlace internucleosídico.

[0067] La parte de núcleobase puede seleccionarse entre núcleobases que ocurren de forma natural y las núcleobases que ocurren de forma no natural. La persona experta en la materia debe tener claro que varias núcleobases que se han considerado previamente como "que ocurren de forma no natural" se han encontrado posteriormente en la naturaleza. Por lo tanto, la "núcleobase" no solo incluye los heterociclos de purina y pirimidina conocidos, sino también análogos heterocíclicos y tautómeros de los mismos. Ejemplos ilustrativos de núcleobases son adenina, guanina, timina, citosina, uracilo, purina, xantina, diaminopurina, 8-oxo-N6-metiladenina, 7-deazaxantina, 7-deazaguanina, N4,N4-etanocitosina, N6,N6-etano-2,6-diamino-purina, 5-met-ilcotosina, 5-(C3-C6)-alquinilcitosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, pseudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazol-opiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y las núcleobases "que ocurren de forma no natural" descritas en Benner et al., U.S. Pat No. 5.432.272. El término "núcleobase" se destina a abarcar todos estos ejemplos, así como análogos y tautómeros de los mismos. Núcleobases especialmente interesantes son adenina, guanina, timina, citosina, 5-metilcitosina y uracilo, que se consideran como las núcleobases que ocurren de forma natural en relación con la aplicación terapéutica y de diagnóstico en seres humanos.

[0068] La parte de azúcar es adecuadamente una pentosa, pero puede ser la parte apropiada de un APN. Los ejemplos adecuados de posibles pentosas incluyen ribosa, 2'-desoxirribosa, 2'-O-metil-ribosa, 2'-harina-ribosa y 2'-4'-O-metileno-ribosa (LNA). Adecuadamente, la base nitrogenada está unida a la posición 1 'de la entidad pentosa. Un enlace internucleósido conecta el 3' final del monómero precedente a un 5' final de un monómero sucesivo. El enlace internucleósido puede ser el enlace fosfodiester que ocurre de forma natural o un derivado del mismo. Los ejemplos de dichos derivados incluyen fosforotioato, metilfosfonato, fosforamidato, fosfotriéster y fosfoditioato. Además, el enlace internucleósido puede ser cualquiera de un serie de enlaces que no contienen fósforo conocidos en la materia.

[0069] Los monómeros de ácido nucleico preferidos incluyen nucleósidos que ocurren de manera natural que forman parte del ADN, así como la familia de ARN conectada a través de enlaces fosfodiéster. Los miembros de la familia de ADN incluyen desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina, y desoxicitidina. Los miembros de la familia de ARN incluyen adenosina, guanosina, uridina, citidina, e inosina.

[0070] Cada codón es complementado por un anticodón. El anticodón tiene la capacidad de acoplarse específicamente al codón que lo complementa. La afinidad entre el codón y anticodón complementario se ve afectada a través de enlaces de hidrógeno siguiendo el famoso sistema de apareamiento de bases de Watson-Crick. Por lo tanto, el anticodón puede estar compuesto del mismo tipo de monómeros de ácido nucleico que el propio codón.

Enlaces

[0071] Los enlaces que conectan el anticodón y la entidad funcional de componentes básicos se pueden seleccionar de entre una variedad de posibilidades. Los enlaces pueden incluir uno o más grupos reactivos para obtener un enlace escindible selectivamente, un enlace escindible, y unos enlaces de translocación. Los enlaces adecuados se pueden seleccionar, entre otros, del grupo que comprende: carbohidruros y carbohidruros sustituidos; vinilo, polivinilo y polivinilo sustituido; acetileno, poliacetileno; ar-il/hetaril, poliaril/hetaril y poliaril/polihetaril sustituido; éteres, poliéteres como, por ejemplo, polietilenglicol y poliéteres sustituidos; aminas, poliaminas y poliaminas sustituidas; polinucleótidos de doble cadena, de cadena única o de cadena parcialmente doble naturales y no naturales y de doble cadena sustituidos, polinucleótidos de cadena única o de cadena parcialmente doble naturales y no naturales; y poliamidas y polipéptidos naturales y no naturales y poliamidas y polipéptidos sustituidas naturales y no naturales.

Grupos funcionales

[0072] La entidad funcional puede comprender uno o más grupos funcionales, es decir, grupos que finalmente formen parte de la molécula moldeada. La molécula moldeada puede comprender uno o más de los siguientes grupos funcionales, solo o en combinación:

1. Hidróxilos
2. Aminas primarias, secundarias y 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. Nitatratos, nitritos
15. Iminas
16. Fenil y otros grupos aromáticos
17. Piridinas, pirimidinas, purinas, indole, imidazol y bases heterocíclicas
18. Heterociclos
19. Policiclos
20. Flavinas
21. Haluros
22. Metales
23. Quelatos
24. Inhibidores basados en mecanismo
25. Catalizadores de moléculas pequeñas
26. Dextrinas, sacáridos
27. Fluoresceína, rodamina y otros fluoróforos
28. Policétidos, péptidos, diversos polímeros
29. Enzimas y ribozimas y otros catalizadores biológicos
30. Grupos funcionales para el acoplamiento de post polimerización/post activación de grupos funcionales
31. Fármacos, por ejemplo, parte de taxol, parte de aciclovir, "productos naturales"
32. Estructuras supramoleculares, por ejemplo, nanoclusters
33. Lípidos
34. Oligonucleótidos, análogos oligonucleótidos (p. ej. APN, ANB, morfolinos)
35. Hidrógeno

Grupos reactivos

[0073] 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. Hidróxilos
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
17. Sacáridos activados por UDP
18. Sulfuros
19. Cianatos
20. Carbonilimidazol

21. Tiazinanonas
22. Fosfinas
23. Hidroxilaminas
24. Sulfonatos
25. Nucleótidos activados
26. Cloruro de vinilo
27. Alquenos, quinonas

Moléculas moldeadas

[0074] 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:

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; politioéteres; polietilenglicoles (PEG); polietilenos; polidisulfidas; sulfuros de poliarileno; polinucleótidos; APN; ANB; morfolinos; oligo pirro-linona; polioximas; poliiminas; polietilenimina; poliacetatos; poliestirenos; poliacetileno; polivinilo; lípidos; fosfolípidos; glicolípidos; 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, 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.

Uso de la biblioteca

[0075] 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 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 de microtitulación estándar o mediante ensayos de clasificación FACS.

[0076] 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.

[0077] 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 se pueden utilizar también, por ejemplo, LCR (reacción en cadena de la ligasa).

[0078] 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.

[0079] 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.

[0080] 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.

[0081] 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.

[0082] 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 1014 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.

[0083] 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 didesoxi estándar o por medios más clásicos, como la secuenciación de Maxam-Gilbert.

[0084] 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.

[0085] 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.

[0086] También es posible secuenciar los aislados mediante el uso de una matriz de ADN de oligonucleótidos con secuencias aleatorias pero predeterminadas.

[0087] 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.

[0088] *Selección de moléculas presentadas en molde que se unirán a dianas conocidas* La presente invención también se dirige a enfoques permiten la selección de pequeñas moléculas capaces de unirse a diferentes dianas. La tecnología de molécula que se muestra en el molde contiene una función integrada para la selección y amplificación directa. La unión de la molécula seleccionada debería ser selectiva en que solo se coordinan para una

diana específica y, de este modo, previene o induce un efecto biológico específico. Por último, ha de ser posible utilizar estas moléculas de unión, por ejemplo, como agentes terapéuticos o como agentes de diagnóstico.

[0089] 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).

[0090] 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.

[0091] 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.

[0092] 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.
Incluso más preferiblemente, este proceso debe funcionar sin ninguna necesidad de trabajo externa fuera del sistema robótico durante todo el procedimiento.

[0093] 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.

[0094] 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.

[0095] 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 (epítopos) y el uso de estas moléculas de unión para la identificación y validación (véase la sección "Identificación y validación de la diana").

[0096] 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 introducirlas en la siguiente ronda de selección. Los pasos generales se muestran esquemáticamente en la Figura 27.

[0097] 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.

[0098] El primer paso en el ciclo de enriquecimiento de afinidad (una ronda como se describe en la Figura 27) 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.

[0099] 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 -NH2 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 -NH2 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).

[0100] 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 poliacrilamida) 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
Receptores solubles	Inmovilización directa, inmunoprecipitación, columna de afinidad, clasificación FACS, MS.
Receptor de superficie celular	Selección de sustracción de superficie celular, selección in vivo, clasificación FACS, columna de afinidad.
Inhibidores enzimáticos	Inmovilización directa, inmunoprecipitación, columna de afinidad, clasificación FACS, MS.
Epítopos superficiales	Selección de sustracción de superficie celular, clasificación FACS, columna de afinidad.

[0101] 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 proteolisis 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.

[0102] 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.

[0103] 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.

[0104] 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.

[0105] 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).

[0106] 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.

[0107] 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.

[0108] 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.

[0109] 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).

[0110] 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.

[0111] 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.

[0112] 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.

[0113] 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.

[0114] 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.

Identificación y validación de la diana

[0115] 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 epítopos específicos sobre antígenos que se encuentran en células, tejidos o in vivo. Estos epítopos podrían pertenecer a una diana que está implicada en

importantes eventos biológicos. Además, estos epítopos también podrían estar involucrados en la función biológica de la diana.

[0116] 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.

[0117] 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.

[0118] La mayoría de anticuerpos tienen una gran área de unión cóncava que requiere hasta cierto punto epítopos 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 epítopos 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 epítopos 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.

[0119] 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.

[0120] 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.

[0121] 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. 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, esterasas, amidasas, hidrolasas, reductasas, deshidrogenasas, oxidasas UDP-glucuronosiltransferasas, glutationa 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.

[0122] 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.

[0123] 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

[0124] 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.

[0125] 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.

[0126] 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.

[0127] 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. 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 epítopos 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.

Breve descripción de las figuras

[0128]

La Fig. 1 muestra el principio general de una realización de la presente invención para la síntesis de múltiples pasos de moléculas plantilla.
La Fig. 2 muestra la estructura general de plantillas útiles en la generación de una biblioteca.
La Fig. 3 muestra un ejemplo de diseño de plantillas para la generación de una biblioteca.
La Fig. 4 muestra ejemplos de la construcción de bloques para su uso en la preparación de una biblioteca de moléculas plantilla.
La Fig. 5 muestra otros ejemplos de bloques de construcción.
La Fig. 6 muestra ejemplos de la preparación de bloques de construcción.
La Fig. 7 muestra ejemplos de la preparación de bloques de construcción a partir de un oligonucleótido derivatizado 5'-NH 2.
La Fig. 8 muestra un procedimiento general de la expresión de una forma de realización para la formación de la molécula plantilla.
La Fig. 8, ejemplo 1, muestra un ejemplo de la expresión mostrada en la Fig. 8 que implica la reacción inducida por la luz entre los bloques de construcción simétricos.
La Fig. 9 muestra un procedimiento general de la expresión de una forma de realización para la formación de la molécula plantilla.
La Fig. 10 muestra un procedimiento general de llevar a cabo una expresión de la invención para la formación de una molécula plantilla de polímeros mixtos.
La Fig. 10, ejemplo 1, muestra ejemplos de reacción simultánea y la escisión de la vecina de entidades funcionales para la formación de (A) y alfa-péptido y (C) una poliamina.
La Fig. 10, ejemplo 2, muestra ejemplos de reacción simultánea y la escisión de entidades funcionales vecinas para la formación de (A) un peptoide o un α -o β-péptido, y (B) un péptido hidrazino.
La Fig. 11 representa una síntesis plantilla de un polímero, usando la reacción no simultánea y la escisión.
La Fig. 12 ilustra la formación de una molécula plantilla debido a la activación de grupos reactivos y la liberación parcial de la molécula plantilla para la plantilla por medio de la apertura del anillo.
La Fig. 13 muestra la conexión de dos entidades funcionales mediante el relleno de la fracción de conexión.
La Fig. 13, ejemplo 1, da a conocer un ejemplo de la Fig. 13, en el que una imina se forma por una reacción de relleno.
La Fig. 13, ejemplo 2, muestra un ejemplo de la Fig. 13, en la que se forma una amida.
La Fig. 13, ejemplo 3, muestra un ejemplo de la Fig. 13, en la que se forma una unión urea.
La Fig. 13, ejemplo 3.1, muestra un ejemplo de la Fig. 13 en el que las entidades funcionales 13.3.1.A y 13.3.1.B se sintetizan.
La Fig. 13, ejemplo 4, muestra la formación de moléculas plantilla quirales y aquirales.
La Fig. 13, ejemplo 5, muestra la formación de un enlace fosfodiéster por relleno simétrico.
La Fig. 13, ejemplo 6, muestra la formación de un enlace fosfodiéster por una reacción de relleno, en el que el bloque de construcción comprende un único grupo reactivo.
Fig. 13, ejemplo 7, muestra una reacción de relleno pericíclico.
La Fig. 13, ejemplo 7.1, muestra un ejemplo de la Fig. 13 en el que las entidades funcionales 13.7.1.A y 13.7.1.B se sintetizan.
La Fig. 14 muestra una representación esquemática de una reacción de relleno en el uso de monómeros asimétricos.
La Fig. 14, ejemplo 1, muestra una reacción de relleno asimétrico usando la ligadura de Staudinger modificada y reacción de cetona-hidrazida.
La Fig. 15 muestra una representación esquemática de una síntesis plantilla de una molécula no lineal.
La Fig. 16 muestra una representación de la síntesis plantilla de una molécula no lineal empleando grupos reactivos de diferentes clases y reacción no simultánea y escisión.

La Fig. 17 representa una síntesis de plantilla de una molécula no lineal, explotando el aumento del efecto de proximidad que surge de un andamio en "migración" .
La Fig. 18 muestra ejemplos de la síntesis plantilla de moléculas no lineales.
La Fig. 19 muestra una representación esquemática de una síntesis plantilla, en el que la etapa de reacción se puede realizar bajo condiciones en las que la hibridación específica de bloques de construcción de la plantilla es ineficiente.
La Fig. 20 muestra ejemplos de tipos diferentes de reacciones que permiten la reacción simultánea y la escisión.
La Fig. 21 muestra ejemplos de pares de grupos reactivos (X) e (Y), y la unión resultante (XY).
La Fig. 22 muestra una representación esquemática (panel A) del principio del cuadro de cremallera y un ejemplo (panel B) de dos bloques de construcción.
La Fig. 23 muestra una representación esquemática de varios métodos para aumentar la proximidad de entidades funcionales de diferentes bloques de construcción.
La Fig. 24 muestra ejemplos de la constitución química de un enlazador sea capaz de ser escindido.
La Fig. 25 muestra esquemáticamente la síntesis de plantilla mediante la generación de un nuevo grupo reactivo.
La Fig. 25, ejemplo 1, muestra un método en el que grupos reactivos generados en una primera ronda se hacen reaccionar posteriormente con grupos reactivos introducidos.
La Fig. 26 muestra ejemplos de modificaciones post-plantilla de la molécula plantilla.
La Fig. 27 muestra un método preferido para la selección de moléculas que muestran plantilla.
La Fig. 28 muestra los complejos que se pueden formar cuando una etapa de reacción se lleva a cabo utilizando las configuraciones que permiten apilar dúplex de ADN.
La Fig. 29 muestra una autorradiografía de un análisis en gel de poliacrilamida de la reacción entre bloques de construcción.
La Fig. 30 muestra la entidad funcional Feuston 3, así como el ligando Feuston 5.
La Fig. 31 muestra la estructura del aspartato protegido de pentenoílo.
La Fig. 32 muestra el uso de bloques de construcción de de alilglicina.
La Fig. 33 muestra la autorradiografía de un gel de poliacrilamida.
La Fig. 34 muestra un análisis Elisa del producto del proceso de codificación de dos pasos.

Descripción detallada de la invención

[0129] Los siguientes símbolos se utilizan en las figuras para indicar las características generales del sistema: En las figuras 8;10; 10, los ejemplos 1 y 2; 12; 12, los ejemplos 1; 13; 13, los ejemplos 1-7; 14; 14, ejemplo 1; 18; 20; 22; 23; 25; 25, el ejemplo 1, una línea horizontal larga simboliza una plantilla. La codificación de la región 1 simboliza secuencias que hibridan con bloques de construcción del tipo 1. Los bloques de construcción son simbolizados como se muestra en las figuras 4-7. X / Y, S / T y P / Q representan pares de grupos reactivos (donde los grupos reactivos de un par (por ejemplo, X y Y) son en parte o totalmente ortogonales a los grupos reactivos de otros pares (por ejemplo, S / T, P / Q)). R 1, R 2, .., R x simbolizan grupos funcionales. L y L1, L2, L3, ... representan enlazadores escindibles, donde los enlazadores de un grupo (por ejemplo, L 1 -enlazadores) son escindibles bajo condiciones en las que no se escinden enlazadores de otros grupos (L 2, L 3, ...),o se escinden de forma menos eficiente. El efecto de proximidad que resulta de la incorporación de dos bloques de construcción en la misma plantilla, o alternativamente, como resultado de la incorporación de un bloque de construcción en una plantilla a la que está unido un grupo reactivo, se puede mejorar por cualquiera de los métodos descritos anteriormente o posteriormente, lo que aumenta este efecto. Por ejemplo, con el fin de aumentar la eficiencia y la especificidad de la síntesis de plantilla, el efecto de proximidad puede ser aumentado por medio de la introducción de cajas de cremallera en la mayor parte de los conceptos generales que se describen aquí.

[0130] En todos los ejemplos, la molécula plantilla se puede acoplar a la plantilla a través de la interacción no covalente de un bloque de construcción monómero con la plantilla, o, alternativamente, a través de unión covalente o acoplamiento no covalente a la plantilla, y puede ser localizado en cualquiera de los extremos de la plantilla, o en cualquier parte de la plantilla. La reacción de acoplamiento a la plantilla se puede realizar antes, durante o después de la síntesis de la molécula plantilla. Para mayor claridad, en algunas de las figuras se ha incluido sólo la etapa de reacción, no la etapa de escisión.

[0131] Las cifras incluidas se han elaborado con el fin de poner de relieve determinadas configuraciones. Obviamente, se puede emplear cualquier combinación de los métodos mencionados, a fin de hacer que las moléculas lineales, así como las moléculas no lineales, utilicen grupos reactivos que conduzcan a la escisión simultánea, así como grupos reactivos que no conduzcan a la escisión simultánea, para usar enlazadores escindibles y no escindibles etc.

[0132] El protocolo para una expresión de una síntesis de múltiples etapas con plantilla se muestra en la Fig. 1 e implica una serie de pasos, que cada uno resulta en la adición de uno o más restos moleculares a una molécula creciente de que finalmente se convierte en la molécula plantilla. Cada uno de estos pasos pueden ser divididos en sub-etapas. Inicialmente, se proporciona una serie de plantillas (también denominada una biblioteca de plantillas). Cada una de las plantillas comprende una pluralidad de codones únicos y un grupo reactivo. Además, se

proporcionan una pluralidad de diferentes bloques de construcción, y cada uno de los bloques de construcción comprende una entidad funcional separada de un anti-codón con un enlazador adecuado. El anti-codón de un bloque de construcción específico complementa un único codón de una plantilla y es, por lo tanto, capaz en condiciones apropiadas de hibridación para hibridar con el codón único. La incorporación de los bloques de construcción se inicia poniendo en contacto la pluralidad de diferentes plantillas con un subconjunto de toda la cantidad de bloques de construcción. El subconjunto lleva anti-codones que se hibridan a los codones únicos de una región de codificación distinta. Se obtiene una conexión entre el grupo reactivo de la plantilla y la entidad funcional de los bloques de construcción. En la Fig. 1 el grupo reactivo de la plantilla es parte de un bloque de construcción (construcción en bloques 1) y el mencionado bloque de construcción se hibrida a la plantilla. En una realización preferida, el bloque 1 de construcción que comprende el grupo reactivo de la plantilla y el segundo bloque de construcción se ponen en contacto con la plantilla de forma simultánea para permitir una conexión eficiente entre las entidades funcionales. La línea entre FE 1 y FE 2 simboliza una conexión directa entre las entidades funcionales o una conexión indirecta a través de una entidad de molécula puente. La parte molécula formada por una conexión de FE 1 a FE 2 es una molécula plantilla naciente, que puede añadirse entidades funcionales adicionales resultantes en una molécula plantilla naciente en crecimiento.

[0133] La parte de propagación del método comienza con la incorporación de un nuevo elemento de construcción (bloque de construcción 3). La incorporación implica la hibridación de un subconjunto de los bloques de construcción para la pluralidad de plantillas que llevan la molécula plantilla naciente. El subconjunto de bloques de construcción se selecciona para tener anti-codones que complementan los codones particulares de las plantillas, los codones únicos se encuentran en las proximidades de, preferiblemente como vecinos, de los codones únicos de hibridación al bloque (s) de construcción que lleva la molécula plantilla. La entidad funcional del bloque de construcción adicional es capaz de formar una conexión química a la molécula plantilla naciente a través de la reacción de un grupo reactivo unido a la entidad funcional. La relación entre una o más de las entidades funcionales y los correspondientes anti-codones puede escindirse si se desea y la incorporación de un nuevo bloque de construcción se puede realizar. En el ejemplo ilustrado en la Fig. 1 sólo tres entidades funcionales están conectadas en la molécula plantilla. Sin embargo, la etapa de propagación se puede realizar tantas veces como sea apropiado para obtener el compuesto de plantilla deseado.

[0134] Como fase terminal, los conectores de conexión funcional entidades / molécula plantilla y anti-codones pueden escindirse. El complejo que comprende las moléculas plantilla (composiciones o secuencias de restos moleculares específicos, la identidad de las cuales se determina por la plantilla) unidas a las plantillas que realizaron la plantilla de su síntesis, ahora se puede pasar a través de un proceso de selección. Este proceso conduce a un enriquecimiento de complejas moléculas plantilla con características apropiadas. Los complejos aislados pueden ahora ser enriquecidos mediante la amplificación de las plantillas, y se puede realizar una nueva ronda de síntesis de plantilla y detección. Con el tiempo, las moléculas plantilla pueden ser identificadas por la caracterización de las plantillas correspondientes.

[0135] Las etapas del proceso que implica la incorporación de bloques de construcción pueden ser mediados por productos químicos, o enzimas, tales como la polimerasa o ligasa. Por ejemplo, la parte anti-codón de los bloques de construcción puede ser un derivado del nucleótido que se incorpora por medio de una polimerasa. La incorporación puede realizarse por la hibridación de la construcción de bloques de la plantilla. Si la plantilla es una molécula de ADN, la plantilla puede comprender sitios de imprimación en uno o ambos extremos de unión (lo que permite la amplificación de la plantilla por ejemplo, por PCR). La porción restante de las plantillas puede ser de secuencia aleatoria o parcialmente al azar.

[0136] La etapa de reacción del método implica reacciones entre los bloques de construcción incorporados, formando de ese modo las conexiones químicas entre las entidades funcionales. La conexión química puede ser un enlace químico directo o la conexión puede establecerse a través de una molécula puente adecuada.

[0137] La etapa de escisión opcional implica la escisión de algunos, todos menos uno, o todos los enlazadores que conectan las entidades funcionales y anti-codones. En la Fig. 1 la molécula plantilla se muestra mediante la escisión de los enlazadores de la segunda y tercera entidades funcionales, mientras que mantiene el enlazador del primer bloque de construcción.

[0138] Tras la producción de la biblioteca según la invención se lleva a cabo una selección. La selección o control implica el enriquecimiento de la población de pares de moléculas de plantilla con plantilla para una propiedad deseada. Por ejemplo: pasar una biblioteca de complejos de molécula plantilla con plantilla sobre una fase sólida en la cual una proteína objetivo se ha inmovilizado, y lavando los complejos no unidos, enriquecerá los complejos que son capaces de unirse a la proteína.

[0139] La selección puede realizarse más de una vez, por ejemplo, de forma más estricta cada vez. Entre cada selección es preferible, por lo general, realizar una amplificación. La amplificación implica producir más de los complejos de moléculas plantilla -, mediante la amplificación de la plantilla o de la plantilla complementaria, y producir más de los pares de moléculas plantilla con plantilla, para rondas adicionales de selección / análisis, o para la secuenciación u otra caracterización. Por ejemplo, si la plantilla es una cadena de ADN, la plantilla puede ser

amplificada por medio de PCR, donde después se puede realizar la síntesis de plantilla utilizando el ADN amplificado, como se ha descrito anteriormente.

[0140] La clonación y secuenciación también pueden ser técnicas útiles e involucrar la clonación de las plantillas o plantillas aisladas complementarias, seguido de una caracterización. En algunos casos, puede ser deseable secuenciar la población de las plantillas aisladas o plantillas que complementan, por lo cual la clonación de secuencias individuales no es necesaria.

[0141] En la Fig. 2, en la parte superior de la figura, se muestra la estructura general de una plantilla. Las plantillas comprenden x regiones de codificación. Cada región de codificación tiene un sub-estructura única que la diferencia de algunas o todas las otras regiones de codificación. A continuación se muestra la estructura general de una plantilla, que son plantillas específicas. Una plantilla específica determinada incluye un conjunto específico de x codones únicos. Un codón único especifica (por medio de la interacción con un anti-codón específico de un bloque de construcción) una entidad funcional específica. Los codones únicos 1.1, 1.2, 1.3, ..., 1.m son todos ejemplos de secuencias de codificación de la región 1. El diseño general de las plantillas, por tanto, permite la incorporación de plantilla de bloques de construcción, en el sentido de que un sub-conjunto de bloques de construcción se puede añadir, y que sólo será incorporado en la misma posición en la plantilla (es decir, la codificación de la región 1 si los bloques de construcción tienen anti-codones que son complementarios a los codones únicos de la región de codón de 1).

[0142] La Fig. 3 muestra un ejemplo de un diseño de plantillas y anti-codones para los bloques de construcción a base de oligonucleótidos. La Sección A describe la estructura general de un conjunto de plantillas que llevan 6 regiones de codificación, cada una contiene una secuencia en parte aleatorio (X especifica o bien C o G), y una secuencia constante que es idéntica para todas las secuencias en el grupo (por ejemplo, todos las secuencias de región de codificación 1 incluyen una secuencia ATATTT central). Utilizando C y G solamente (o, alternativamente, A y T solamente), los bloques de construcción que son complementarios a las regiones 1 de codificación tienen temperaturas de recocido muy similares, por lo cual la desalineación es insignificante. El punto de unión del enlazador que conecta el anti-codón y la entidad funcional no se especifica en la figura. Idealmente, el enlazador se une a la región constante del anti-codón, con el fin de evitar el sesgo en el proceso de recocido.

[0143] La sección B de la Fig. 3 muestra ejemplos de secuencias de codón y anti-codón. Ejemplo: se muestran las secuencias de codón 1 y codón 6. El ejemplo de la secuencia de codón 1 representa una secuencia específica de 1024 secuencias diferentes que hibridan específicamente con el anti-codón complementario 1 secuencias; el ejemplo de secuencia del codón 6 secuencia ¡una secuencia específica de 128 secuencias diferentes que hibridan con el anti-codón complementario 6 secuencias.

[0144] La Fig. 4 ilustra diferentes diseños generales de bloques de construcción. Un bloque de construcción comprende o consiste esencialmente de una entidad funcional, conectado a través de un enlazador (escindible) a un anti-codón. El panel A muestra un bloque de construcción con un grupo reactivo (X), que conecta el grupo funcional (R x) con el anti-codón. Este tipo de bloque de construcción se puede utilizar para el protocolo de reacción y escisión simultánea (por ejemplo, las figuras 9 y 15). La entidad funcional en este ejemplo comprende un grupo reactivo y un grupo funcional R x, también llamado una funcionalidad. Los grupos reactivos típicamente se convierten en parte de la molécula plantilla. El panel B muestra un bloque de construcción con dos grupos reactivos (X y Y), que conecta el anti-codón y el grupo funcional (R x). La entidad funcional en este ejemplo comprende dos grupos reactivos que son ambos parte del resto que une el anti-codón y el grupo funcional, R x. El panel C muestra un bloque de construcción con un grupo reactivo (X) conectando R x y el anti-codón, y un grupo reactivo (Y) unido al grupo R x. Este tipo de bloque de construcción puede ser utilizado en el protocolo de reacción y escisión simultánea (por ejemplo, Fig. 9 y 10). La entidad funcional comprende dos grupos reactivos X y Y, donde X es parte del enlazador, e Y está unido al grupo funcional R x. El panel D muestra un bloque de construcción con un grupo reactivo (X). El grupo reactivo (X) no se vincula al grupo funcional (Rx) y el elemento que complementa. Un enlazador escindible (L) se proporciona con el fin de liberar la entidad funcional del anti-codón.
Este tipo de bloque de construcción se puede utilizar en protocolos que requieren la escisión del enlazador después de que los grupos reactivos de las entidades funcionales han reaccionado (por ejemplo, Fig. 12). El Panel E muestra un bloque de construcción con cuatro grupos reactivos y un grupo funcional Rx. Los cuatro grupos reactivos y el grupo funcional R x pueden servir como un andamio, en el cual (codificado por la construcción de bloques unidos a los codones en la misma plantilla) se acoplan sustituyentes través de la reacción de grupos reactivos (X) de otros bloques de construcción con los grupos reactivos (Y) (por ejemplo, Figura 15). En este ejemplo, no se indica ningún conector escindible. Por lo tanto, después de las reacciones de plantilla, la molécula plantilla se une a la plantilla a través del enlazador de este bloque de construcción.

[0145] En la Fig. 5 se muestran tres bloques de construcción diferentes. El bloque de construcción A comprende un anti-codón (línea horizontal), que puede ser un oligonucleótido, al que un enlazador que lleva la entidad funcional está unido a la parte central. La porción del enlazador marcado "a" puede representar una secuencia de oligonucleótidos a la que un solo nucleótido de cadena puede estar anillado con el fin de hacer que el enlazador más rígido, o alternativamente, "a" puede representar una secuencia de caja de la cremallera de nucleótidos u otro tipo de resto de cuadro de cremallera. La línea vertical puede representar un enlazador PEG (polietilenglicol), enlazador

oligonucleótido, o cualquier otro enlazador que proporciona la entidad funcional con la adecuada libertad interactuar de manera productiva con una entidad funcional de un bloque de construcción de recocido a la misma plantilla durante el proceso de moldeo. En el bloque de construcción, el enlazador se une a la terminal del anti-codón. El anti-codón y el enlazador pueden ser una hebra continua de un oligonu- cleótido. La parte horizontal aquí representa el anti-codón, y la parte vertical representa el enlazador. El enlazador puede contener un resto "a" que funciona como una caja de cremallera (ver Fig. 22), un enlazador rígido, o un sitio de hibridación para otra entidad que rigidiza el enlazador tras la hibridación. En la construcción de bloque C de la Fig. 5 el enlazador y el anti-codón pueden ser una hebra continua de un oligonucleótido. Adjunto al enlazador hay un nucleófilo "Nu" que puede reaccionar con una entidad funcional. Esto puede ser utilizado como punto de anclaje para la molécula plantilla. El bloque de construcción C se puede utilizar preferentemente como bloque de construcción inicial o terminal. Cuando se utiliza en la etapa inicial de la producción del complejo que comprende la molécula plantilla, el bloque de construcción C puede proporcionar la plantilla con un grupo reactivo a la que las entidades funcionales pueden estar unidas en la creciente molécula plantilla. En una realización adicional de la invención "Nu" del bloque de construcción C representa cualquier grupo reactivo capaz de participar en una reacción que resulta en la formación de una conexión a una entidad funcional de un bloque de construcción.

[0146] La Fig. 6 muestra cinco diferentes métodos generales para la preparación de bloques de construcción. Los métodos generales implican el acoplamiento de las entidades funcionales a bloques de construcción a base de oligonucleótidos. Las reacciones y reactivos que se muestran se pueden utilizar para el acoplamiento de entidades funcionales a oligonucleótidos modificados (modificados con tiol, ácido carboxílico, haluro, o amina), sin reacción significativa con la parte no modificada del oligonucleótido. Como enfoque alternativo, la entidad funcional puede ser sintetizada como precursora de la fosforamidita, que luego se puede utilizar para la síntesis de oligonucleótidos mediante métodos estándar, lo que resulta en un oligonucleótido derivado que lleva una entidad funcional.

[0147] La Fig. 7 muestra el diseño y la síntesis de bloques de construcción a modo de ejemplo. El panel A muestra un esquema de síntesis general para bloques de construcción utilizando oligonucleótidos de ADN como codón, y aminas de acoplamiento y ésteres de ácidos carboxílicos. El oligonucleótido se compra con una amina acoplada a, por ejemplo, la base en una posición terminal de la oligo. Mediante la adición de EDC (1- (3- dimetilaminopropil) -3-etilcarbodiimida) y NHS (N-hidroxisuccinimida), el oligonucleótido se acopla al bloque del bloque de construcción a través de un enlace amida. El panel B muestra esquemas de síntesis específicos para la generación de clases específicas de bloques de construcción.

[0148] La Fig. 8 ilustra una realización para la síntesis de plantilla de un polímero. X e Y son grupos reactivos de la entidad funcional. X e Y pueden ser diferentes tipos de grupos reactivos (por ejemplo, amina y ácido carboxílico), de la misma clase, pero diferentes (por ejemplo, diferentes aminas primarias o una amina primaria y una amina secundaria), o idéntica. La reacción de X con Y para formar XY o bien sucede espontáneamente cuando el bloque de construcción se ha incorporado, o se induce por un cambio de condiciones (por ejemplo, pH), o mediante la adición de un factor inductor (exposición a sustancias químicas o UV, por ejemplo).

[0149] La Fig. 8, ej.1. muestra la reacción inducida por la luz entre simétricos derivados de cumarinas. La reacción inducida por la luz de las unidades de la cumarina, seguida de la escisión del enlazador, resulta en una estructura de anillo. Se muestran los ejemplos de grupos funcionales (fosfato y carboxílico). Los bloques de construcción se dice que son simétricos porque los dos grupos reactivos, dos unidades de cumarina, son de la misma reactividad (de hecho, en este ejemplo son idénticas).

[0150] La Fig. 9 muestra una realización para la síntesis de plantilla de un polímero. Una población de plantillas, cada una con cuatro codones, se incuban con dos conjuntos de bloques de construcción (que llevan anti-codones 1 y 2, respectivamente), a una temperatura que asegura recocido eficiente y específico de anti-codones de tipo 1 para las regiones 1 de codificación, y el recocido eficiente y específico de anti-codones tipo 2 para las regiones de codificación 2. Después del recocido, los bloques de construcción en exceso se pueden retirar. Si se desea, los grupos reactivos deseados se pueden desproteger (y por lo tanto activan para la reacción) en este paso. A continuación, los complejos de bloque de la plantilla de construcción se incuban en condiciones que permiten a los grupos reactivos de los bloques de construcción (es decir, grupos reactivos X y Y) reaccionar. Esto conduce a una transferencia del grupo funcional R1 desde el bloque de construcción 1 para el bloque de construcción 2, y por lo tanto los resultados en la formación de un polímero dimérica que lleva dos grupos funcionales, R1 y R2. A continuación se repite este proceso, se añade un tercer monómero (con anti-codón de tipo 3), y después de recocido a la región de codificación 3, se retira el bloque de construcción excesivo y la reacción entre X e Y ahora conduce a la formación de un polímero trimérico, acoplado al bloque de construcción recocido a la región 3 de codificación. Una vez más, el proceso se repite con bloques de construcción de tipo 4, dando como resultado la formación de un polímero tetramérico.

[0151] Los grupos reactivos X e Y utilizados en este esquema por lo tanto tienen dos funciones: i) reacción entre plomos X e Y para acoplamiento de las funcionalidades correspondientes (por ejemplo, R1 y R2), y al mismo tiempo, ii) el enlazador entre R1 y el anti-codón se escinde. Los ejemplos de grupos X e Y reactivos con tales características (es decir, misma capacidad de reacción y se unirán al mismo tiempo) se muestran en la Fig. 20. Mediante la elección apropiada de X e Y, el polímero naciente se migra por la plantilla, de bloque de construcción a bloque de

construcción, a medida que se sintetiza. Por ejemplo, al seleccionar X = éster (COOR), y Y = amina (NH 2), el ataque nucleofílico de la amina sobre el éster conduce a la transferencia de la funcionalidad de aguas arriba (por ejemplo, R 1) para el bloque de construcción de aguas abajo (por ejemplo, llevando anti-codón de tipo 2). Esto asegura el mayor efecto posible de proximidad con esta configuración (es decir, en cada paso, el X e Y que reaccionan se transportan en los monómeros vecinos).

[0152] Si se desea, el polímero con plantilla se puede acoplar a la plantilla a través de la interacción no covalente de un bloque de construcción con la plantilla (en el ejemplo dado, a través de la interacción de bloque de construcción 4 con la plantilla), o alternativamente, a través de acoplamiento covalente a un grupo reactivo en la plantilla, que se encuentra en cualquiera de los extremos de la plantilla, o en cualquier parte de la secuencia plantilla. En este último caso, la reacción de acoplamiento a la plantilla se puede realizar antes, durante o después de la síntesis del polímero.

[0153] La Fig. 10 muestra la síntesis de plantilla de un polímero mixto. La diferencia más notable, en comparación a la realización mostrada en la Fig. 9 es que los grupos reactivos en los bloques de construcción individuales son diferentes. Los pares de grupos reactivos (X / Y, S / T, y P / Q) se eligen de modo que la reacción de X e Y, S y T, P y Q, respectivamente, resulte en la transferencia de un grupo funcional de un bloque de construcción a otro (es decir, la reacción tanto media la unión de los dos grupos funcionales y la escisión del enlazador que conecta inicialmente uno de los grupos funcionales al anti-codón). Ejemplos de pares de grupos reactivos que median esta reacción simultánea y la escisión se muestran en la Fig. 20.

[0154] El la Fig. 10, el ejemplo 1 muestra dos métodos de obtención de diferentes clases de compuestos usando la reacción simultánea y la escisión. En el panel A, se muestra la formación de un péptido alfa y, en el panel C la síntesis de una poliamina.

[0155] En el panel A, dos bloques de construcción se incorporan por la hibridación con la plantilla. Uno de los bloques de construcción es un oligonucleótido al que se ha añadido un tioéster. El otro bloque de construcción es un oligonucleótido al que se ha añadido un tioéster de ácido amino. La amina del último bloque de construcción ataca al carbonilo de otro bloque de construcción. Esto da como resultado la formación de un enlace amida, que se extiende la unidad peptídica. Cuando se incorpora el siguiente bloque de construcción de tioéster aminoácido , esto puede atacar al carbonilo del tioéster, lo que resulta en la escisión del dipéptido a partir del anti-codón, para formar un tripéptido. Este proceso se repite hasta que el péptido deseado se ha generado. Es importante destacar que, como la reacción en cada paso es entre el entrante subunidad-precursor y la subunidad del polímero naciente que está más cerca del enlazador que lo conecta con el anti-codón, la geometría del ataque nucleófilo se mantiene sin cambios. La reactividad de la amina con el éster puede ser sintonizada de varias maneras. Los parámetros que afectan a la reactividad incluyen: (I) el pH y a la temperatura, (ii) la naturaleza de éster (tio-, fosfo, o hidroxi-éster); (iii) la naturaleza del sustituyente en el azufre (ver el Panel B a continuación).

[0156] El esquema general que e presenta aquí se puede aplicar a la mayoría de las reacciones de nucleófilos, incluyendo la formación de diversos tipos de péptidos, amidas y polímeros amida como (por ejemplo, mono-, di-, tri-, y tetra-sustituidoα-, β-, γ-, y Ω- péptidos, poliésteres, policarbonato, policarbarmato, poliurea), utilizando entidades funcionales similares.

[0157] El panel B muestra cuatro tioésteres diferentes con diferentes sustituyentes en el azufre y por lo tanto diferente reactividad hacia los nucleófilos.

[0158] Panel C se refiere a la formación de una poliamina. Usando el mismo principio que en (A), se forma una poliamina.

[0159] En la Fig. 10, el ejemplo 2 muestra reacción simultánea y de escisión para dos reacciones. En la reacción A, se forma un peptoide o un péptido α- or β-, y en la reacción B se forma un péptido hidrazino.

[0160] En la reacción A, dos bloques de construcción se incorporan al principio, uno de los cuales lleva tanto un nucleófilo (un grupo amino) y un electrófilo (por ejemplo, un éster); el otro bloque de construcción sólo lleva un electrófilo (por ejemplo, un tioéster). Como resultado, la amina nucleófila atacará el electrófilo del bloque de construcción unido a la misma plantilla. Como resultado, se forma una estructura dimérica, vinculada al bloque de construcción que lleva inicialmente la amina. Después de la adición secuencial de bloques de construcción, la estructura lineal crece, y, finalmente, se forma la molécula deseada con plantilla (un peptoide o un α - o -péptido β) .

[0161] La reacción B sigue la misma línea que en A, excepto que se utilizan bloques de construcción precursor hidracina-péptido, lo que lleva a la formación de péptidos hidrazino.

[0162] La Fig. 11 muestra un esquema de reacción general para la síntesis de plantilla de un polímero, usando la reacción no simultánea y la escisión. En este esquema, la reacción de los grupos reactivos (por ejemplo, X e Y) en sí misma no da lugar a la escisión, por lo cual la entidad funcional está acoplado al anti-codón través de un enlazador escindible. Por lo tanto, cada adición de una subunidad al polímero en crecimiento implica dos pasos. En primer

lugar, los grupos reactivos X e Y reaccionan para formar un enlace XY. A continuación, en una etapa separada, un enlazador escindible L se escinde, que libera una de las entidades funcionales de la anti-codón. Alternando entre dos tipos de conectores escindibles (escindibles en condiciones diferentes) se puede conseguir una migración del polímero naciente abajo de la plantilla, como se describe en la fig. 9 y 10. Esto asegura el mayor efecto posible proximidad con esta configuración (es decir, en cada paso, el X e Y reaccionantes se transportan en los monómeros vecinos). En el ejemplo, todos o algunos de los pares de reactivos pueden ser de la misma clase (por ejemplo, X / Y = S / T = P / Q).

[0163] Ejemplos de reacciones que no median reacción simultánea y la escisión se muestran en la fig. 21. Cualquier combinación de enlazadores escindibles y no escindibles se puede utilizar, dependiendo de la naturaleza de los grupos reactivos en las entidades funcionales (por ejemplo, depende de si la reacción implica una liberación de la anti-codón).

[0164] La Fig. 12 se refiere a la activación de grupos reactivos y la liberación de anti-codón por la apertura del anillo.
La reacción del iniciador con X en la estructura de anillo se abre el anillo, lo que resulta en la activación de Y. Y ahora puede reaccionar con X en una entidad funcional vecina. Como resultado de la apertura del anillo, las entidades funcionales son liberadas de los anti-codones. Si el principio de la cremallera de la caja se aplica a esta configuración(donde cada módulo adicional añadido reacciona con la molécula naciente con plantilla adjunta al iniciador), el enlazador iniciador debe llevar a la mitad de la cremallera (por ejemplo, la "cadena de sentido") y todos los bloques de construcción deben llevar a la otra mitad de la caja de la cremallera (la "cadena antisentido").

[0165] Fig. 12, ejemplo 1. Apertura de anillo de N-thiocarboxianhidridas, para formar -peptidos β.

[0166] Después de la incorporación de dos bloques de construcción, donde uno de los bloques de construcción llevan un grupo reactivo iniciador (o la incorporación de un bloque de bloques junto a una molécula de iniciador unido covalentemente), el iniciador se activa, por ejemplo por desprotección o por un aumento de pH. La amina primaria entonces ataca el carbonilo de la unidad N-thiocarboxianhidrida(NTA). Como resultado, CSO se libera, y se genera una amina primaria. Cuando se incorpora el siguiente bloque de construcción, esta amina reaccionará con el NTA, y, finalmente, cuando todos los bloques de construcción se han incorporado y las unidades NTA han reaccionado, se habrá formado un -péptido β. Por último, los enlazadores que conectan el péptido β a los anti-codones son escindidos, resultando en un -péptido β unido a su plantilla a través de un enlazador.

[0167] Se pueden prever una serie de cambios en esta configuración. Por ejemplo, en lugar de thiocarboxianhidridos, se podría utilizar carboboxianhidridos. El iniciador puede ser protegido con un grupo basal o fotolábil. Si se elige un grupo de protección lábil en medio básico, la estabilidad de la carboxianhídrido debe ser considerado. A pH más alto, puede ser ventajoso usar en lugar de carboxianhídridos thiocarboxianhidridos. Otros tipos de péptidos y polímeros similares a péptidos (por ejemplo, mono-, di-, tri-, y tetra-sustituidoα-, β-, γ-, y Ω-poliésteres, policarbonato, policarbarmato, poliurea) se pueden utilizar, usando un esquema similar. Por ejemplo,se pueden preparar péptidos α- por polimerización de anillos de carboxianhidrido de 5 miembros.

[0168] La Fig. 13 muestra el principio de relleno simétrico (bloques de construcción XX simétrica). La reacción de relleno se produce entre los grupos reactivos ("X" en la figura) y la moléculas puente "AA" en la figura). Para mayor claridad, sólo la reacción (no la escisión) se muestra en la figura. X representa los grupos reactivos de la entidad funcional En este caso, los dos grupos reactivos son de la misma clase. (YY) se añade a la mezcla antes, durante o después de la incorporación de los bloques de construcción.

[0169] Fig. 13, ej.1 muestra formación de la imina por reacción de relleno.

[0170] El dialdehido se añade en exceso a las diaminas incorporadas. Como resultado, se forma una imina. En el ejemplo, la molécula plantilla lleva los siguientes grupos funcionales: ciclopentadienilo e hidroxilo.

[0171] En la Fig. 13, el ejemplo 2 muestra un ejemplo de formación de amida utilizando simétrica de relleno. Después de la incorporación de dos bloques de construcción cada uno con una di-amina, los bloques de construcción no incorporados pueden ser quitados. A continuación, EDC (1-etil-3- (3- dimetilaminopropil) carbodiimida), y el ácido dicarboxílico se añade en exceso a las aminas primarias de los bloques de construcción. Alternativamente, un di- (éster de N-hidroxisuccinimida) se puede añadir en exceso. A un pH de 7 a 10, esto conducirá a la formación de dos enlaces amida que unen las entidades funcionales. Después de la reacción, los reactivos en exceso se pueden eliminar por diálisis, precipitación de los bloques de construcción y plantilla, filtración en gel o por otros medios que separan los reactivos a partir de los bloques de construcción. Cuando el proceso de incorporation- y-reacción se ha repetido un número de veces, y la molécula deseada se ha hecho plantilla, los enlazadores (L) pueden ser escindidos, y, si los grupos funcionales se han enmascarado por grupos de protección (PG), estos grupos funcionales se pueden desproteger para exponer los grupos funcionales. Los grupos protectores adecuados serían, por ejemplo, Boc, Fmoc, benciloxicarbonilo (Z, CBZ), trifluoroacetil, ftaloilo, u otros grupos protectores de amino describen por ejemplo en (T. W. Green and Peter G. M. Wuts (1991), Protective Groups in Organic Synthesis).

[0172] Una vía alternativa a las entidades funcionales de amida unido sería incorporar bloques de construcción que llevan di-ácidos carboxílicos, y luego añadir diaminas, NHS y EDC. Como alternativa, los bloques de construcción podrían llevar a ésteres de N-hidroxi-aspiración cinimidil (NHS), que reaccionarían con las aminas añadido sin la necesidad de añadir EDC y NHS.

[0173] En la Fig. 13, el ejemplo 3 muestra un ejemplo de formación de enlace de urea.
Las entidades funcionales de los bloques de construcción incorporados reaccionan con fosgeno o un equivalente de fosgeno-como CDI para formar una poliurea. También se puede utilizar formaldehído. Los enlazadores se escinden y el hidroxilo protegido se desprotege. Los grupos salientes apropiados (LV) son cloruro, imidazol, nitrotriazol, u otros grupos buenos dejando.

[0174] En la Fig. 13, ejemplo 3.1, se muestra un ejemplo de la Fig. 13 en el que las entidades funcionales 13.3.1.A y 13.3.1.B se sintetizan.

Síntesis de la entidad funcional 13.3.1A:

[0175] 5-fluoroindol (1 eq) se disuelve en etanol y se trata con 4-pent-enoico ácido [2- (4-oxo-piperidin-1-il) -etil] -amida (1,2 eq) y 2N KOH. La mezcla se agita O / N a reflujo. El producto bruto se evaporó y se purificó por filtración en gel de sílice. El material purificado se trató con metil 3-bromobutanoato (1,2 eq) y NaH (1,5 eq) en DMF a rt. Después 5 horas LiOH (10 eq) y se añade agua y la mezcla de reacción se agita a rt o / n. El producto final se purifica por LC MS y se carga en un oligo de ADN que contiene una función amino.

Síntesis de la entidad funcional 13.3.1B:

[0176] 3-pent-4-enoilamino-butírico (1 eq) se trata con éster 3-hidroximetil-benzoico terc-butilo (1,2 eq), DIC (1,2 eq) y DMAP (0,2 eq) en DCM. La mezcla de reacción se agita o/n a temperatura ambiente. El producto bruto se evaporó y se purificó por filtración en gel de sílice. El material purificado se disolvió en éter dietílico y se trató con HCl en éter dietílico. Después de agitar durante 3 horas la mezcla se evaporó y el material bruto se cargó en una oligo de ADN que contiene una función amino.

Experimento de relleno usando entidad funcional 13.3.1A y13.3.1B:

[0177] Los dos oligos cargados se mezclan con un oligo plantilla en en tampón HEPES (pH = 7,5) y NaCl 100 mM. se añade 1,1'-Carbonilbisbenzotriazol (0,1 M en MeOH) y la mezcla se deja a temperatura ambiente durante 4 horas. pH se ajusta entonces a 9 y la mezcla se deja a temperatura ambiente o / n.

[0178] En la figura 13, el ejemplo 4 muestra la formación de moléculas plantilla quirales y aquirales. En este ejemplo, el grupo Rx se utiliza como un enlazador escindible, que genera el grupo funcional deseado tras la activación. Tanto en la reacción Acomo en la reacción B, se forma un enlace de urea.

[0179] En la reacción A, el grupo funcional está unido a la cadena principal a través de un carbono quiral. El hidrógeno sobre este carbono se extrae para hacer hincapié en esto. Antes de la formación del enlace, no hay rotación libre alrededor del enlace que conecta el carbono quiral y el grupo funcional. Cuando los grupos reactivos (las aminas) reaccionan con el fosgeno equivalente (por ejemplo, un carbonild- iimidazole) para formar la molécula plantilla, los bloques de construcción pueden ser insertados en cualquiera de las dos orientaciones (tal como se indica por la posición del hidrógeno, izquierda o derecha). Como resultado, cada residuo codificado de la molécula plantilla tendrá dos formas quirales posibles. Si la molécula plantilla fue, por ejemplo, una poliurea pentamérica (formada a partir de cinco entidades funcionales), esta molécula tendría 2 5 = 32 estereoisómeros. En ciertos casos, puede ser ventajoso incorporar tal diversidad estructural adicional en la biblioteca (por ejemplo, cuando se emplea una diversidad bloque de construcción baja). En otros casos, dicha diversidad adicional no es deseable, ya que la eficacia de la investigación puede verse en peligro, o puede llegar a ser demasiado difícil de determinar la identidad de una molécula plantilla que se ha aislado en un proceso de selección.

[0180] En la reacción B, el carbono quiral de reacción A se ha sustituido por un átomo de nitrógeno. Como resultado, la molécula plantilla resultante es aquiral, es decir, la plantilla codifica una estructura específica.

[0181] En la figura 13, el ejemplo 5 muestra la formación de un enlace fosfodiéster por el principio de simetría de relleno. Los bloques de construcción incorporados reaccionan con la molécula de relleno activado para formar un enlace fosfodiéster. A continuación, los enlazadores se escinden, liberando la molécula plantilla a partir de su plantilla. Un ejemplo de un grupo saliente apropiado (Lv) es imidazol.

[0182] La Fig. 13, ejemplo 6 muestra la formación de fosfodiéster con un grupo reactivo en cada bloque de construcción.
Tras la adición de un compuesto dihidroxilado tal como 1,3-dihidroxipiridina, se forma un enlace fosfodiéster. Por último, el grupo funcional Rx es liberado del anti-codón por escisión de los grupos de protección de enlazador / escindible conectado al anti-codón.

[0183] En la figura 13, el ejemplo 7 muestra el ejemplo de una reacción de relleno en pericíclica.
En primer lugar, dos bloques de construcción se incorporan. A continuación se añade 1,4-benzoquinona en exceso, dando como resultado la formación de un compuesto policíclico. Se añade un tercer bloque de construcción, se hace reaccionar con la 1,4-benzoquinona, y este proceso se repite un número de veces hasta que la molécula plantilla deseada se ha generado. Por último, todos menos uno de los enlazadores que conectan la molécula plantilla para el anti-codón, se escinden.

[0184] La Fig. 13, ejemplo 7.1, muestra un ejemplo de la Fig. 13 en el que las entidades funcionales 13.7.1.A y 13.7.1.B se sintetizan.

Síntesis de la entidad funcional 13.7.1A:

[0185] El éster metílico del ácido 3-metilamino-propiónico (1 eq) se disuelve en DCM y trietilamina (2 eq)). La mezcla se enfría a 0 ° y se trató con cloruro de acriloilo (1,5 eq). Después se evapora 2 horas la mezcla de reacción, se redisolvió en THF y se trató con LiOH (10 eq) y agua. La mezcla de reacción se deja a temperatura ambiente durante 3 horas. El producto en bruto se extrae con EtOAc (2x). Las fases orgánicas mezclada se secan sobre MgSO4 y se evaporan. El producto se purifica por LC-MS y se carga en un oligo de ADN que contiene una función amino.

Síntesis de la entidad funcional 13.7.1B:

[0186] Amino-furano-2-il-acético (1 eq) se trata con anhídrido acético (3 eq) a temperatura ambiente durante 1 hora. El producto bruto se evaporó y se purificó el producto por LC-MS y después se trató con éster de ácido 3-hidroximetil-benzoico terc-butilo (1,2 eq), DIC (1,2 eq) y DMAP (0,2 eq) en DCM. La mezcla de reacción se agita o/n a temperatura ambiente. El producto bruto se evaporó y se purificó por filtración en gel de sílice. El material purificado se disolvió en éter dietílico y se trató con HCl en éter dietílico. Después de agitar durante 3 horas la mezcla se evapora y el material bruto carga en un oligo de ADN que contiene una función amino.

Experimento de reacción pericíclica usando entidad funcional 13.7.1A y 13.7.1B:

[0187] Las dos oligos cargadas se mezclan con un oligo plantilla en en tampón HEPES (pH = 7,5) y 100 mM. La mezcla se deja a temperatura ambiente durante 4 horas. pH se ajusta entonces a 9 y la mezcla se deja a temperatura ambiente o / n.

[0188] La Fig. 14 se refiere a asimétrica de relleno en el uso de bloques de construcción de XS.
Se muestra una reacción de relleno entre los grupos reactivos (X y S) y moléculas puente (TY). Para mayor claridad, solo se muestra la reacción (no el ligador de escisión) X y S representan los grupos reactivos de la entidad funcional. En este caso los dos grupos reactivos no son de la misma clase. (TY) se añade a la mezcla antes, durante o después de la incorporación de los bloques de construcción. Del mismo modo, la reacción significativa entre X e Y, y entre S y T puede tener lugar durante o después de la incorporación de los bloques de construcción.

[0189] La Fig. 14, el ejemplo 1 muestra un ejemplo de relleno asimétrico de la ligadura de Staudinger modificada y cetona-hidrazida (reacción). Los grupos reactivos X y S de los bloques de construcción son azida e hidrazida. La molécula de agregado que llena los huecos entre los bloques de construcción llevar una cetona y un resto fosfina. Las reacciones entre una cetona y una hidrazida, y entre una azida y una fosfina, son muy quimioselectiva. Por lo tanto, la mayoría de grupos funcionales Rx se puede emplear sin necesidad de protección durante las reacciones. Ejemplos de los restos moleculares R, R1, X e Y se pueden encontrar en (Mahal et al. (1997), Science 276, pp 1125-1128.; Saxon et al. (2000), Organic Letters 2, pp. 2141-2143).

[0190] La Fig. 15 muestra un esquema de reacción general para la síntesis de plantilla de una molécula no lineal. Una plantilla con cuatro codones se mezcla con dos bloques de construcción. La entidad funcional de un bloque de construcción comprende un grupo reactivo X y un grupo funcional R 1. El otro bloque de construcción se compone de tres grupos reactivos Y y un grupo funcional R 2. El bloque de construcción ligado a codón 2 que aquí se llama el andamio, como los grupos funcionales se transfieren a este bloque de construcción durante el proceso.

[0191] Después de la incubación a una temperatura de recocido que asegura eficiente y específica de los dos bloques de construcción a su respectivo codón, y, opcionalmente, el exceso de bloque de construcción se ha eliminado, X se pone a reaccionar con uno de los reactivos grupos Y, por ejemplo, cambiando las condiciones, por desprotección de X o Y, o simplemente aprovechando la pronunciada proximidad de los grupos X e Y cuando los bloques de construcción están obligados a la plantilla.

[0192] En este esquema, X e Y han sido elegidas con el fin de permitir la reacción simultánea y la escisión. Por lo tanto, como resultado de la reacción entre X e Y, el grupo sustituyente (grupo funcional) R 1 se transfiere al andamio. Ejemplo grupos reactivos X e Y que median la reacción simultánea y la escisión se indican en la figura 20. Cualquier par de reactivos grupos X e Y que media reacción simultánea y la escisión se pueden utilizar en este esquema, es decir, diferente de X / Y pares se puede utilizar en cada posición de sustituyente.

[0193] El recocido y la reacción de dos más bloques de construcción conducen a la formación de una molécula de andamiaje que lleva tres sustituyentes (R 1, R 3 y R 4). La identidad de los sustituyentes es determinado por los codones de la plantilla a la que la molécula de andamiaje se adjunta.

[0194] La Figura 16 muestra la síntesis de plantilla de una molécula no lineal, empleando grupos reactivos de diferentes tipos, y la reacción no simultánea y la escisión. Los grupos reactivos X, S, P, Y, T, Q pueden ser de diferentes tipos, y los enlaces formados (XY, ST, y PQ), por tanto, pueden ser de diferentes tipos.

[0195] Después de la reacción y después la escisión del enlazador L (que se une a la entidad funcional del primer bloque de construcción para el anti-codón), el sustituyente (grupo funcional) R1 se transfiere al segundo bloque de construcción (andamio). Por lo tanto, en relación con el esquema de síntesis de la figura 15, se requiere aquí una etapa adicional de escisión enlazador. Después de repetir los procesos de recocido, la reacción de escisión y un número de veces, una molécula de andamiaje se ha formado llevar sustituyentes codificados. La identidad de los sustituyentes es determinado por los codones de la plantilla a la que el andamiaje molécula está unido. La posición de los sustituyentes se determinan por la identidad de los grupos reactivos Y, T y Q del andamio, y por lo tanto determina indirectamente por la identidad del codón a la que se hibrida el bloque de construcción del andamio. Por lo tanto, en esta configuración, la identidad y posición de los sustituyentes, así como la identidad del andamio, se determina por la secuencia de la plantilla. Los pares de reactivos también pueden ser del mismo tipo (por ejemplo, X / Y = S / T = P / Q).

[0196] Fig. 17 da a conocer el principio de la síntesis de plantilla de una molécula no lineal, mediante la explotación de la creciente efecto de proximidad que surge de una "migración" andamio. En esta configuración, la molécula plantilla migra hacia abajo la plantilla a medida que se sintetiza. Esto se hace posible por el uso de dos diferentes enlazadores L x y Ly, escindibles en condiciones diferentes. Como resultado de ello, un alto proximidad se mantiene durante todo el proceso de moldeo, tal como los bloques de construcción que reaccionan en cada etapa de reacción están limitados a regiones codificantes adyacentes en la plantilla.

[0197] La Fig. 18 muestra la síntesis de plantilla de diversas moléculas no lineales.

(A) Se añaden tres bloques de construcción y se hacen reaccionar uno a la vez. Cada bloque de construcción comprende un éster activado (grupo reactivo, (X)) en el que el resto éster lleva un grupo funcional Rx. Tras la reacción entre los ésteres y las aminas en el andamio (andamio se une covalentemente a la plantilla), se forman enlaces de amida, y los grupos Rx están acoplados al armazón por medio de enlaces amida. Este es, pues, un ejemplo de reacción simultánea (amida formación) y la escisión (liberación de la fracción de Rx del anti-codón), véase, por ejemplo fig.15.

(B) De manera análoga a (A), tres aminas reaccionan con tres ésteres para formar tres enlaces amida, acoplando así los grupos funcionales Rx a la fracción de andamio. Sin embargo, a diferencia de (A), el andamio está aquí codificado por la plantilla, y por lo tanto el andamio es aquí parte de la entidad funcional de un bloque de construcción.

(C) Se utilizan tres bloques de construcción. La amina nucleófila (covalentemente unido a la plantilla) ataca el carbonilo del éster del bloque de construcción con destino a la región de codificación 3; la amina del tercer monómero ataca el tioéster del siguiente bloque de construcción incorporada, y después de la incorporación del tercer bloque de construcción, el reactivo de Horner-Wittig Emmans del bloque de construcción reacciona con el aldehído del tercer monómero en condiciones alcalinas. Esto forma la plantilla molécula. El doble enlace puede ser post-plantillas modificado por hidrogenación para formar un enlace saturado, o alternativamente, sometido a una adición de Michael.

(D) El tiol del andamio reacciona con la piridina-disulfuro del bloque de construcción incorporada. La amina del andamio reacciona con el éster del bloque constructivo segunda incorpora. La posición alfa activado por el doble de nitrilo se acila por el tioéster de la siguiente bloque de construcción en presencia de base. Por último, el yoduro de arilo sufre el acoplamiento de Suzuki con el arilboronato de monómero de 4 para producir el resto de biarilo.

(E) El bloque de construcción incorporados acila una de las aminas primarias. El yoduro de arilo se somete a un acoplamiento de Suzuki por reacción con el siguiente bloque de construcción, y la amina bencílica se acila por último bloque de construcción Incorporated.

(F) La acilación de la hidrazina seguida de ciclación conduce a la formación de un hidroxipirazol. Después de la incorporación del segundo bloque de construcción, el bromuro de arilo se somete a acoplamiento de Suzuki con el boronato arilo. Por último, el aldehído reacciona con el reactivo de Wittig-Horner-Emmons del bloque de construcción que se incorpora al lado, para obtener un alfa, beta-amida insaturada, que puede ser modificado o además funcionalizado por cualquiera de reducción con H2 / Pd-C o Miguel Además con nucleófilos. Alternativamente, un cuarto bloque de construcción puede ser utilizado a la plantilla el acoplamiento de un nucleación ofílica sustituyente en la posición del doble enlace.

[0198] Fig. 19 muestra un procedimiento general de síntesis de plantilla, en el que la etapa de reacción se puede realizar bajo condiciones en las que la hibridación específica de bloques de construcción de la plantilla es ineficiente.

[0199] Puede ser deseable llevar a cabo la etapa de reacción (o una de las otras etapas) en condiciones en las recocido de bloques de construcción es en-eficiente. Para resolver este problema potencial, se puede enlazar covalentemente los bloques de construcción incorporados, ya sea químicamente o mediante el uso de una ligasa (cuando el anti-codón comprende un oligonucleótido) o una polimerasa (cuando el anti-codón es por ejemplo un nucleótido). En esta configuración, la plantilla está diseñada para plegarse sobre sí misma.

[0200] En la etapa 1, los dos componentes básicos incorporados se incorporan y se pueden ligar juntos, y estar vinculados a la plantilla, durante o después de su incorporación. Si se desea, las condiciones ahora se pueden cambiar para aumentar la eficiencia de la etapa de reacción que sigue. Luego, en el paso 2, los grupos reactivos X e Y son presentadas a reaccionar. Debido a que los bloques de construcción se unen covalentemente entre sí (y de la plantilla), la reacción se puede realizar bajo condiciones en las que la hibridación de los bloques de construcción en la plantilla es ineficiente. Las condiciones de reacción que pueden no ser compatibles con eficiente recocido y la estructura de doble hélice incluyen disolventes orgánicos, baja en sal y alta temperatura, todos los cuales pueden ser utilizados con la puesta a punto se describe en esta figura.

[0201] Después de la etapa 2 (de reacción), las condiciones se cambian de nuevo, con el fin de permitir la incorporación y covalente eficiente la vinculación de la siguiente bloque de construcción (paso 3). Este ciclo entre las condiciones que permiten la incorporación y la ligadura, y que permite que la reacción, se continúe hasta que se han incorporado y se hace reaccionar el número deseado de bloques de construcción. Por último, algunos de los enlazadores se escinden para dar la molécula plantilla. Como se describió anteriormente, el acoplamiento covalente de los bloques de construcción entre sí permite que la reacción entre sus grupos reactivos que se lleva a cabo bajo condiciones más diversas de lo que sería posible. Además, el acoplamiento covalente entre bloques de construcción hace que sea posible el uso de anti-codones que comprenden secuencias de reconocimiento más cortas. Cuando el anti-codón comprende un oligonucleótido, es generalmente preferido utilizar un oligonucleótido de al menos quince nucleótidos durante la incorporación, con el fin de obtener una alta eficiencia de constitución. Sin embargo, si una ligasa o químico se usa para acoplar de forma covalente los bloques de construcción, un oligonucleótido más corto (4-8 nucleótidos) se puede utilizar. Esto hará que los grupos reactivos X e Y en una proximidad más cercana, y aumentar la concentración local de los grupos correcti- dramáticamente: Si la distancia entre los grupos reactivos se redujo de 16 nucleótidos a 4 nucleótidos, esto aumentará la concentración local 4 3 = 64. Todo lo demás se mantiene igual, esto aumentará la tasa de la reacción por 64 veces.

[0202] Con el fin de cambiar entre las condiciones que permiten la incorporación y el acoplamiento covalente entre bloques de construcción, y las condiciones que permiten que se produzca la reacción de manera eficiente, las plantillas se pueden unir a un material de fase sólida (por ejemplo, perlas de estreptavidina si las plantillas están biotinilados) o las plantillas (con los bloques de construcción asociados a los mismos) pueden ser precipitados y se resuspendieron en tampón apropiado durante las etapas de incorporación y de reacción.

[0203] Fig. La figura 20 muestra los distintos tipos de reacción que permiten reacción simultánea y la activación. Las diferentes clases de reacciones se muestran que median la translocación de un grupo funcional de un bloque de construcción monómero a otro, o a un punto de anclaje. Las reacciones han sido agrupados en tres clases diferentes: sustitución nucleófila, las reacciones de eliminación Adicionalmente, y de metal de transición reacciones catalizadas por estas reacciones son compatibles con reacción simultánea y la activación.

(A) La reacción de nucleófilos con carbonilos. Como resultado de la sustitución nucleófila, el grupo funcional R se transloca al bloque de construcción monómero portador inicialmente el nucleófilo.

(B) El ataque nucleofílico por la amina en el tioéster conduce a la formación de un enlace amida, en efecto translocación del grupo funcional R del tioéster al otro bloque de construcción de monómero.

(C) La reacción entre la hidracina y β cetoéster conduce a la formación de pirazolona, de hecho la translocación de la R y grupos funcionales R 'a otro bloque de construcción de monómero.

(D) La reacción de hidroxilamina con β cetoéster conduce a la formación de la isoxazolona, translocación de ese modo la R y los grupos R 'a otro bloque de construcción de monómero.

(E) La reacción de la tiourea con cetoéster β conduce a la formación de la pirimidina, la translocación de esta manera la R y R 'grupos a otro bloque de construcción de monómero.

(F) La reacción de la urea con malonato conduce a la formación de pirimidina, la translocación de ese modo el grupo R al otro bloque de construcción de monómero.

(G) En función de si Z = O o Z = NH, una reacción de Heck, seguido de una sustitución nucleófila conduce a la formación de cumarina o quinolinon, translocación de ese modo la R y R 'grupos al otro bloque de construcción de monómero.

(H) La reacción de hidrazina y ftalimidas conduce a la formación de ftalhidrazida, translocación de ese modo la R y los grupos R 'a otro bloque de construcción de monómero.

(I) La reacción de ésteres de aminoácido conduce a la formación de dicetopiperazina, translocación de ese modo el grupo R al otro bloque de construcción de monómero.

(J) La reacción de urea con ésteres sustituidos con alfa conduce a la formación de hidantoína, y la translocación de la R y R 'grupos a otro bloque de construcción de monómero.
(K) La alquilación se puede conseguir por reacción de diversos nucleófilos con sulfonatos. Esto se transloca los grupos funcionales R y R 'al otro bloque de construcción de monómero.
(L) La reacción de un alqueno activado-di que contiene un aceptor de electrones y un grupo saliente, por lo que el alqueno se transloca al nucleófilo.
(M) La reacción de disulfuro con mercaptano conduce a la formación de un disulfuro, la translocación de ese modo el grupo R 'a la otro bloque de construcción de monómero.
(N) La reacción de ésteres de aminoácidos y cetonas amino conduce a la formación de benzodiazepinona, translocación de ese modo el grupo R al otro bloque de construcción de monómero.
(O) La reacción de los fosfonatos con aldehídos o cetonas conduce a la formación de alquenos sustituidos, por lo tanto trans-localizar el grupo R "al otro bloque de construcción de monómero.
(P) La reacción de boronatos con arilos o heteroarilos resultados en la transferencia de un grupo arilo al otro bloque de construcción monómero (para formar un biarilo).
(Q) La reacción de sulfonatos de arilo con boronatos conduce a transferencia del grupo arilo.
(R) La reacción de boronatos con vinilos (o alquinos) da como resultado la transferencia de un grupo arilo al otro bloque de construcción de monómero para formar un vinilareno (o alkynylarene).
(S) La reacción entre boronatos y haluros de arilo alifáticos, en los que el grupo alquilo se transloca para producir una alquilareno.
(T) de metal de transición catalizada alfa-alquilación mediante la reacción entre un enol éter y un arylhallide, translocación de ese modo la parte alifática.
(U) condensaciones entre, por ejemplo enaminas o enoléteres con aldehídos conducen a la formación de carbonilos o alfa-alfa-hidroxi, carbonilos beta-insaturados. La reacción se transloca la parte nucleofílica.
(V) La alquilación de haluros de alquilo por ejemplo enaminas o enoléteres. La reacción se transloca la parte nucleofílica.
(W) [2 + 4] cicloadición, translocación del dieno partes.
(X) [2 + 4] cicloadición, translocaciones de la eno-parte.
(Y) [3 + 2] cicloadición entre azidas y alquenos, que conducen a los triazoles por la translocación de la eno-parte.
(Z) [3 + 2] cicloadición entre nitriloxides y alquenos, que conducen a isoxazoles por la translocación de la eno-parte.

[0204] La figura 21 muestra pares de grupos reactivos (X) e (Y), y la unión resultante (XY). Una colección de grupos reactivos que puede usarse para la síntesis de plantilla tal como se describe en la presente memoria se muestran, junto con los enlaces formados en su reacción. Después de la reacción, puede ser necesaria la escisión (por ejemplo, véase la fig. 8).

[0205] Fig. 22 muestra un método para aumentar el efecto de proximidad de la plantilla: La cremallera de la caja.

[0206] Panel A describe enlazadores que llevan las cajas oligonucleótido cremallera (a) y (b) que son complementarios. Por operativo a una temperatura que permite la interacción transitoria de (a) y (b), los grupos reactivos X e Y se ponen en estrecha proximidad durante varios eventos de recocido y el capítulo de fusión, que tiene el efecto de mantener X e Y en estrecha proximidad en una mayor fracción del tiempo que de otro modo alcanzable. Alternativamente, un ciclo de mayo de la temperatura entre una temperatura baja (donde las cajas de cremallera pairwise interactuar de manera estable), y una temperatura más alta (en donde las cajas de la cremallera están separados, pero en el que el anti-codón permanece de forma estable unidos al codón de la plantilla). Por el ciclismo entre la alta y a baja temperatura varias veces, un grupo reactivo dado X se expone a varios grupos reactivos Y, y, finalmente, van a reaccionar para formar un enlace XY. Como una alternativa final, la temperatura se puede mantener apropiadamente bajo que las dos hebras de la caja de la cremallera (A y B) están asociados de forma estable. Independiente de cuál de estos protocolos es seguido, los bloques de construcción se debe agregar a la mezcla de reacción a una temperatura lo suficientemente elevada donde la interacción entre el codón y anticodón es específico. Una vez que los bloques de construcción se han asociado específicamente con la plantilla, la temperatura se puede bajar, y los protocolos alternativos descritos anteriormente, seguido, a fin de lograr una alta eficiencia de reacción.

[0207] Cuando el anti-codón es un oligonucleótido (por ejemplo, ADN, ARN) o análogo de oligonucleótido (por ejemplo, PNA, LNA), puede ser práctico utilizar una cadena de nucleótidos continua, que comprende tanto el anti-codón, enlazador y cremallera -box (ver (B) más adelante).

[0208] El panel B muestra las secuencias de dos bloques de construcción basados en oligo ADN. El anti-codón ("región de hibridación"), enlazador y la cremallera de la caja se indican. Por lo tanto, en este ejemplo, una molécula de ADN lineal constituye el anti-codón, el enlazador que conecta la entidad funcional y el anti-codón, y la caja de cremallera. Los grupos X reactivos (ácido carboxílico) y Z (una amina) se acoplan a la extremo 3 'del oligo ADN 1 y el extremo 5' del oligo ADN 2, respectivamente. Una secuencia de plantilla a la que oligo 1 y oligo 2 se recocer podría contener la siguiente secuencia: 5'-CCGATGCAATCCAGAGGTCG- GCTGGATGCTCGACAGGTC.

[0209] Fig. 23 muestra tres métodos de cómo el efecto de proximidad puede aumentarse:

(A) de la hélice de apilamiento, (B) Ligadura y (C) enlazadores rígidos.
Dos bloques de construcción con a base de oligonucleótido recocido anti-codones a sus respectivos codones (en la figura, la piedra angular de la izquierda es un "andamio" que lleva cuatro grupos reactivos, y el bloque de bloques de la derecha lleva una entidad funcional con, por ejemplo, un grupo reactivo, es decir, el último bloque de construcción puede llevar a que el sustituyente se unirá al andamio. dobles hélices tienden a apilar, especialmente si la secuencia de los extremos opuestos de las hélices se ha diseñado con el fin de optimizar esta interacción (por ejemplo, por la presencia de la secuencia GGG en los extremos de las estructuras dúplex). Esta tendencia apilamiento traerá los dos bloques de construcción en una proximidad más cercana, a su vez, aumentar la eficiencia de reacción entre las entidades funcionales. Si los "bloques de construcción de sustituyente" tienen anti-codones con temperaturas de fusión más bajas que la de los "bloques de construcción de andamios", el bloque sustituyente puede ser retirado después de su reacción con el bloque de construcción del andamio, antes de que se incorpora el siguiente bloque de construcción.
De esta manera, la región de plantilla entre dos bloques de construcción que reaccionan puede mantenerse de cadena sencilla, lo que permite que esta región de salida de bucle y dejar las dos estructuras dúplex de pila durante la reacción entre los dos bloques de construcción.

(B) Ligadura de bloques de construcción. Los anti-codones de dos bloques de construcción pueden ser químicamente o enzimáticamente ligado juntos. El acoplamiento de dos anti-codones aumentará la eficiencia de recocido. Por lo tanto, más pequeñas anti-codones se pueden utilizar si se ligó junto con el bloque de construcción previamente incorporada. Como ejemplo, primero añadir un bloque de construcción (o simplemente un oligo de ADN 20-nucleótidos) con una temperatura de fusión de, por ejemplo 60 ° C. A continuación, añadir otro bloque de construcción (por ejemplo, con un ADN 8-nucleótidos anti-codón) con una baja temperatura de fusión y por lo tanto sólo es capaz de transitoriamente inter- actuando con la plantilla a la temperatura ambiente. Si se emplea una ADN ligasa, o si el anti-codón se puede ligar al anti-codón de la primera bloque de construcción químicamente, a continuación, el segundo bloque de construcción llegará a ser firmemente unido a la plantilla, a pesar de su corta longitud de sólo 8 nucleótidos. Por lo tanto, la ligadura permite el uso de más cortos anti-codones, que a su vez conducen a los grupos reactivos en una proximidad más cercana.

(C) enlazadores rígidos. Mediante el uso de enlazadores que comprenden una o más regiones flexibles ("bisagras") y una o más regiones rígidas, la probabilidad de que dos entidades funcionales que consiguen en contacto reactivo puede aumentar.

a. Símbolo utilizado para la construcción de bloque con una parte rígida y dos bisagras flexibles.
b. Un bloque de construcción con las características descritas en (a). El bloque de construcción contiene un beta diana oligonu- cleotide continuo, que constituye tanto el anti-codón (línea horizontal), y el enlazador (línea vertical) que conecta la entidad funcional (FE) con el anti-codón. Recocido de una secuencia complementaria a la parte central del enlazador conduce a la formación de una doble hélice rígida; en cada extremo del enlazador una región de cadena simple se mantiene, lo que constituye las dos bisagras flexibles.

[0210] Fig. 24 da a conocer diversos enlazadores escindibles. Se muestra un número de enlazadores escindibles, así como los agentes que les escinden y los productos de la escisión-reacción. Además, los catalizadores, incluyendo enzimas y ribozimas, también se pueden usar para escindir el enlazador. enzimas ejemplares son proteasas (por ejemplo quimotripsina), nucleasas, esterasas y otras hidrolasas.

[0211] Fig. La figura 25 muestra dos formas diferentes de síntesis de plantilla mediante la generación de un nuevo grupo reactivo. En los casos en que la reacción de X e Y conduce a la formación de un nuevo grupo reactivo Z, esto puede ser aprovechado para aumentar la diversidad de la molécula plantilla, mediante la incorporación de bloques de construcción que tienen grupos reactivos que reaccionan con Q Z. Con este enfoque, la moléculas plantilla pueden ser estructuras muy compactas, y por lo tanto, este enfoque describe un método para hacer bibliotecas altamente sustituido (funcionalizados y diversos) de moléculas de peso molecular relativamente bajo.

(A) En primer lugar, un bloque de construcción que lleva un grupo reactivo X y un bloque de construcción que lleva un grupo reactivo Y se incorpora, después de lo X e Y reaccionar, que conduce a la formación del enlace Z. A continuación, un bloque de construcción que lleva un grupo reactivo se añade Q, después de lo Z reacciona con Q, para formar el enlace ZQ. En este ejemplo, tanto la reacción de X con Y, y de Z con Q, son reacciones que implican reacción simultánea y la escisión.

(B) En primer lugar, un bloque de construcción que lleva un grupo reactivo X y un bloque de construcción que lleva un grupo reactivo Y se incorpora, después de lo X e Y reaccionar, que conduce a la formación del enlace Z. A continuación, un bloque de construcción que lleva un grupo reactivo se añade Q, después de lo Z reacciona con Q, para formar el enlace ZQ. En este ejemplo, la reacción de Z con Q no implica escisión simultánea, por lo cual se introduce una etapa adicional de escisión enlazador.

[0212] Fig. 25, ejemplo 1, muestra una síntesis de plantilla mediante la generación de un nuevo grupo reactivo. La reacción de las entidades funcionales de los tres primeros bloques de construcción conduce a la formación de dos enlaces dobles, que pueden reaccionar con dos hidroxilaminas realizadas en los bloques de construcción añadidos en las últimas etapas, y conduce a la formación de un éster, que puede reaccionar con la hidroxilamina, codificada por un bloque de construcción. Por último, los enlazadores se escinden, la generación de la plantilla molécula.

[0213] Fig. La figura 26 muestra los diferentes métodos de realizar modificaciones posteriores a la molécula plantilla en con plantilla. Después del proceso de moldeo se ha realizado, las moléculas plantilla pueden ser modificados para introducir nuevas características. Esta lista describe algunas de estas modificiations posterior a la de plantillas.

[0214] Fig. 27 ilustra un método preferido para la selección de moléculas de molde-se presentan.

[0215] La Figura 28 muestra los complejos de propuestas que se pueden formar cuando una etapa de reacción se lleva a cabo usando montajes que permiten el apilamiento de los dúplex de ADN.

[0216] La Figura 29 muestra una autorradiografía de un análisis en gel de poliacrilamida de la reacción entre bloques de construcción.

[0217] La Figura 30 muestra la entidad funcional Feuston 3, así como el ligando Feuston 5. La estructura 1 muestra la entidad funcional Feuston 3, que se necesita, junto con Gly y Asp para crear Feuston 5 estructura 2, un ligando que se une a la V α β del receptor de integrina 3 (como se describe en prensa; Feuston BP et al. J Med Chem. 2002 Dec 19;45(26):5640-8)

[0218] La Figura 31 muestra la estructura de la protegida pentenoílo aspartato. Estructura del pentenoílo protegida AS- aspartato entidad funcional se utiliza para cargar un modificado amino oligo andamio, para crear el ligando Feuston 5.

[0219] La Figura 32 muestra el uso de alilglicina bloques de construcción. Alilglicina química ilustrada por la estructura que muestra el producto reticulado, así como producto transferido después de la escisión por el yodo.

[0220] La Figura 33 muestra la autorradiografía de un gel de poliacrilamida. Una autorradiografía que muestra las tres transferencias de ß -Ala a un modificado amino oligo andamio, este oligo andamio está marcado radiactivamente. Los carriles 1, 3 y 5 se muestra reticulado del producto entre amina andamio y β entidad funcional ácido carboxílico Ala AG para las transferencias de 1, 2 y 3. Los carriles 2, 4 y 6 muestra escinden producto, es decir que lleva la entidad funcional transferida andamio.

[0221] La Figura 34 muestra un análisis Elisa del producto del proceso de codificación de dos pasos. Resultado del ELISA realizado sobre el ligando feuston 5 generada por transferencias secuenciales a un oligo andamio (primera columna). Los controles son el péptido RGD, que es un ligando de la integrina (segunda columna;) cargado en un oligo 20 mer, y los pozos no recubiertos (no integrina inmovilizada; tercera y cuarta columnas).

Ejemplos

[0222] En los siguientes ejemplos, se utilizan bloques de construcción que contienen un cuadro de la cremallera adyacente a la entidad funcional. Las secuencias de caja de la cremallera están subrayadas a continuación. Los siguientes tampones y protocolos se utilizan en los mismos tres ejemplos.
Tampones.

[0223]Buffer A (100 mM Hepes pH = 7,5; 1 M NaCl) Tampón B (20 mM Hepes pH = 7,5; NaCl 200 mM) 5'-etiquetado con 32 P.

[0224] Mix 5 pmol de oligonucleótido, 2 m l de 10 x tampón de fosforilación (nº de cat # 4103), 1 m l T4 polinucleótido quinasa (Nº de cat # 4103), 1 m l γ - 32 P ATP, añadir H2O a 20 m l. Se incuba a 37 ° C 10-30 minutos. PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida).

[0225] Las muestras se mezclan con colorante de formamida 1: 1 (98% de formamida, EDTA 10 mM, pH 8, 0.025% de xileno cianol, 0,025% azul de bromofenol), se incubó a 80 ° C durante 2 minutos, y se ejecuta en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10%. Desarrollar gel usando autorradiografía (Kodak, película BioMax).

Ejemplo 1

[0226] El efecto de la temperatura sobre la eficacia de la reacción alterna en el sistema de caja de la cremallera.

[0227] ADN-oligos:

X = carboxi-dT (Glen Research, nº de cat 10-1035
6 = amino-modificador 5 (cat. Nr. 10-1905)

AH 316: **5'-6** GTAAC AGACCTGTCGAGCATCCAGCT
AH 331: 5'-CGACCTCTGGATTGCATCGGTGTTACX

AH140: 5'-
AGCTGGATGCTCGACAGGTCAGGTCGATCCGCGTTACCAG**TCTTGCC-TGAACGTAGTCGT**CCGATGCAATCCAGAGGTCG

Experimental.

[0228] Mix 10 m l Tampón A, 1 pmol AH 331 (marcada con 32P), 10 pmol AH 316, 5 pmol AH 140, y añadir H2O a 50 m l. Recocido de 80 ° C a 30 ° C (-1 ° C / 30 sek). Luego se diluye 100 veces en tampón B + 50 mM DMT-MM. (Preparado de acuerdo con Kunishima et al. Tetrahedron (2001), 57, 1551) disueltos en ddH 2 O. Incubar a uno de los 8 perfiles de temperatura diferentes o / n (6 temperaturas constantes diferentes (15 ° C; 17,8 ° C; 22,7 ° C; 28,3 ° C; 31,0 ° C; o 35,0 ° C; o alternando entre 10 ° C durante 5 s. y 35 ° C durante 1 seg.); o alternando entre 20 ° C durante 5 s. y 45 ° C durante 1 seg). Analizar mediante electroforesis en gel de urea de poliacrilamida 10%.

Resultados.

[0229] El análisis en gel de poliacrilamida demostró que un más eficientes resultados de la reacción de alternancia de la temperatura entre 10 ° C y 35 ° C, en lugar de realizar la reacción a una temperatura constante de 15 ° C, 17,8 ° C, 22,7 ° C, 28,3 ° C, 31,0 ° C, o de 35,0 ° C.

Ejemplo 2

El efecto de apilamiento en la eficiencia de reacción.

[0230] ADN-oligos:

X = carboxi-dT (nº de cat 10-1035)
Z = amino-modificador C6 dT (nº de cat 10-1039)
6 = amino-modificador 5 (nº de cat 10-1905)

AH36: 5'-
CGACCTCTGGATTGCATCGGTCATGGCTGACTGTCCGTCGAATGTGTC-CAGTTACX

AH38: 5'- AGCTGGATGCTCGACAGGTCCCGATGCAATCCAGAGGTCG

AH51: 5'-
ZGTAACACCTGTGTAAGCTGCCTGTCAGTCGGTACTGACCTGTCGAG-CATCCAGCT

AH 137: 5'-ACGACTACGTTCAGGCAAGA

AH138: 5'-
TCTTGCCTGAACGTAGTCGTAGGTCGATCCGCGTTACCAGAGCTG-GATGCTCGACAGGTCCCGATGCAATCCAGAGGTCG

AH139: 5'-CGACCTCTGGATTGCATCGG

AH143: 5'-
CTGGTAACGCGGATCGACCTTCATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCT-
GACTGTCCGTCGAATGTGTCCAGTTACX

AH 202: 5'-TCTGGATTGCATCGG GTTAC X
AH 270: 5'-6 GTAAC GACCTGTCGAGCATCCAGCT

AH 286: 5'-
AGCTGGATGCTCGACAGGTCAAGTAACAGGTCGATCCGCGTTA-
TATCGTTTACGGCATTACCCGTATAGCCGCTAGATGCCCAACCATGACG
GCCCATAGCTTGCGGCTTGC

AH 320: 5'-
AGCTGGATGCTCGACAGGTCAGGTCGATCCGCGTTACCAGGCC-
CATAGCTTGCGGCTTGCTGCAGTCGATGGACCATGCCTCTTGCCT-
GAACGTAGTCGTCCGATGCAATCCAGAGGTCG

AH 321: 5'-CAAGAGGCAT
AH 322: 5'-TCAGGCAAGAGGCATGGTCC
AH 342: 5'-TACTTGACCTGTCGAGCATC GTTAC X
AH 343: 5'-6 GTAAC CAGCTGCAAGCCGCAAGCTATGGGC

Experimental.

[0231] Mezcla tampón A y oligos correspondientes (ver tabla abajo).

Experimento	Oligo1 (^{32}P-etiquetados)	Oligo 2	Oligo 3 Plantilla	Oligo 4	Oligo 5	Tope A	H_2O a
1	5 pmol AH 36	10 pmol AH 51	10 pmol AH 38			2 ml	10 ml
2	5 pmol AH 143	10 pmol AH 51	10pmol AH 138	10 pmol AH 139	10 pmol AH 137	2 ml	10 ml
3	1 pmol AH 202	10 pmol AH 270	5 pmol AH 320			10 ml	50 ml
4	1 pmol AH 36	10 pmol AH 51	5 pmol AH 320			10 ml	50 ml
5	1 pmol AH 202	10 pmol AH 270	5 pmol AH 320	50 pmol AH 321		10 ml	50 ml
6	1 pmol AH 36	10 pmol AH 51	5 pmol AH 320	50 pmol AH 321		10 ml	50 ml
7	1 pmol AH 202	10 pmol AH 270	5 pmol AH 320	50 pmol AH 322		10 ml	50 ml
8	1 pmol AH 36	10 pmol AH 51	5 pmol AH 320	50 pmol AH 322		10 ml	50 ml
9	0,2 pmol AH 342	2 pmol AH 343	1 pmol AH 286			2 ml	10 ml
10	0,2 pmol AH 342	2 pmol AH 343	1 pmol AH 286	4 pmol AH 356		2 ml	10 ml
11	0,2 pmol AH 342	2 pmol AH 343	1 pmol AH 286	4 pmol AH 357	4 pmol AH 358	2 ml	10 ml

[0232] Recocido de 80 ° C a 30 ° C (-1 ° C / min). Añadir 0,5 M DMT-MM. (Preparado de acuerdo con Kunishima et al. Tetraedro (2001), 57, 1551) disuelto en H 2 O. a una concentración final de 50 mM. Incubar a 10 ° C durante 5 s. y luego 25 ° C durante 1 seg. Repetir o / n.
Analizar mediante electroforesis en gel de urea de poliacrilamida 10%.

Resultados:

[0233] Con el fin de probar el efecto de apilamiento de los dúplex de ADN en la eficiencia de reacción, se diseñó un número de diferentes configuraciones de plantillas y bloques de construcción (véase la Figura 28). Se alcanzaron las siguientes conclusiones:

[0234] La Figura 28,1 y la Figura 29, carril 1: reacción de referencia entre dos bloques de construcción recocida a sitios adyacentes en la plantilla. Como era de esperar se observa una reacción eficiente. En esta configuración, los dos bloques de construcción se hibridan a la plantilla y de ese modo formar dúplex de ADN que pueden apilar una sobre otra.

[0235] La Figura 28,2 y la Figura 29, carril 2: En esta configuración, los dos bloques de construcción se hibridan a los sitios adyacentes en la plantilla. Sin embargo, los dos ADN dúplex se apilan una sobre otra, básicamente, la formación de una larga dúplex de ADN. Este dúplex rígido no permite que los dos bloques de construcción para doblarse alrededor de la bisagra flexible que de otro modo podrían estar presentes en la conexión punto entre los dos dúplex (es decir, la posición de la muesca en el ADN). En consecuencia, no se observa ninguna reacción significativa entre los dos bloques de construcción.

[0236] La Figura 28,3 y la Figura 29, carril 3; y la Figura 28,4 y la Figura 29, carril 4: A pesar de que los dos bloques bloques de hibridarse a sitios separados por 80 nucleótidos, la reacción es aún muy eficiente. Especulamos que esto se debe de apilamiento, es decir, los que intervienen 80 nucleótidos se enlazan a cabo como consecuencia de esto, y por lo tanto, las dos entidades funcionales se ponen en estrecha proximidad.

[0237] En el experimento de la Figura 29, carril 3 el enlazador que conecta la entidad funcional al elemento que complementa es corto (5 nucleótidos); En la Figura 29, carril 4 es largo (35 nucleótidos). Sin embargo, ambas longitudes de engarce resultan en una reacción eficiente.

[0238] La Figura 28, 5 y en la Figura 29, carril 5; y la Figura 28, 6 y la Figura 29, carril 6: Los sitios de hibridación y la separación entre ellas son idénticos a los del experimento descrito anteriormente (Figura 28, 3 y 4; Figura 29, carriles 3 y 4). Además, un corto oligo (10 nucleótidos) se ha hibridado con la región central de la plantilla. Este resultado en una disminución drástica de la eficacia de la reacción de los bloques de construcción con los enlazadores cortos (carril 5); la eficacia de la reacción de los bloques de construcción con los enlazadores largos está sólo ligeramente afectada en todo caso por la hibridación del oligo corta. Como se indica por el sugirió la estructura de los complejos (Figura 28, 5 y 6), creemos que esto es a causa de apilamiento de los 3 dúplex de ADN para generar un duplex "extendida": Los engarces cortos no pueden llegar a través de la doble hélice extendida; las largas enlazadores pueden llegar a través de la estructura duplex extendida y la eficacia de la reacción no se ve afectada de manera significativa.

[0239] La Figura 28, 7 y la Figura 29, carril 7; y la Figura 28, 8 y en la Figura 29, carril 8: Como inmediatamente anterior, excepto que un largo oligo 20 de nucleótidos se hibrida con la región central de la plantilla. En este caso, ninguno de los enlazadores (corta o de largo) puede llegar a través de los dúplex extendidos, y como resultado se observa poca o ninguna reacción.

[0240] La Figura 28,9 y la Figura 29, carril 9; Figura 28,10 y la Figura 29, carril 10; y la Figura 28,11 y la Figura 29, carril 11: En estos experimentos, los bloques de construcción están orientadas al "otro lado", es decir, la unión que conecta el elemento complementando y la entidad funcional está cerca de los extremos de la plantilla. Además, el elemento complementando del bloque de construcción de la izquierda contiene una secuencia de 5 nucleótidos que es complementaria a otro extremo de la derecha de la plantilla. Como resultado, el bloque de construcción debe ser capaz de circularización la plantilla, como se representa en las figuras 27, 9-11. Estas estructuras circulares también deben ser estabilizados por una estructura dúplex extendido a través de los extremos de la plantilla. En los experimentos de carriles 10 y 11, un corto oligo (10 nucleótidos) o dos oligos largos (cada uno de 20 nucleótidos) son recocidas a la región central. Esto no tiene efecto en la eficacia de la reacción, en correlación con la propuesta de que los bloques de construcción se apilan una sobre otra a través de una circularización de la plantilla, con lo que las entidades funcionales en estrecha proximidad.

Ejemplo 3

Las transferencias de un solo paso de entidades funcionales.

[0241] ADN-oligos:

7 = tiol-Modifier C6 SS (Glen Research, cat.no.10-1936) Z = amino-modificador C6 dT (10 a 1039) P = Spacer PC (10-4913)

AH136: 5'- AGCTGGATGCTCGACAGGTCTCTTGCCTGAACGTAGTCG-TCCGATGCAATCCAGAGGTCG

AH 174: 5'-TACGTTCAGGCAAGAGT6CCA GTTAC 7
AH 190: 5'-Z GTAAC ACCTGPTGACCTGTCGAGCATC

Experimental:

[0242] La carga de NHM en el ADN de oligo-:

Secado de 10 nmol oligo ADN (AH 174) y después se resuspendió en 50 m l de DTT 100 mM (1,4-ditio-L-treitol D-9760 Sigma) en fosfato 50 mM de tampón de pH = 8. Incubar a 37 ° C durante 1 hora.
La purificación en Microspin G-25 (Amersham Biosciences, 27-5325-01).
Añadir 50 m l 200 mM NHM (N-hidroximaleimida Fluka 55510) y se incuba a 25 ° C durante 2 horas.
La purificación en Microspin G-25 equilibrada en H2O.

[0243] La carga de bloques de construcción (4-pentenoico-ácido, ß-Ala-Boc o CH3COOH) en el NHM-ADN-oligo:

Mezclar 50 m l EDC 100 mM y 50 m l bloque de construcción 100 mM. Incubar a 25 ° C durante 30 minutos.
A continuación, mezclar 500 pmol NHM-ADN-oligo (AH174-NHM) y 10 m l de la mezcla de bloques EDC / construcción arriba. Añadir 100 mM MES pH = 6 a 20 m l. Incubar a 25 ° C durante 5 minutos.
La purificación en Micro Bio-Spin columnas de cromatografía P6 (Bio-Rad 732-6221) equilibrada en MES 100 mM pH = 6.

[0244] Transferencias:

Mezclar 350 pmol AH136, 300 pmol AH190 y 500 pmol bloque de construcción cargado AH 174. Añadir Tampón A a 50 m l.
Recocido de 60 ° C a 25 ° C (-1 ° C / 30 seg.)
Incubar a 10 ° C durante 5 s. y luego 25 ° C durante 1 seg. Repetir o / n.
La purificación en columnas de cromatografía Micro Bio-Spin P6 equilibrada en H2O

Resultados:

[0245] Las transferencias fueron analizados por MS, véase la tabla siguiente. Se observaron eficiencias de transferencia de 20-34%.

eficiencia de transferencia		
4-pentenoico-ácido	ß-Ala-Boc	CH_3COOH
33-34%	20-23%	29-33%

Ejemplo 4

Transferencia de varios pasos de entidades funcionales a un oligonucleótido andamio

[0246] En este ejemplo tres entidades funcionales se transfieren a un amino modificado oligo andamio por una de tres pasos de reacción, y se analizó mediante un gel de acrilamida desnaturalizante usando etiquetado radio.

La carga de las entidades funcionales de oligonucleótidos modificados para crear bloques de construcción.

[0247] 5 nmoles de ácido modificado tres oligos de bloque de construcción carboxílicos [AH 155; GAC 5'CTG GTA ACG CGG ATC CTG TTA CT-COOH 3 '; AH 272 5'ACG ACT ACG TTC AGG CAA GAG TTA CT-COOH 3 'y 5'-AH 202 TCT GGA TTG CAT CGG CTG TTA CT-COOH 3'] (todos los oligonucleótidos descritos ordenados de la tecnología del ADN, Aarhus, Dinamarca) uno de cada una de las tres posiciones que corresponden a la plantilla fueron cargados con éster metílico -Alanina β acoplado a alilglicina n-Boc seguida de desprotección de Boc (β -AlaOMe AG). La carga se realizó mediante la incubación de cada uno de los oligos con 10 mM ß -AlaOMe AG, 75 mM DMT-MM en tampón mM Hepes-OH 150, pH 7,5 a un volumen final de 50 m l a 25 ° C agitación durante la noche. A continuación, añadir 5 m l 1 M NH 4-acetato, se incubó a 25 ° C durante 10 minutos, después se purificó en columna Spin con ddH2O columnas equilibradas (columnas de cromatografía Micro Bio-Spin P-6, Bio-Rad). La desprotección del ácido protegido grupo metilo se realizó mediante la adición de 0,5 m l NaOH 2 M a los oligos e incubando durante 10 min a 80 ° C. Por último, el oligos fueron columna de centrifugación purificada y cargas confirmados por espectrometría de masas.

Las transferencias de entidades funcionales de andamio oligo.

[0248] Con el fin de ser capaz de analizar las transferencias de entidades funcionales utilizando análisis en gel de acrilamida, el oligo andamio [MDL251 5'amino-C6 dT-ACC TGT CGA GCA TCC AGC T 3 '] se marcó radiactivamente en el extremo 3'. 50 pmol del oligonucleótido se marcó con 10 m l ddATP α P32 (Amersham Biosciences) mediante la adición de 4 m l 10X NEBuffer 4,4 m l 10X CoCl2 y 35 unidades de desoxinucleótido transferasa terminal (New England Biolabs) y agua hasta un volumen final de 40 m l. Mezcla incubó a 37 ° C durante 1 hora. etiqueta oligo purificó utilizando una columna giratoria ddH2O equilibrada.

[0249] 12,5 pmol del oligonucleótido marcado andamio, 125 pmoles de oligo cargado bloque de construcción AH 202, correspondiente a la posición tres en la plantilla pmol plantilla y 62,5 [AH 154 5 'AGC TGG ATG CTC GAC AGG TCA AGT AAC AGG TCG ATC CGC GTT ACC AGT CTT GCC TGA ACG TAG TCG TCC GAT ATC GCA CAG AGG TCG 3 '] se incubó en una volumen final de 45 m l que contiene 20 mM Hepes-OH pH 7,5, tampón 200 mM de NaCl. Los oligos se hibridaron por calentamiento a 80 ° C y slowely bajar a 20 ° C (1 ° / min) usando un termociclador (Eppendorf, Mastergradient) Tras la se añadió recocido 5 m l 0,5 M DMT-MM. Muestra reticulado, véase la figura 32 en bicicleta durante la noche a 10 ° C 10 seg / 35 ° C 1 seg.

[0250] La muestra fue purificado en columna giratoria y el producto reticulado escindido para dar la primera transferencia de β-Ala de andamio oligo amina mediante la adición de 10 m l I2 25 mM disuelto en 1: 1 tetrahidrofurano: H2O y se incubaron a 37 ° C durante 1,5 horas. Seguido de la adición de 1,5 m l 1 M β - mercapotethanol y después se purificó con dos columnas de centrifugación equilibradas. La muestra se secó por completo hacia abajo y oligos volvió a disolver en 30 m l ddH2O. Transfer 2, oligo AH 272 y la transferencia de 3, 202 AH se realizaron de la misma manera exacta como se acaba de describir, que incluye el recocido, la reticulación y la escisión. Para cada restante ronda añadiendo misma cantidad de la construcción de bloques de oligo, 125 pmol.

[0251] Las muestras para el análisis se llevan a cabo a lo largo del camino, antes y después de la reticulación de las tres transferencias, que fueron analizados en un gel de acrilamida desnaturalizante al 10%, ver figura 33. Como puede verse, la reticulación eficiencia (etapa 1) fue de aproximadamente 50% (Figura 33, carril 1). Esto fue seguido por una escisión casi 100% de eficiencia (carril 2), lo que resulta en la transferencia de la β - resto Ala en el andamio. Esto es seguido por la reticulación / escisión de la etapa 2 y 3 (carriles 3 + 4, 5 + 6) para generar el producto final en el oligo andamio. El producto contiene así los tres restos de Ala beta transferidos.

Ejemplo 5

<u>la transferencia de dos etapas y el análisis funcional por ELISA.</u>

[0252] En este ejemplo dos entidades se transfieren a un oligo andamio por una reacción de dos etapas para producir un ligando, Feuston 5 (véase la figura 30) que se une al receptor de la integrina α V β 3. El producto del proceso de dos pasos se analizó por ELISA.

[0253] <u>La carga de las entidades funcionales de oligonucleótidos modificados para crear bloques de construcción.</u>

[0254] Se utilizaron dos oligos de bloques de construcción, AH 155 (véase más arriba) cargado con Feuston 3 alilglicina. Feuston 3 es un derivado de los Feuston 5 ligando ver fig 30 (F3OMeAG) y AH 272 (ver arriba) cargado con alilglicina glicina (GlyO- Meag) de acuerdo con el protocolo anterior (ejemplo Xa) para cargas de alilglicina entidades funcionales a oligos modificados con ácidos carboxílicos. 10 nmoles de cada uno se cargó en dos reacciones cada una.
Para crear el ligando Feuston 5 aspartato también se necesita. Por lo tanto aspartato que se carga como un pentenoílo (amina) y metilo (ácido carboxílico) protegida entidad funcional véase figura 31, a un andamio modificada amino oligo [AH 270; 5 ' amino-GTA ACG ACC TGT CGA GCA TCC AGC T 3 ']. La carga se realiza mediante la mezcla de 25 m l mM EDC 150 (N- (3- dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida, Fluka), 25 m l NHS (N-hidroxisuccinimida, Sigma) y 5 ml 100 mM de la entidad funcional aspartato protegido pentenoílo, todos los reactivos se disolvieron en N, N-dimetilformamida, DMF. Se incubaron a 25 ° C durante 40 min. A esta mezcla de 5 nmol de la oligo andamio, AH 270 resuspendió en 30 m l 150 mM Hepes-OH se añadió 7,5 pH y esto se incubó agitando durante la noche a 25 ° C. El grupo de protección de amina era pentenoílo desprotegió mediante la adición de 20 m l I2 25 mM disuelto en 1: 1 tetrahidrofurano: agua y se incubaron a 37 ° C durante 2 horas. Seguido de purificación en columna giratoria, y la carga confirmada por análisis de espectro de masas.

<u>Las transferencias de entidades funcionales de andamio oligo.</u>

[0255] Las transferencias se realizaron de la misma manera como se describió anteriormente, pero usando cantidades más grandes de oligo para asegurar que no ser lo suficientemente ligando creado para dar una señal suficiente en el ELISA. Para la primera ronda se emplearon las siguientes cantidades: 850 pmoles de oligo andamio cargado; AH 270, 7500 pmol bloque de construcción cargada oligo; AH 272 y 3250 pmol plantilla de oligo AH 140 [5 'AGC TGG ATG CTC GAC AGG TCA GGT CGA TCC GCG TTA CCA TTG GTC CCT GAA CGT CGT AGT CCG ATG CAA TCC AGA GGT CG 3']. La segunda ronda, la adición de 7500 pmol bloque de construcción cargada oligo AH 155 para una transferencia. El creado Feuston 5 ligando en el oligo andamio todavía tenía un grupo metilo protegido en el aspartato, que se desprotegió tal como se ha descrito antes. Mediante la adición de 0,5 l m NaOH 2

M a los oligos y la incubación a 80 ° C durante 10 minutos. La muestra de este tiempo, aunque se calibra con un pH de 0,5 m l HCl 2 M y ahora estaba listo para el análisis ELISA.

ensayo ELISA

[0256] Maxisorb placas (Nunc Maxisorp Immunomodule U8. Biotecline) se recubrieron con α V β 3 integrina 0,1 receptor m g / pocillo en PBS durante la noche a 4 ° C. Los pocillos se bloquearon con 300 m l tampón que contenía PBS de bloqueo, 0,05% de Tween 20 (Sigma), 1% de BSA (Sigma), 0,1 mg / ml de ADN de esperma de arenque (Sigma), durante 3 horas a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 5 * 300 m l usando tampón de lavado que contiene PBS, 0,05% Tween 20, 1% de BSA. La muestra preparada anteriormente que contenía la muestra se añadió Feuston 5 ligando en un oligo andamio a un pozo, el control para el experimento de ser un oligo 20 mer cargado con el péptido RGD, un ligando conocido y bien descrito de este receptor de integrina (cargado de acuerdo con el método anteriormente descrito para la pentenoílo y entidad funcional aspartato protegida de metilo). La incubación con estos ligandos se realizó en tampón de unión ligando que contiene PBS, MnCl2 1 mM, 1 mg / ml de BSA a temperatura ambiente durante una hora. Lavados en tampón de lavado 5 * 300 m l. Incubaron con 100 m l de peroxidasa de rábano-estreptavidina (Endógena) diluido 1: 10.000 veces en tampón de lavado, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Se lavaron de nuevo en tampón de lavado 5 m l * 300. 100 m l 3, 3 ', 5,5'-tetrametylbenzidine hydrogenperoxidase (sustrato TMB, Kem-en-tec) y se incubaron a temperatura ambiente hasta que el color. 100 m l 0,2 M de ácido sulfúrico añadido, el color se mide a 450 nm, véase la figura 34. Como puede verse el ligando Feuston 5 generada por el procedimiento de dos pasos de codificación es activa y se une al receptor de integrina con una eficiencia relativamente alta.

Reivindicaciones

1. Una biblioteca de complejos, dichos complejos que comprende una molécula pequeña no peptídico y un oligonucleótido de doble cadena que identifica la molécula, dicho oligonucleótido de cadena doble que comprende cadenas simples complementarias, en el que las cadenas simples complementarias están unidos covalentemente a través de una primera enlazador, en el que la molécula se une covalentemente al oligonucleótido de doble cadena a través de un segundo enlazador.

2. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las moléculas de los complejos de la biblioteca se seleccionan entre el grupo que consiste en monofuncional, difuncional, trifuncional y oligofuncionales, hidrocarburos de cadena abierta; monofuncional, difuncional, trifuncional y carbociclos oligofuncionales, no aromáticos; monocíclico, bicíclico, tricíclico y hidrocarburos policíclicos; hidrocarburos policíclicos puenteados; monofuncional, difuncional, trifuncional, y heterociclos no aromáticos cionales oligofunc-; monocíclico, bicíclico, tricíclico, y heterociclos policíclicos, un puente erocycles Het policíclicos; monofuncional, carbociclos aromáticos difuncionales, trifuncionales y oligofuncionales; monocíclico, bicíclico, tricíclico, y carbociclos aromáticos policíclicos; monofuncional, difuncional, trifuncional, y oligofuncional aromático heterociclos; y monocíclico, bicíclico, tricíclico y heterociclos policíclicos.

3. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el número de complejos es de 2 a 10 18.

4. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los nucleótidos individuales de los oligonucleótidos unidos covalentemente comprende un resto de nucleobase y un resto de azúcar y un ligador internucleosídico.

5. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el resto nucleobase de los nucleótidos es un resto nucleobase natural.

6. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el resto nucleobase se selecciona del grupo que consiste en adenina, guanina, timina, citosina, uracilo, purina, xantina, diaminopurina, 8-oxo-N 6 -metiladenina, 7-deazaxantina, 7- desazaguanina, N 4, N 4 -etanocitosin, N 6, N 6 -ethano-2, 6-diamino-purina, 5-metilcitosina, 5-(C3-C6) sine -alkinilcito-, 5-fluorouracilo, 5- bromouracilo, pseudo-isocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanueve, e inosina.

7. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la fracción de azúcar es una pentosa.

8. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la pentosa se selecciona del grupo que consiste en ribosa, 2'-desoxirribosa, 2’-O-metil-ribose, 2’-flour-ribose, and 2’-4’-O-metileno-ribosa.

9. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el ligador internucleosídico que une los nucleótidos individuales es un ligador fosfodiéster.

10. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el resto nucleobase de los nucleótidos es un resto no natural de nucleobase.

11. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el segundo enlazador se selecciona del grupo que consiste en carbohidridos y carbohidridos sustituidos; de vinilo, de polivinilo y de polivinilo sustituido; acetileno, poliacetileno; arilo / heteroarilo; poliarilo/heteroarilo y poliaril/polihetraril sustituidos; éteres; poliéteres, tales como por ejemplo polietilenglicol y poliéteres sustituidos; aminas, poliaminas y poliaminas sustituidas; doble cadena, de cadena sencilla o parcialmente bicatenario polinucleótidos naturales y no naturales y sustituido bicatenario, de cadena sencilla o parcialmente de doble polinucleótidos naturales y no naturales varados; poliamidas y polipéptidos naturales y no naturales y sustituido poliamidas y polipéptidos naturales y no naturales.

12. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las cadenas simples complementarias están unidos covalentemente a través de un oligonucleótido.

13. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el segundo conector es un poliéter, tal como un polietilenglicol, o un poliéter sustituido.

14. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la molécula es covalente vinculado a un punto de anclaje que comprende un grupo reactivo localizado en una región terminal del oligonucleótido de doble cadena.

15. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el oligonucleótido de cadena doble comprende un bucle de pelo-pin de unión covalente de nucleótidos las dos hebras del oligonucleótido de doble cadena en un extremo del mismo.

16. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la molécula se covalente vinculada a un punto de anclaje que comprende un grupo reactivo situado en una primera región terminal del oligonucleótido de doble

cadena, y en el que un bucle de pelo-pin de nucleótidos enlaza covalentemente las dos hebras de el oligonucleótido de cadena doble en una segunda región diferente, terminalesde la misma.

17. Un método para el enriquecimiento de la biblioteca de complejos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para las pequeñas moléculas no peptídicas que tienen una actividad o funcionalidad predeterminada, método que comprende las etapas de:

i) someter dicha biblioteca de complejos de una o más veces a una condición de enriquecimiento, y
ii) la obtención de una biblioteca enriquecida de complejos que tienen una mayor cantidad relativa de pequeñas moléculas no peptídicas que tienen dicha actividad o funcionalidad predeterminada.

18. El método de la reivindicación 17, en el que se amplifican los oligonucleótidos de los complejos de la biblioteca enriquecida.

19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 17 y 18, en el que las moléculas de los complejos de la biblioteca enriquecida se identifican por secuenciación de los oligonucleótidos de los complejos.

20. El método de la reivindicación 17, en el que la condición de enriquecimiento es una afinidad de las moléculas de la biblioteca de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para una entidad de destino.

Fig. 1

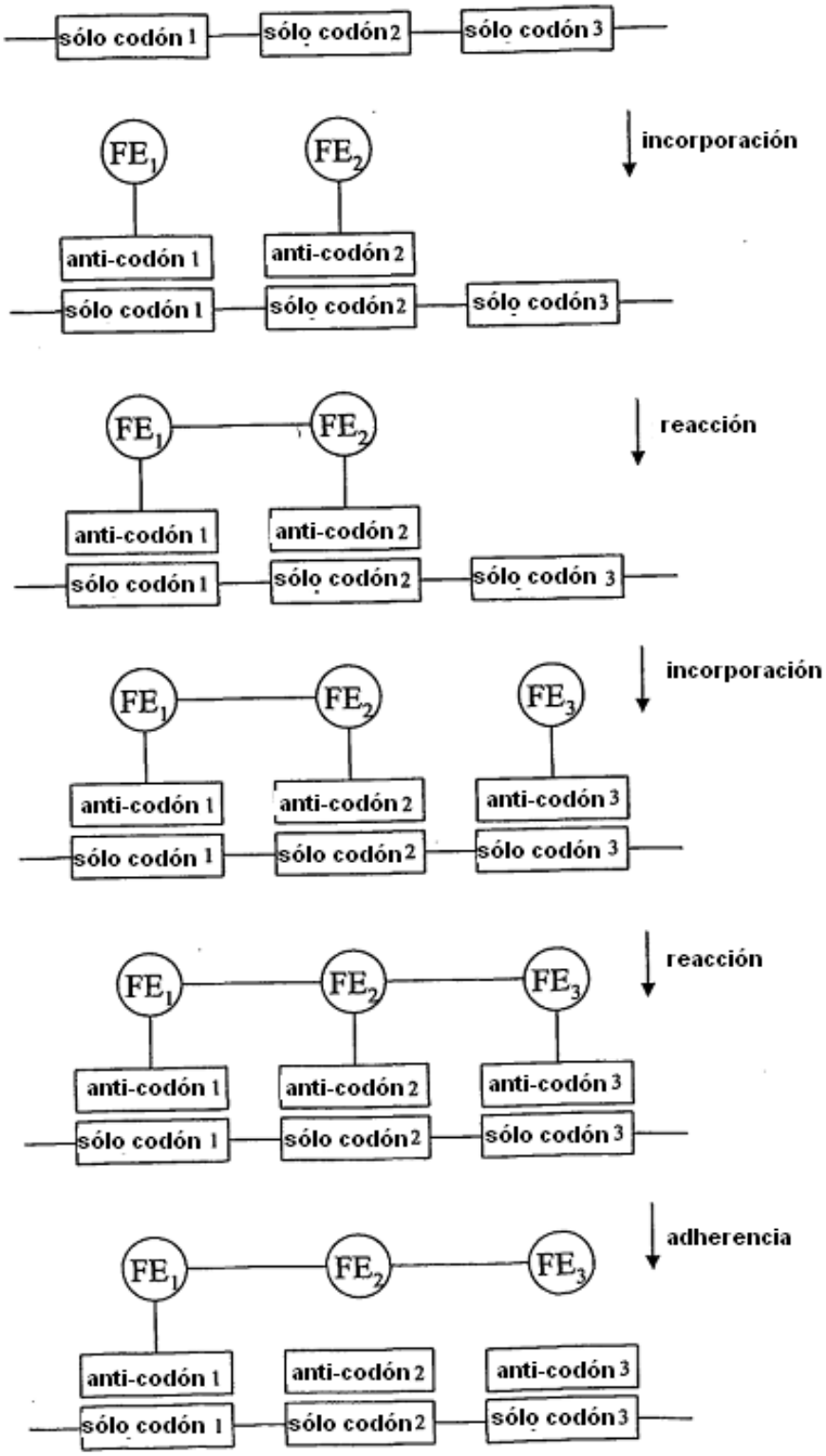

sólo codón 1
sólo codón 2
sólo codón 3
incorporación
FE1
FE2
anti-codón 1
anti-codón 2
sólo codón 1
sólo codón 2
sólo codón 3
reacción
FE1
FE2
anti-codón 1
anti-codón 2
sólo codón 1
sólo codón 2
sólo codón 3
incorporación
FE1
FE2
FE3
anti-codón 1
anti-codón 2
anti-codón 3
sólo codón 1
sólo codón 2
sólo codón 3
reacción
FE1
FE2
FE3
anti-codón 1
anti-codón 2
anti-codón 3
sólo codón 1
sólo codón 2
sólo codón 3
adherencia
FE1
FE2
FE3
anti-codón 1
anti-codón 2
anti-codón 3
sólo codón 1
sólo codón 2
sólo codón 3

Fig. 2

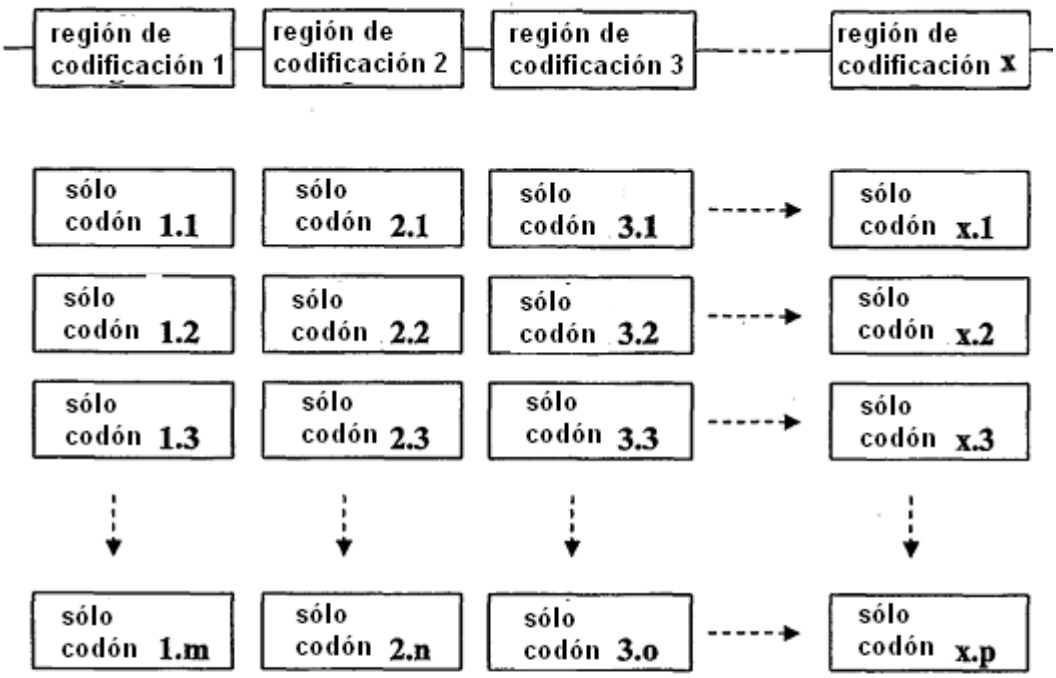

región de codificación 1
región de codificación 2
región de codificación 3
región de codificación x
sólo codón 1.1
sólo codón 2.1
sólo codón 3.1
sólo codón x.1
sólo codón 1.2
sólo codón 2.2
sólo codón 3.2
sólo codón x.2
sólo codón 1.3
sólo codón 2.3
sólo codón 3.3
sólo codón x.3
sólo codón 1.m
sólo codón 2.n
sólo codón 3.o
sólo codón x.p

Fig. 3. **Un bloque de construcción de base oligonucleotida. Ejemplo de diseño de región de codificación, permitiendo diversidad de alta construcción de bloques.**

A.

región de codificación	Secuencia	número de condones únicos
1	XXXXXATATTTXXXXX	1024
2	XXXATTTTAXXXXXXX	1024
3	XTAATTTXXXXXXXXX	1024
4	XXATXXATXXATXXXX	1024
5	GCCCGATTAAAXXCCG	4
6	XAXAXTTXTTXXXGGG	128

X = G or C

B.

codón 1	GCGCGATATTTGGGCC
anti-codón 1	CGCGCTATAAACCCGG
codón 6	GAGAGTTCTTCGCGGG
anti-codón 6	CTCTCAAGAAGCGCCC

Fig. 4. **Bloques de construcción**

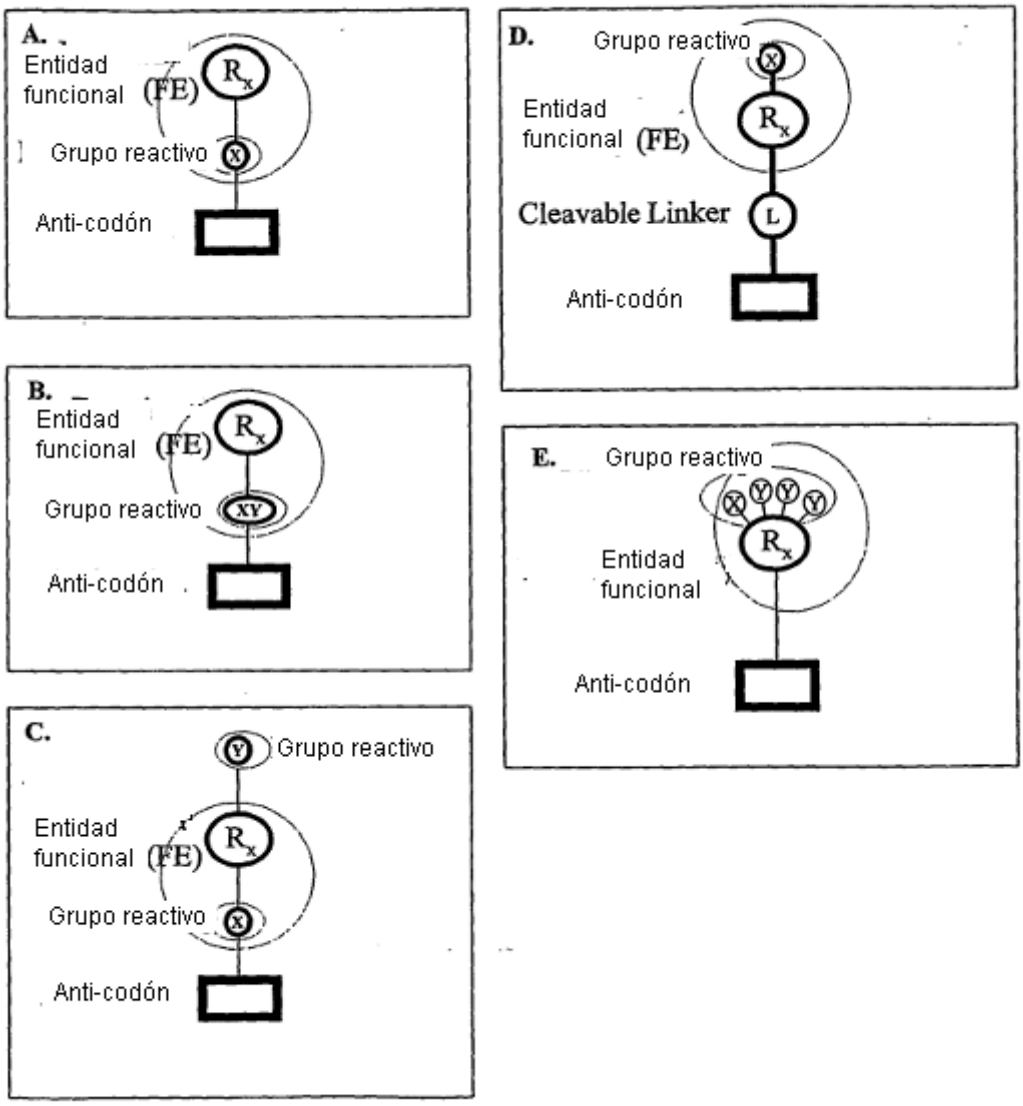


Fig. 5. Ejemplo de monómero de bloques de construcción

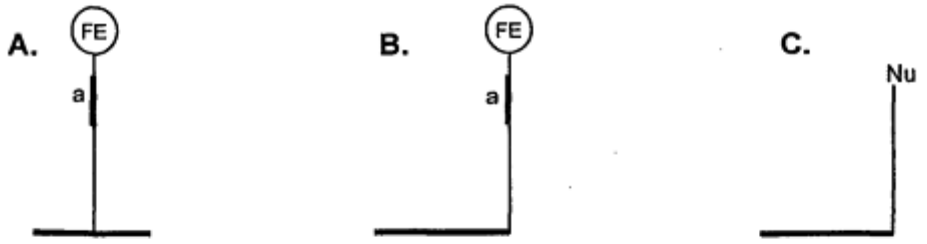


Fig. 6. **Preparación de bloques de construcción. Ejemplos generales.**

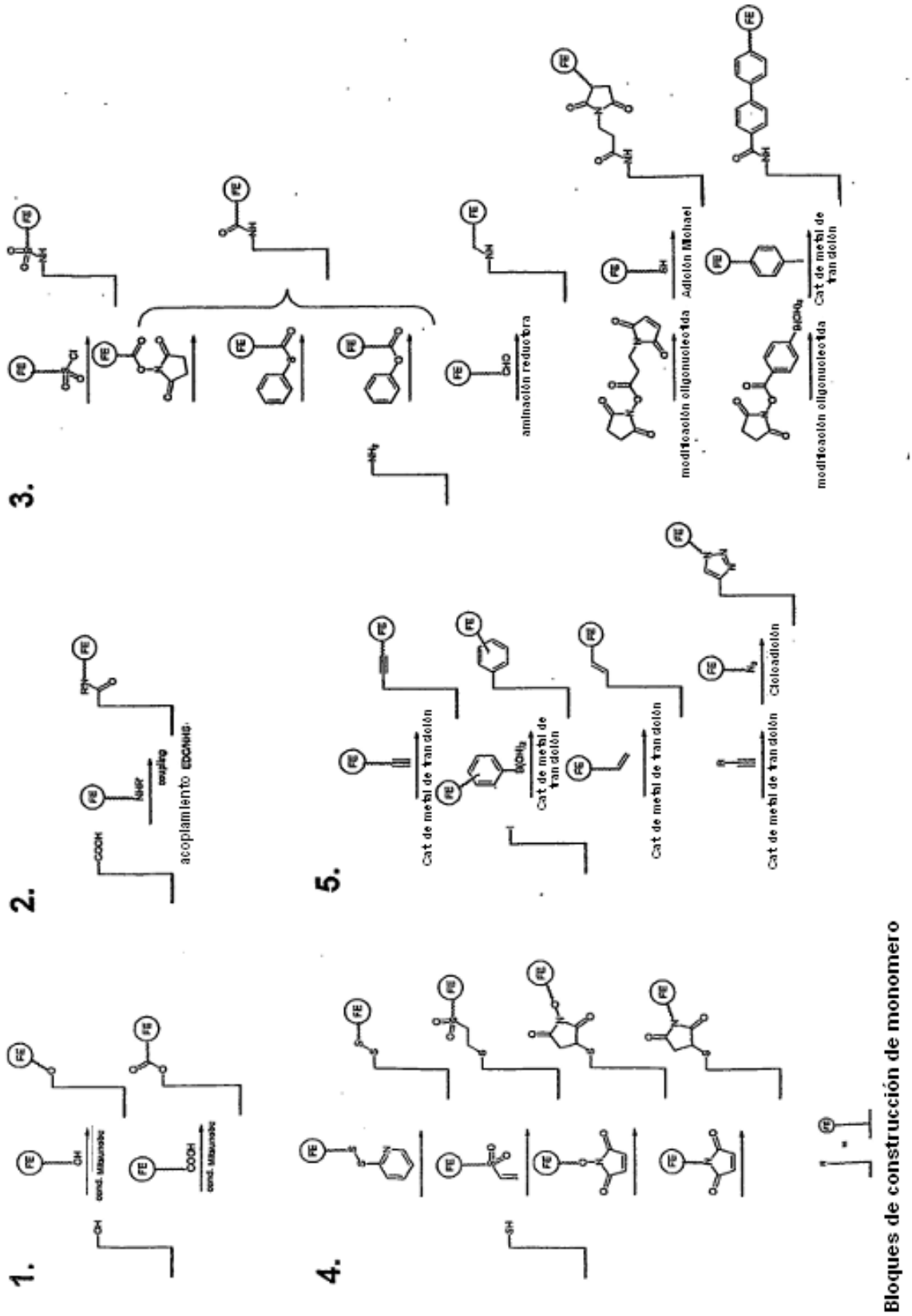


Fig. 7. Diseño y síntesis específica de bloques de construcción

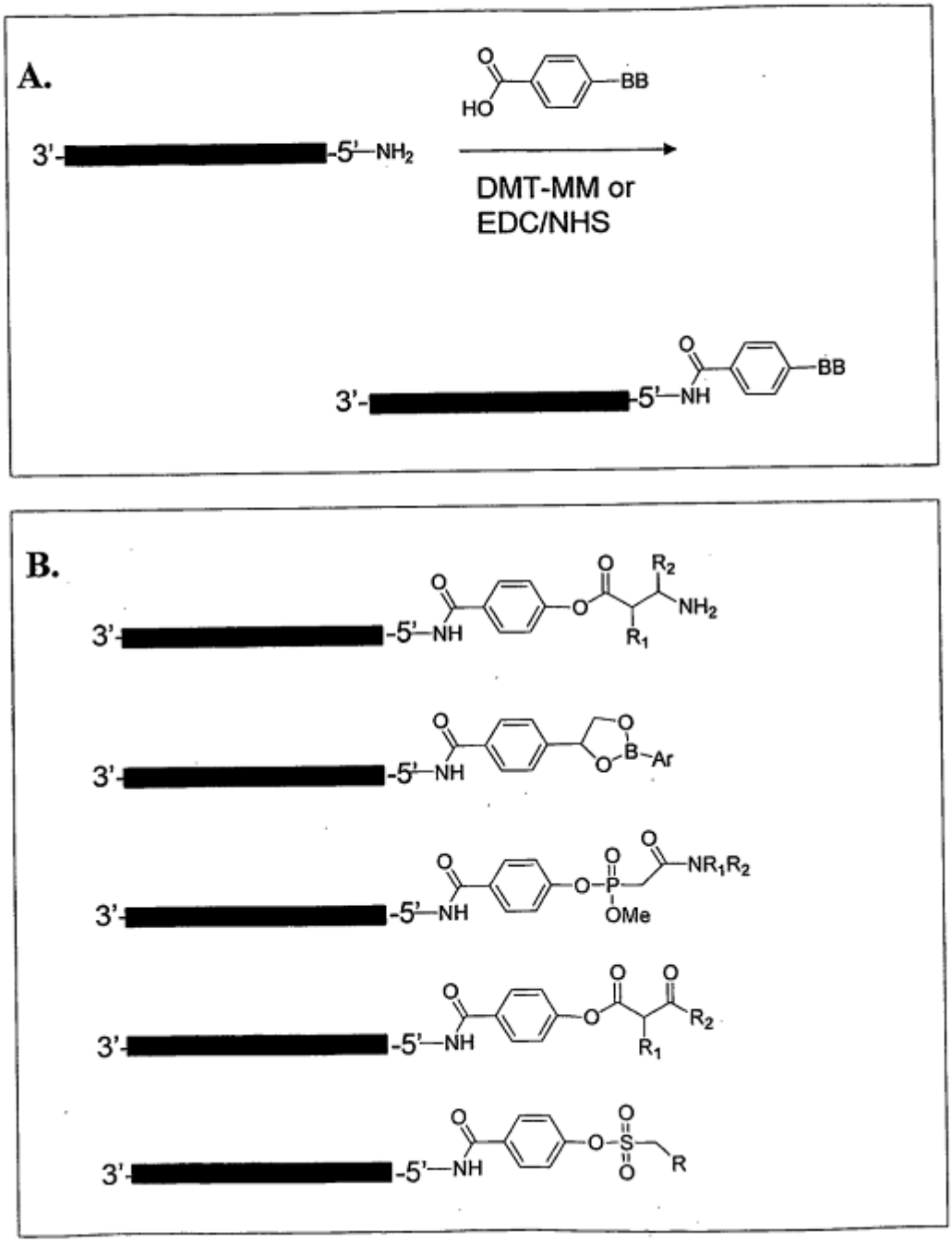
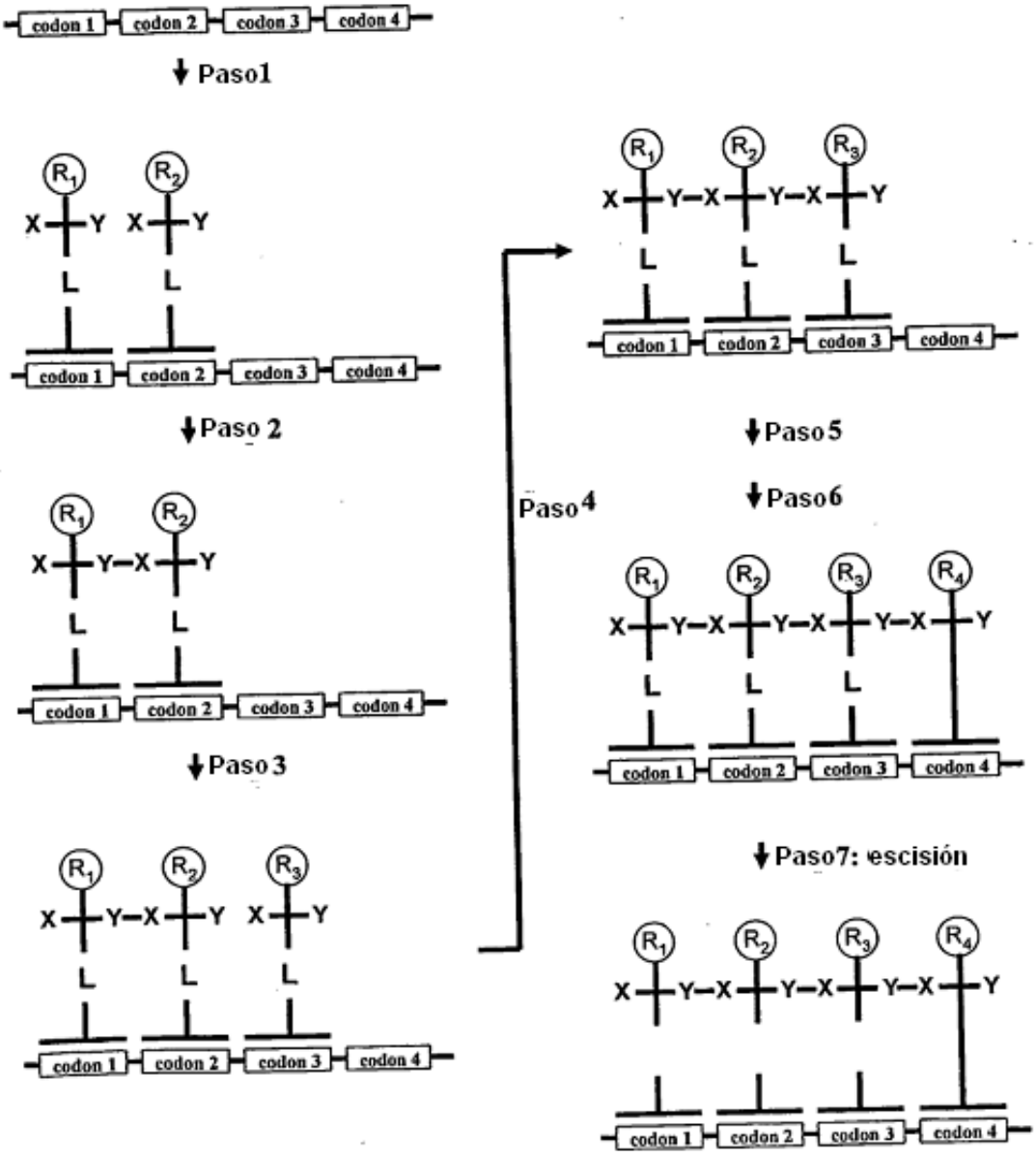


Fig. 8. Síntesis de plantilla de un polímero.



Fib. 8, Ejemplo 1. reacción inducida por la luz entre los bloques de construcción simétricos: derivados de la cumarina

A

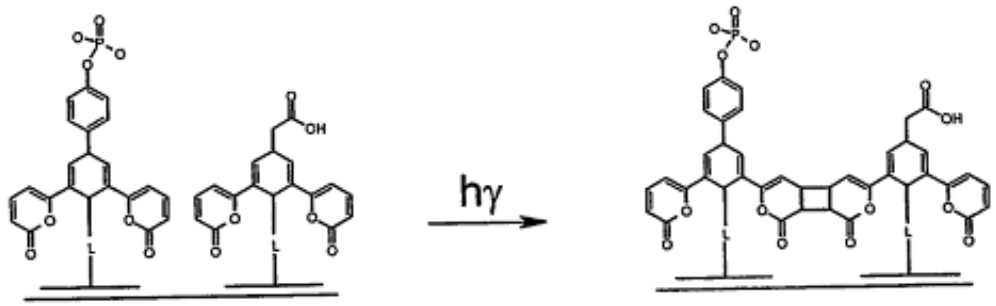


Fig. 9. Síntesis de plantilla de un polímero por reacción y acoplamiento simultaneos.

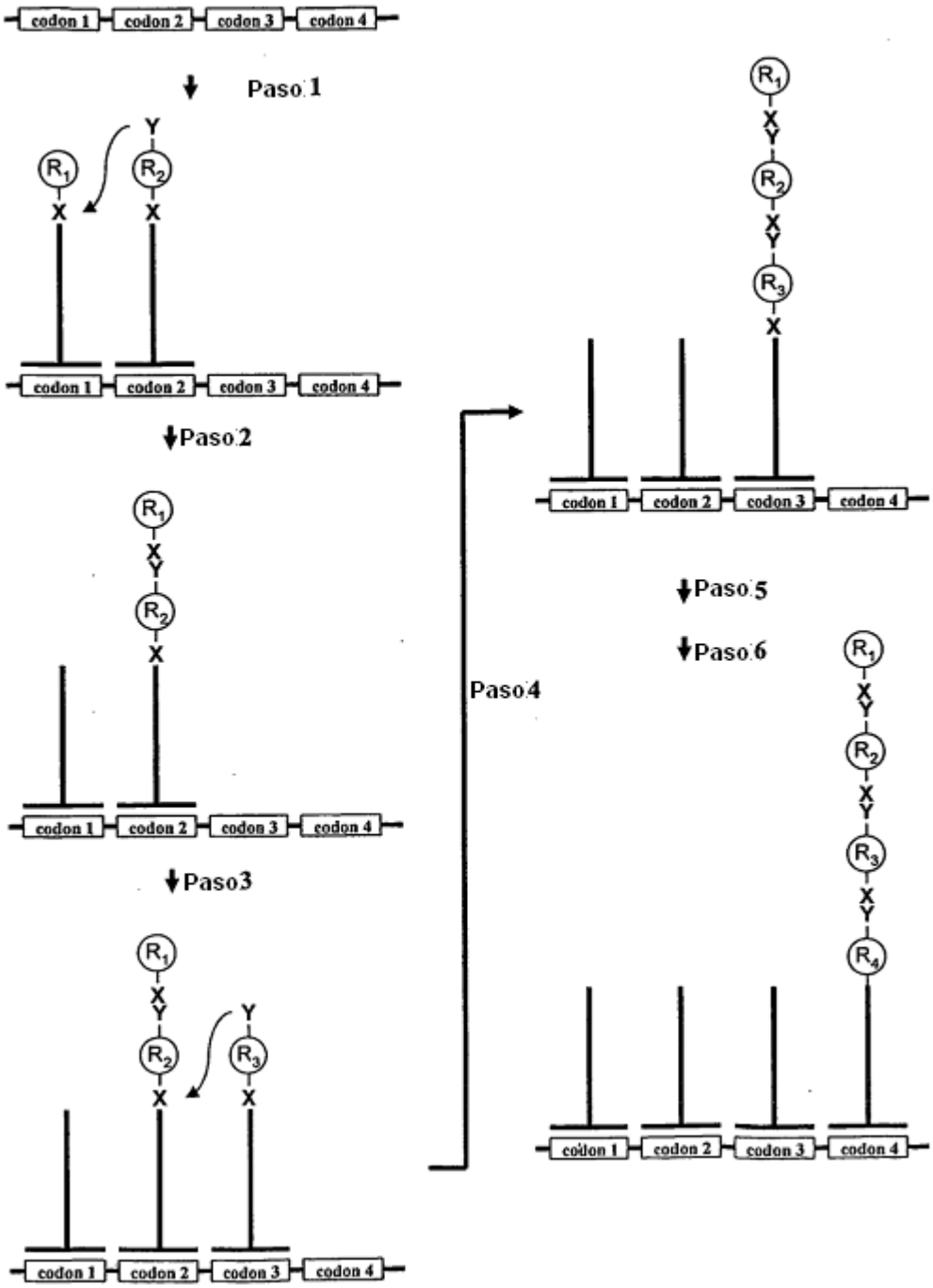


Fig. 10. Síntesis de plantilla de una mezcla de polímero por reacción y acoplamiento simultaneos.

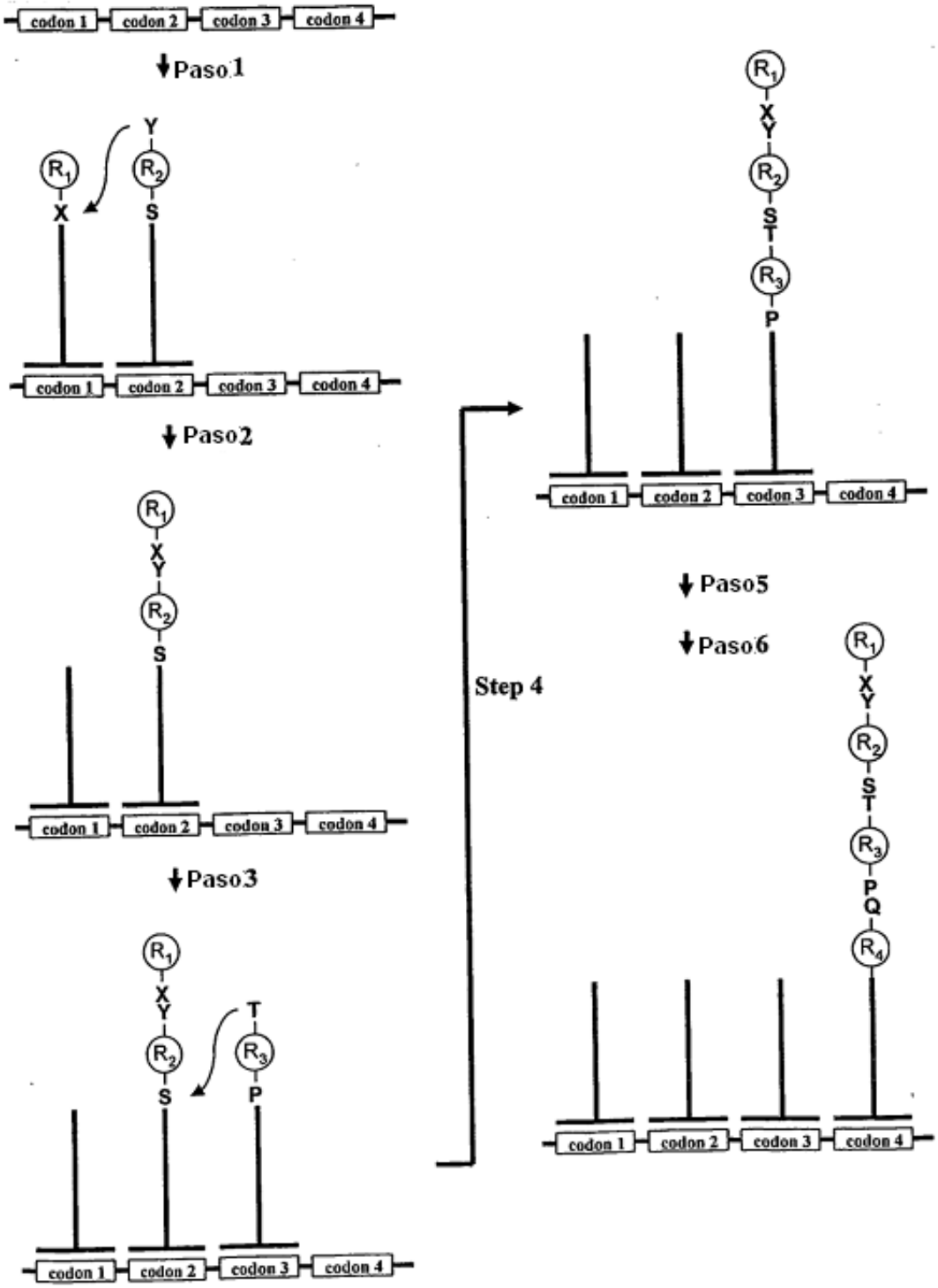


Fig. 10, ejemplo 1. Reacción y acoplamiento simultaneos: Formación de (A) un peptido alfa, y (C) una poliamina.

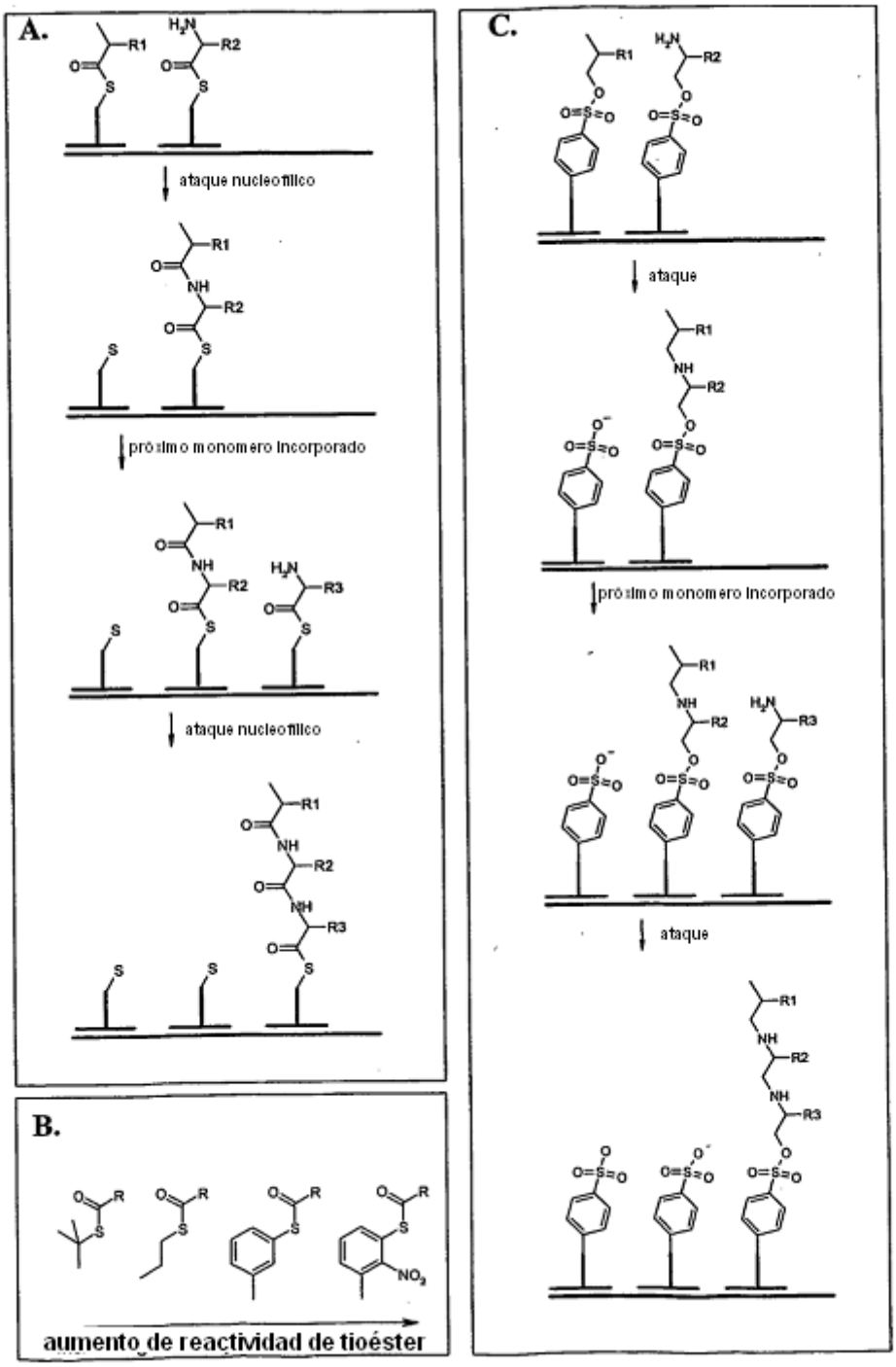


Fig. 10, ejemplo 2. Reacción y acoplamiento simultaneos: Formación de (A) un péptido o un alfa- o beta- péptido, y (B) un hidrazino péptido

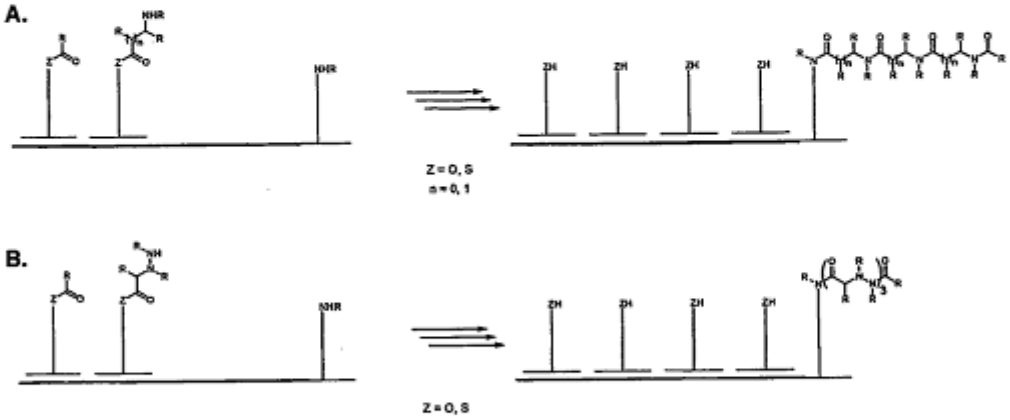


Fig. 11. Síntesis de plantilla de un polímero, usando la reacción y acoplamiento no simultáneos.

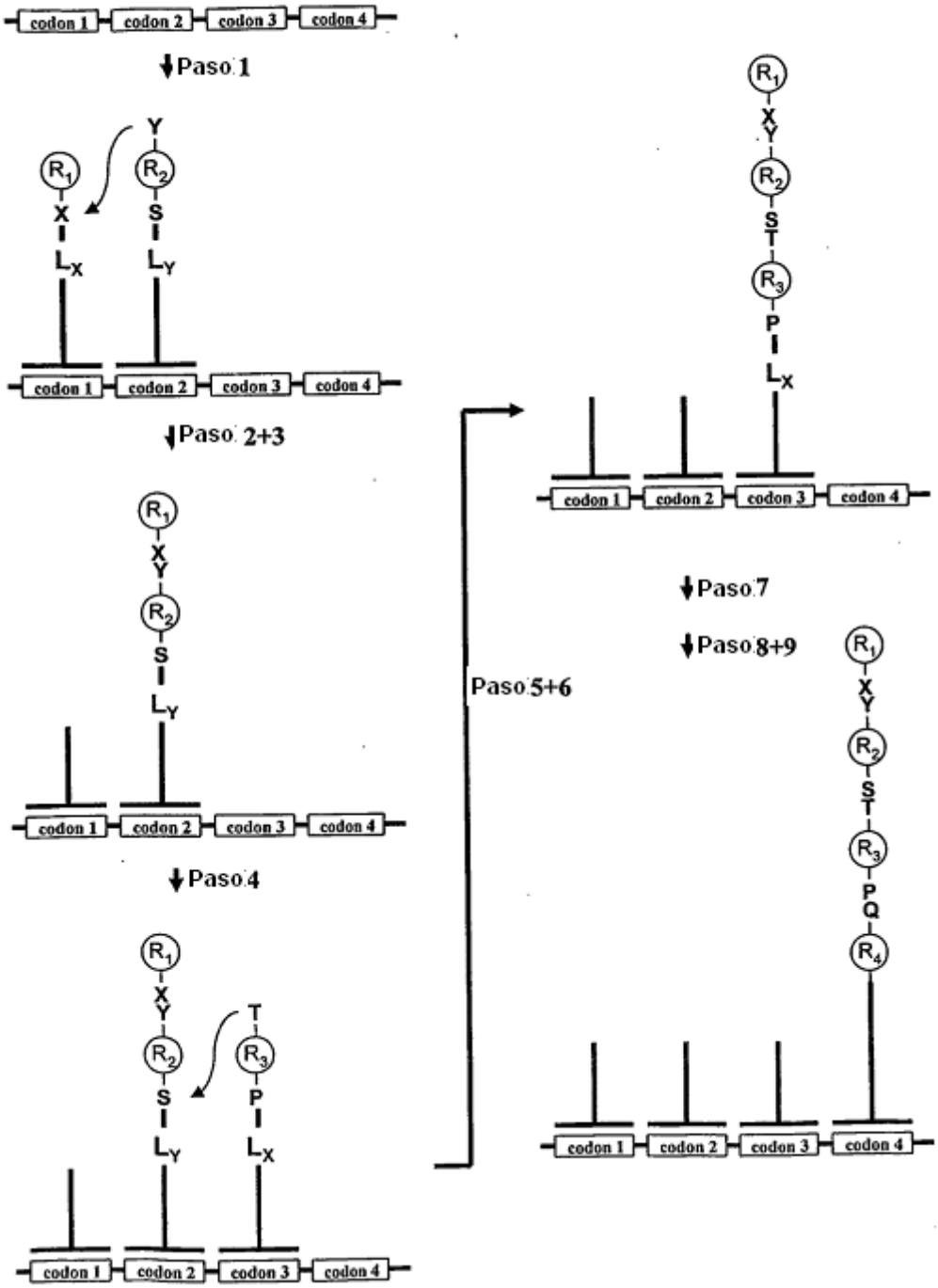


Fig. 12. Activación del grupo reactivo y liberación de anti-codón por la apertura de anillo.

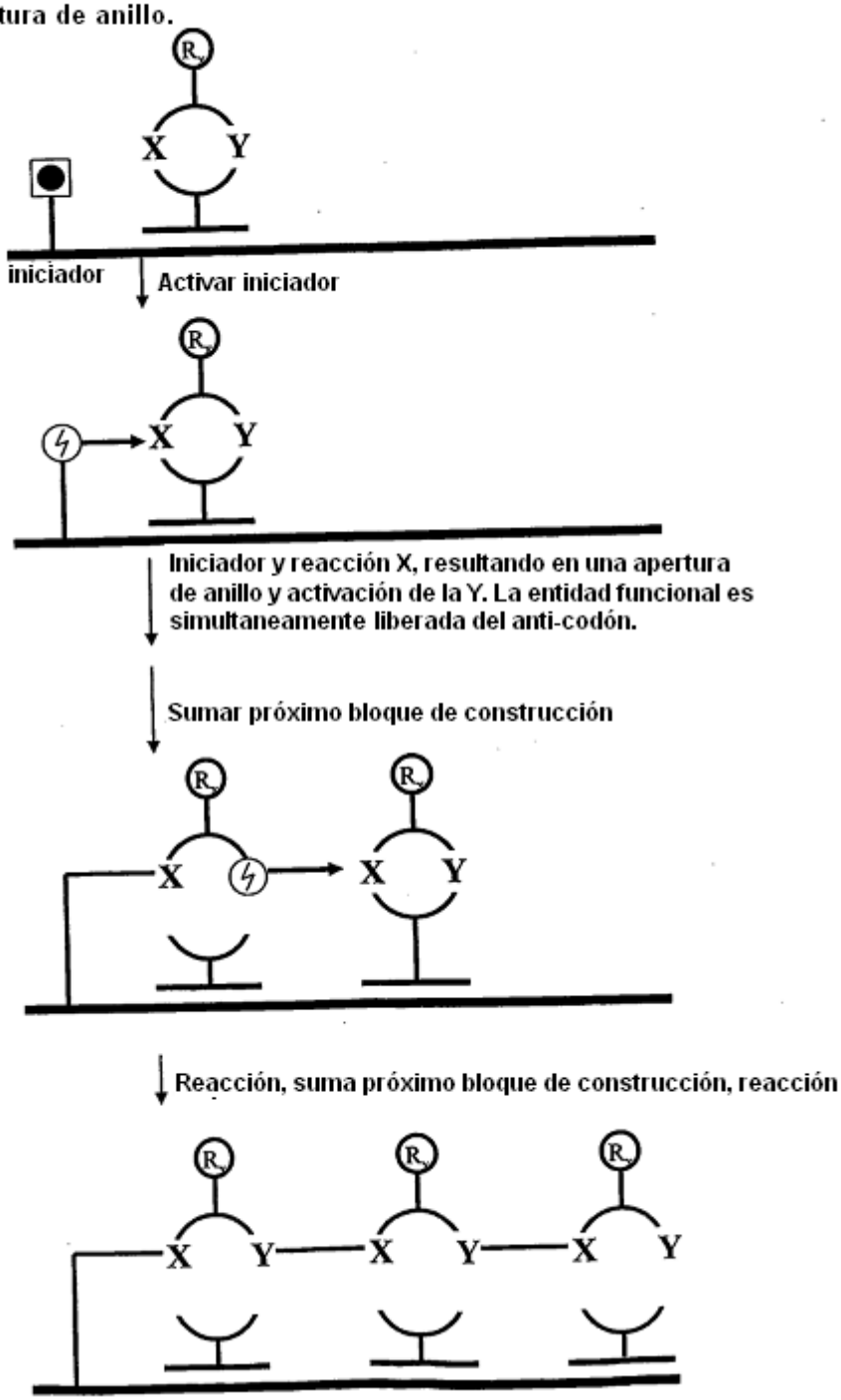


Fig. 13. Relleno de reacción de simetría (bloques de construcción de simetría XX)

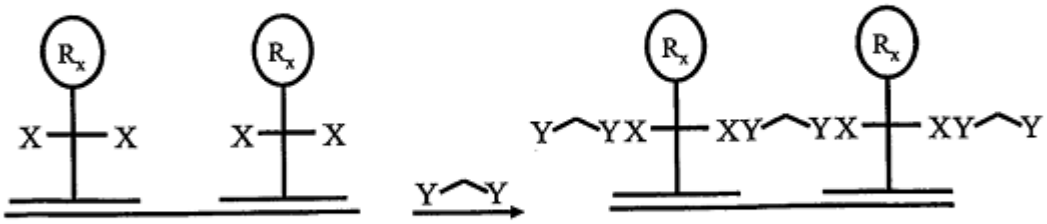


Fig. 13, ej 1. Formación de imina por relleno.

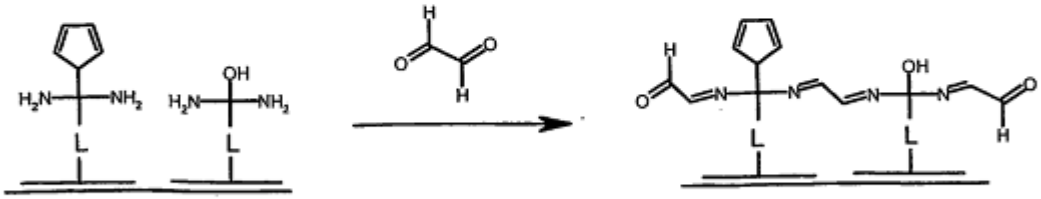


Fig. 13, ejemplo 2. Formación de amida

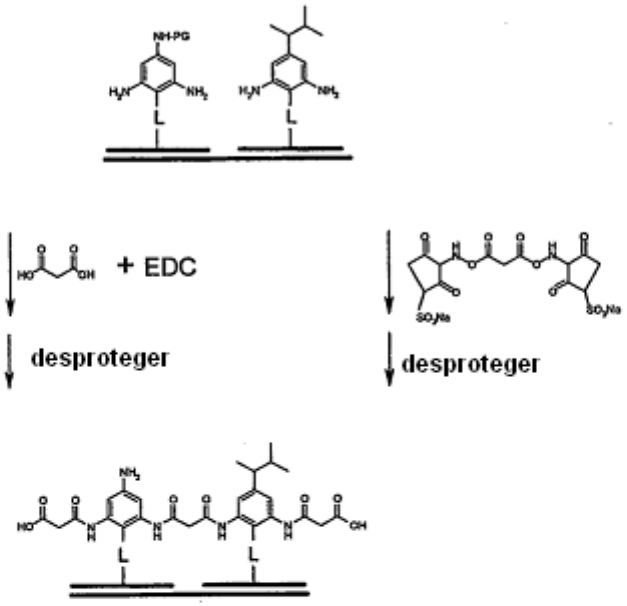


Fig. 13, ejemplo 3. Formación de Urea

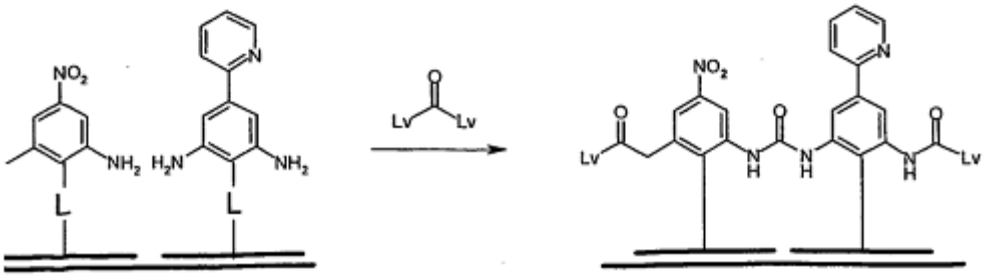
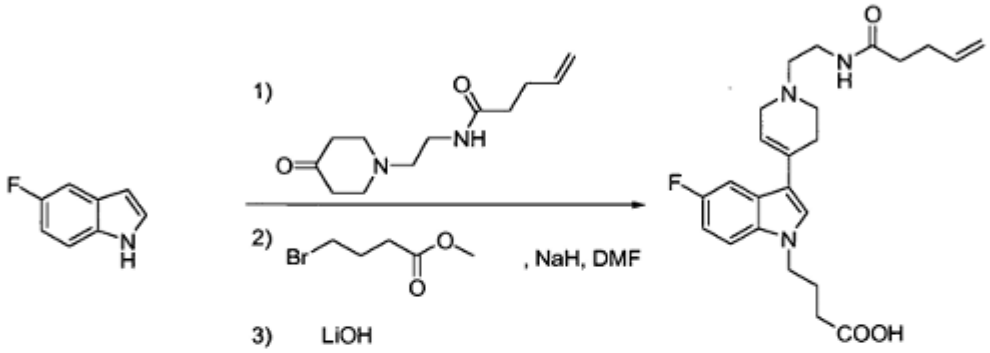
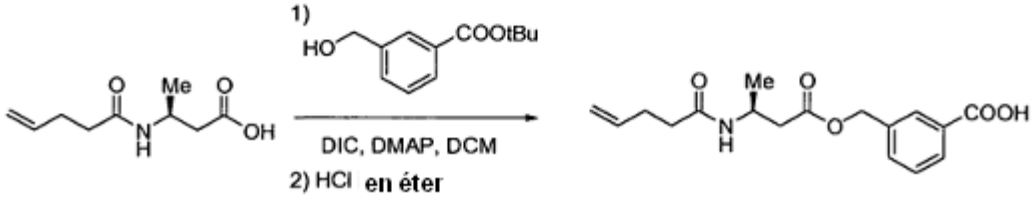


Fig 13, ej. 3.1 Formación de Urea

Síntesis de la entidad funcional 13.3.1A:



Síntesis de la entidad funcional 13.3.1B:



Experimento de relleno usando entidad funcional 13.3.1A y 13.3.1B:

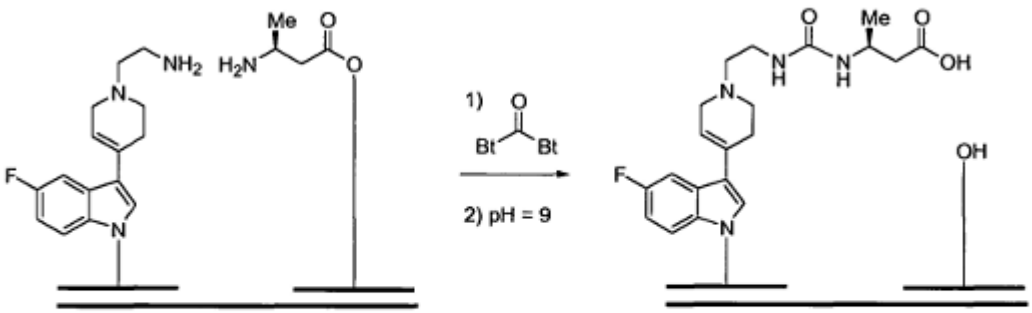


Fig. 13, ej 4. Moléculas de plantilla quirales y no-quirales

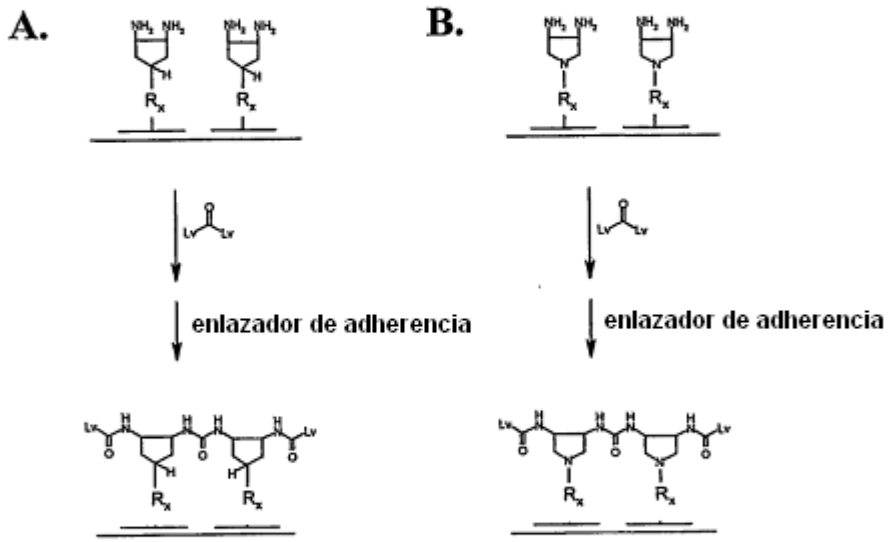


Fig. 13, ej. 5. Relleno simétrico: Formación de un enlace fofodiéster

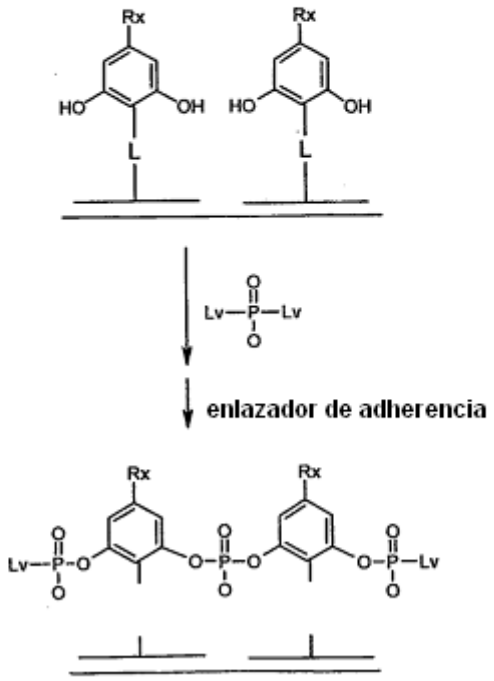


Fig. 13, ej 6. Relleno: Formación de Fofodiéster con un grupo reactivo por cada bloque de construcción

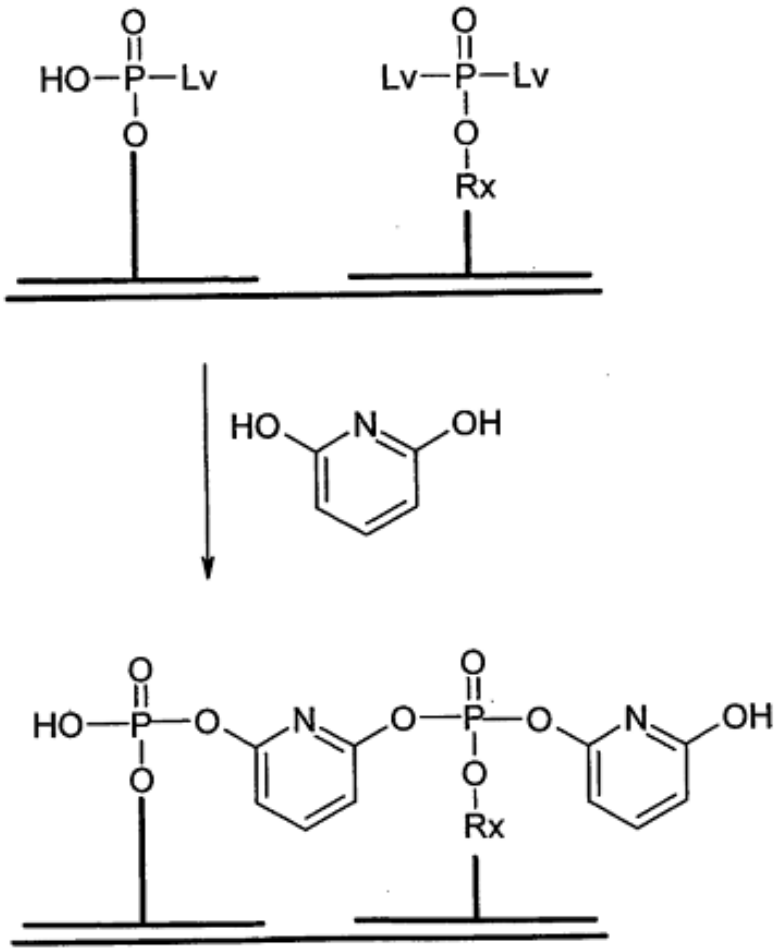


Fig. 13, ej 7. Reacción pericíclica.

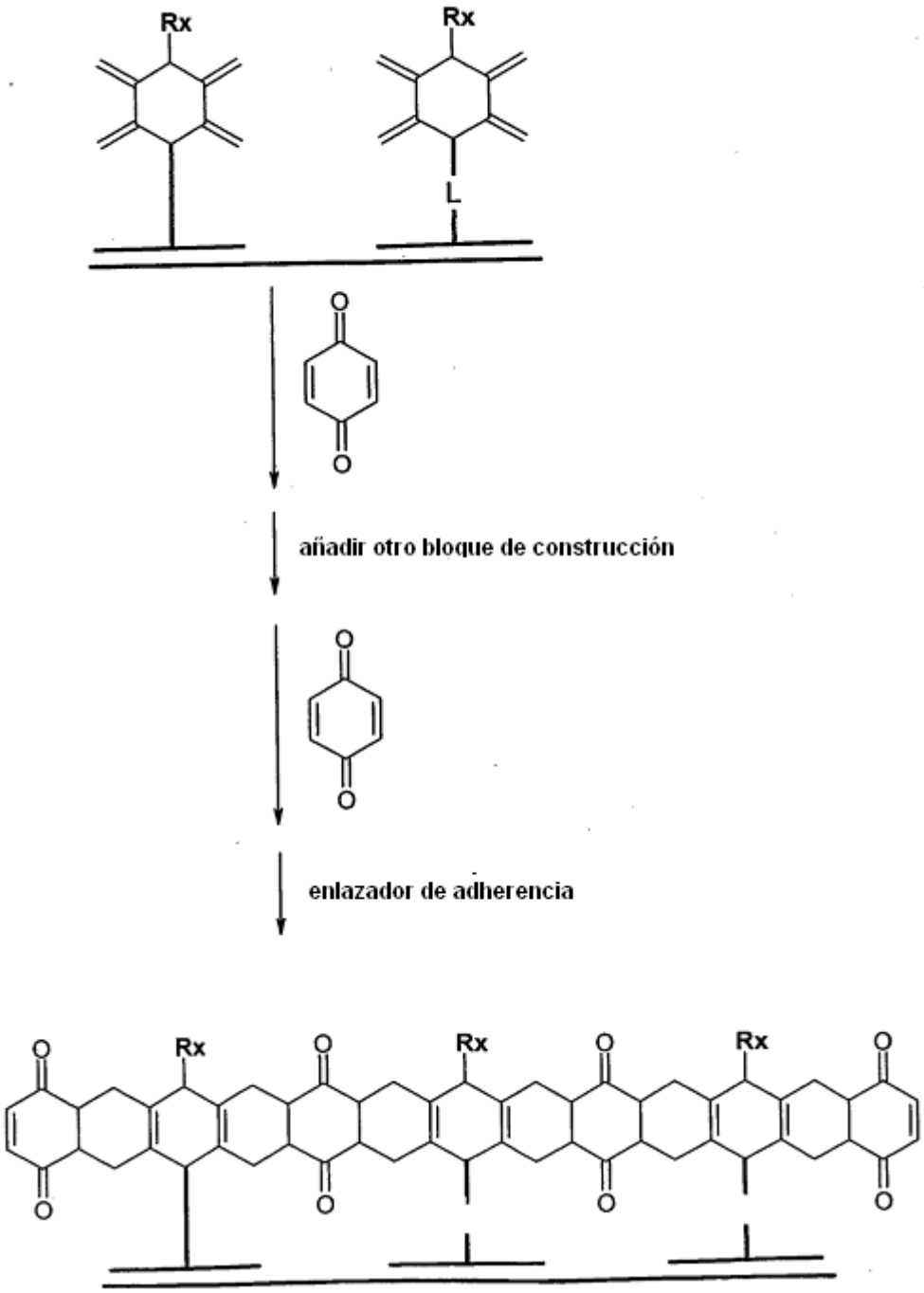
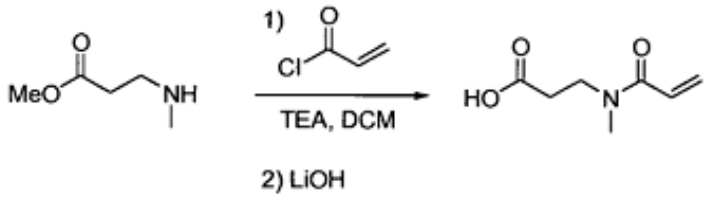
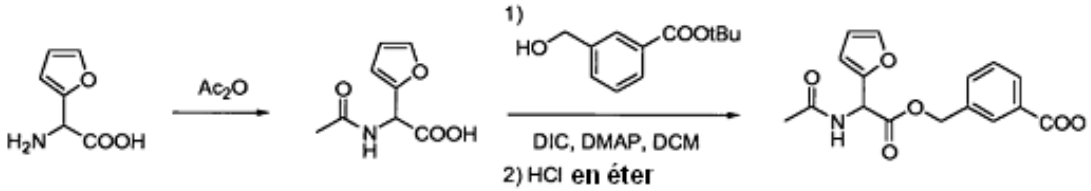


Figure 13, ej 7.1 Reacción pericíclica

Síntesis de la entidad funcional 13.7.1A:



Síntesis de la entidad funcional 13.7.1B:



Experimento de reacción pericíclica usando la entidad funcional 13.7.1A and 13.7.1B:

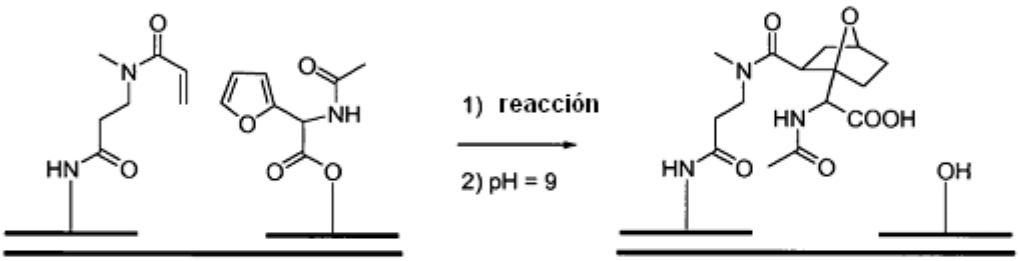


Fig. 13. Reacción de "Relleno" (monómeros asimétricos XS)

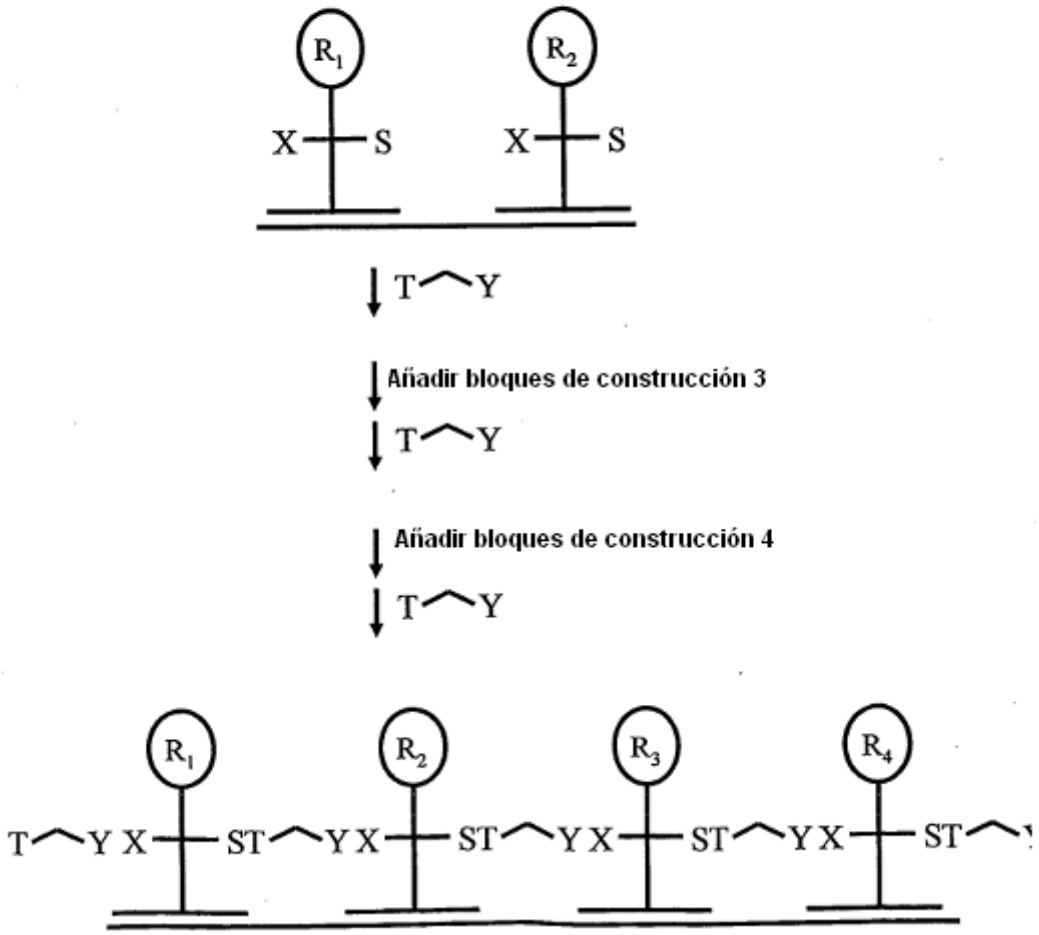


Fig. 14, ejemplo 1.

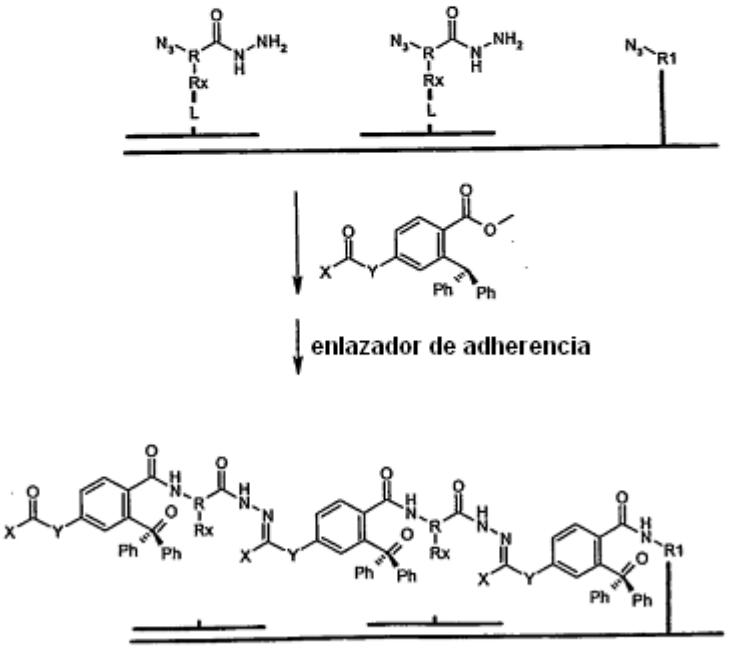


Fig. 15. Síntesis de plantilla de una molécula no lineal.

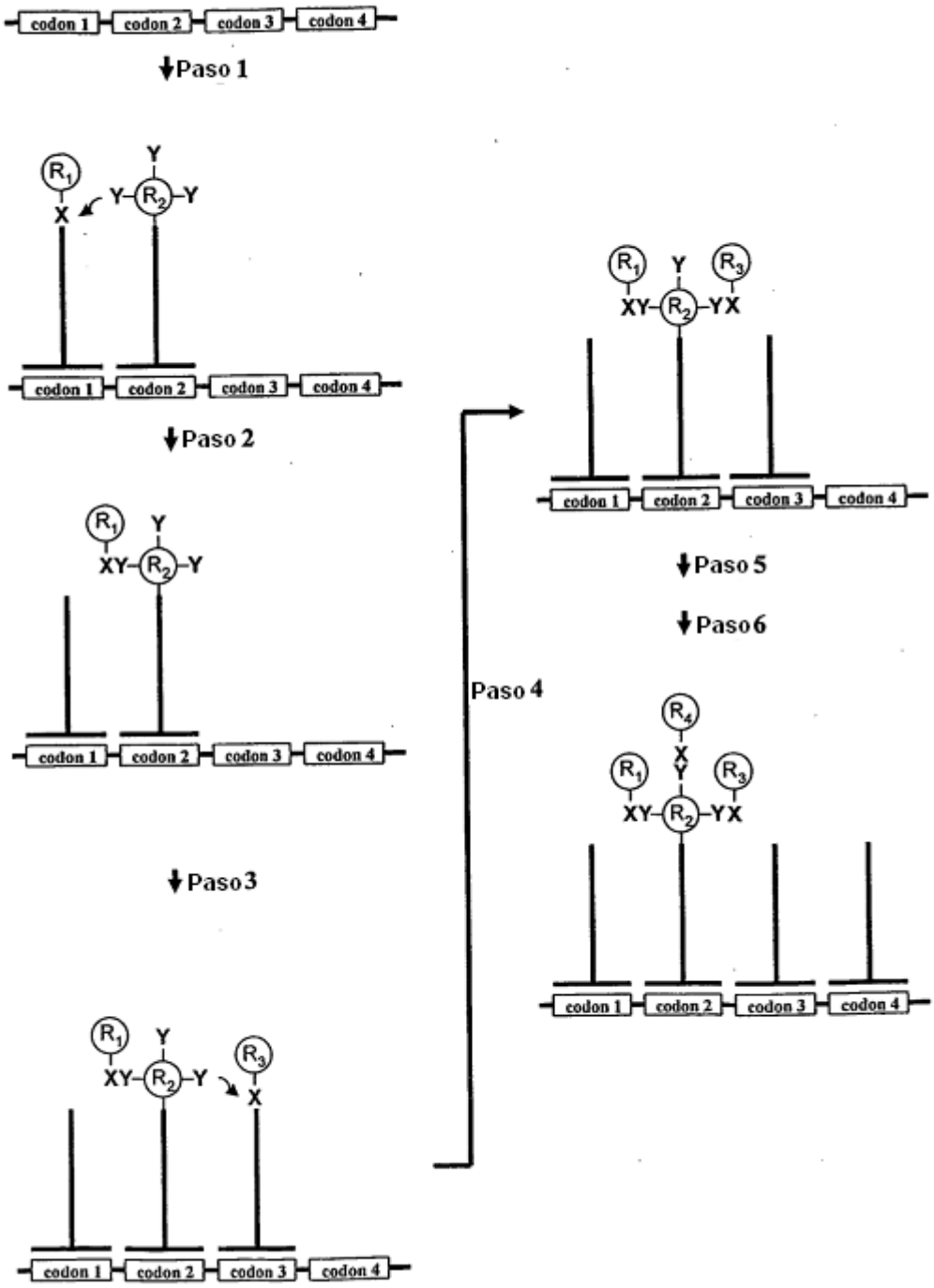


Fig. 16. Síntesis de plantilla de una molécula no lineal, empleando diferentes clases de grupos reactivos, y reacciones y acoplamientos no simultáneos.

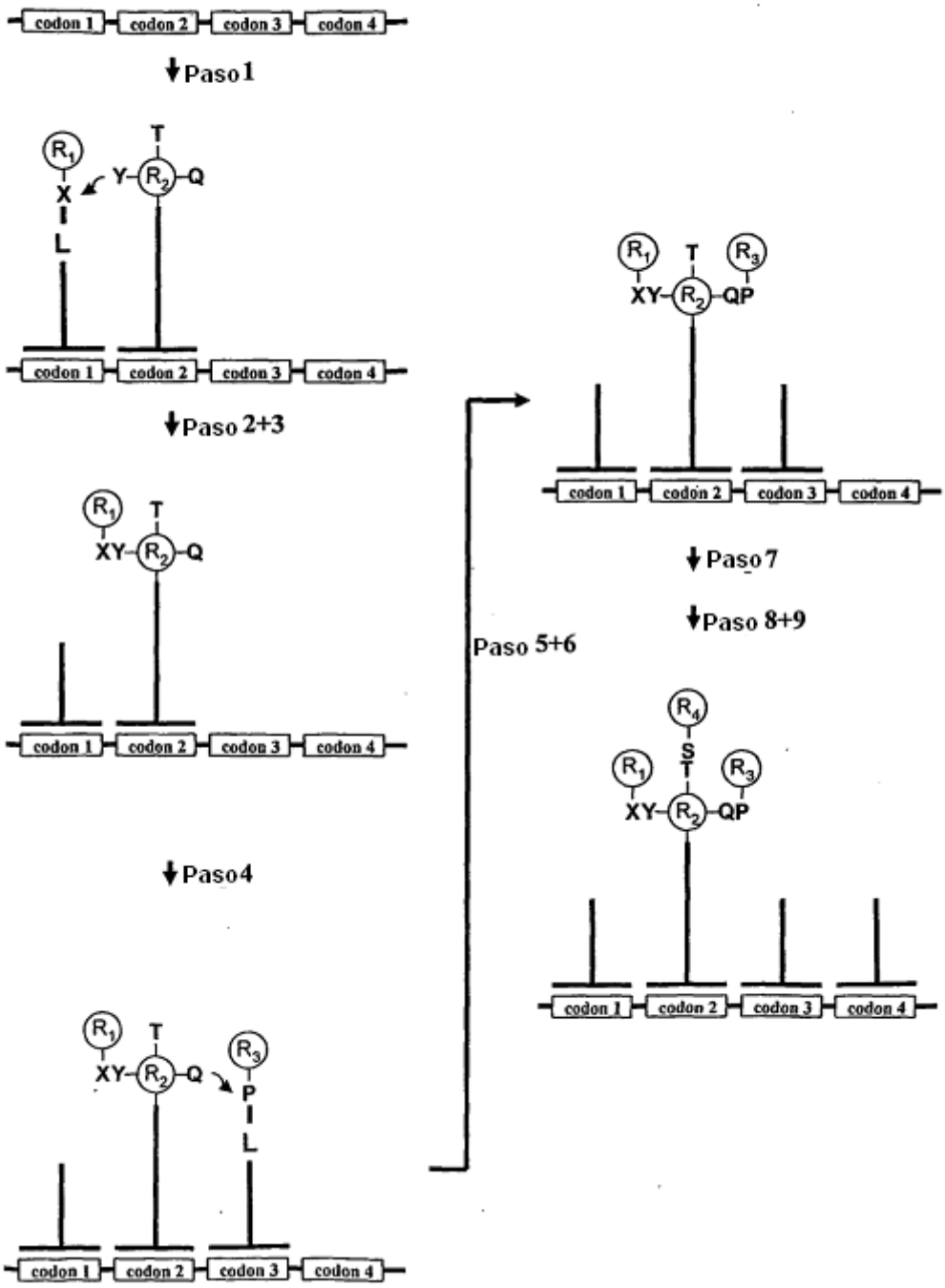


Fig. 17. Andamio de migración. Síntesis de plantilla de molécula no linear, explotando el aumento del efecto de proximidad de la que surge de un andamio de "migración".

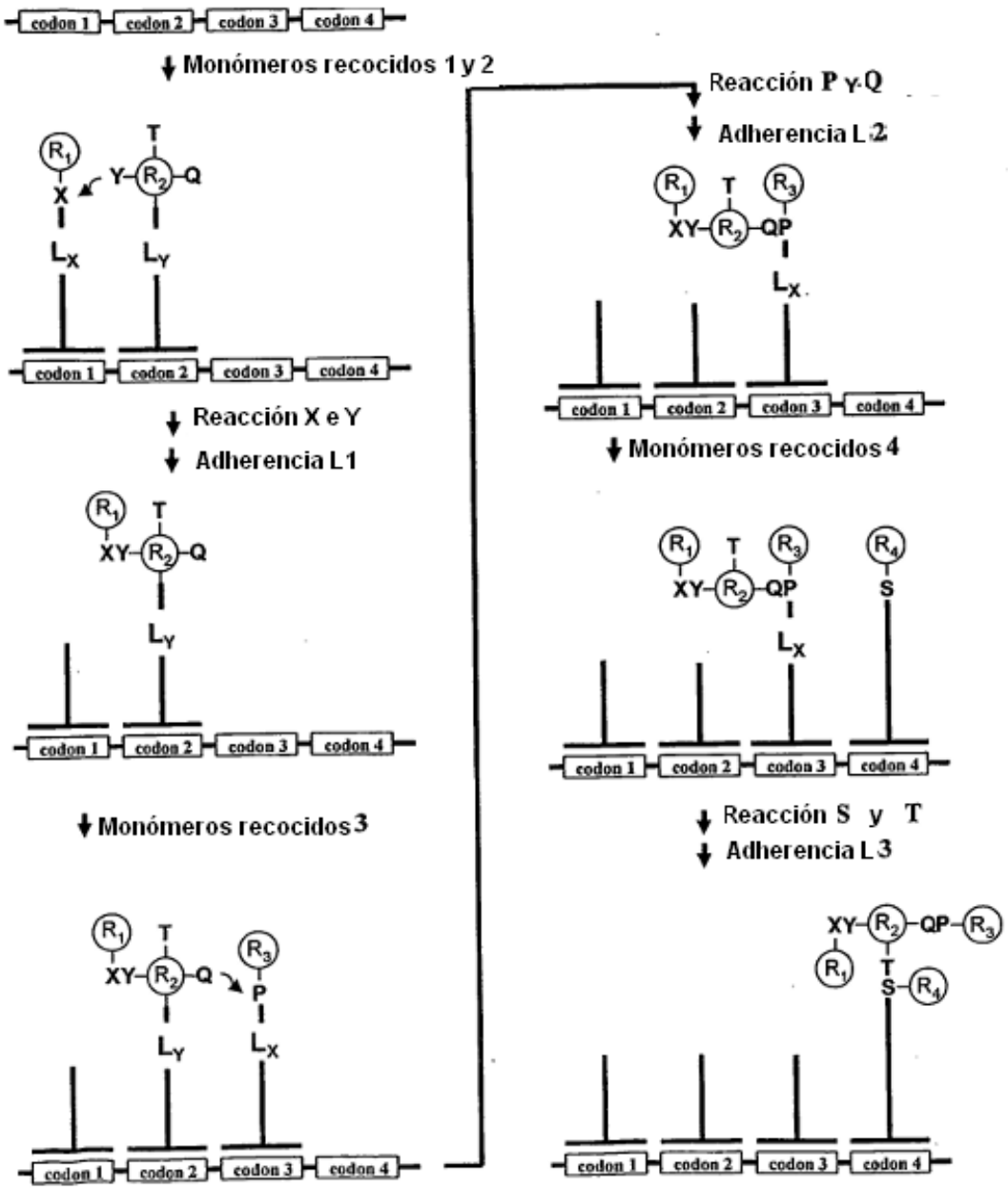
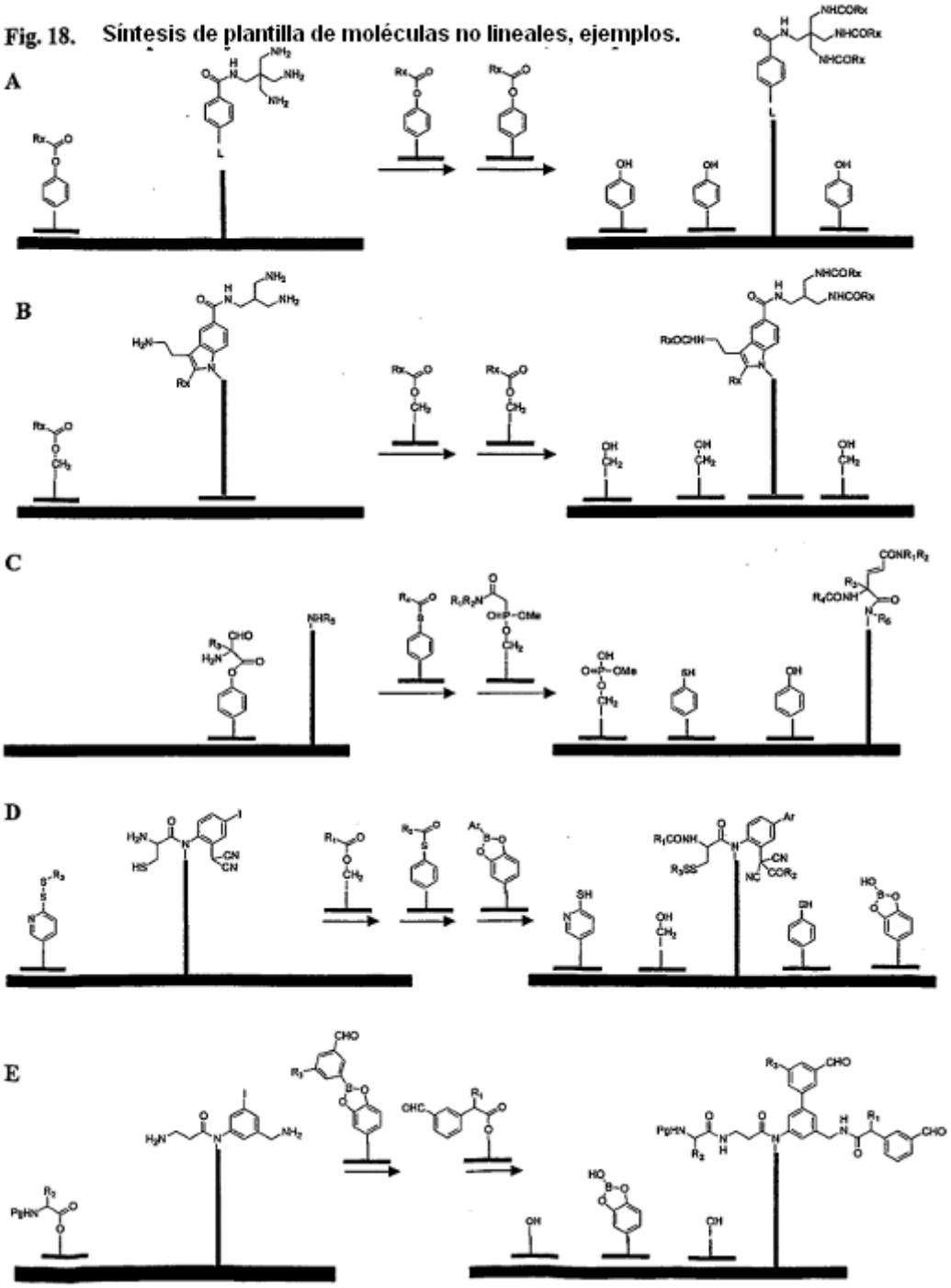


Fig. 18. Síntesis de plantilla de moléculas no lineales, ejemplos.



F

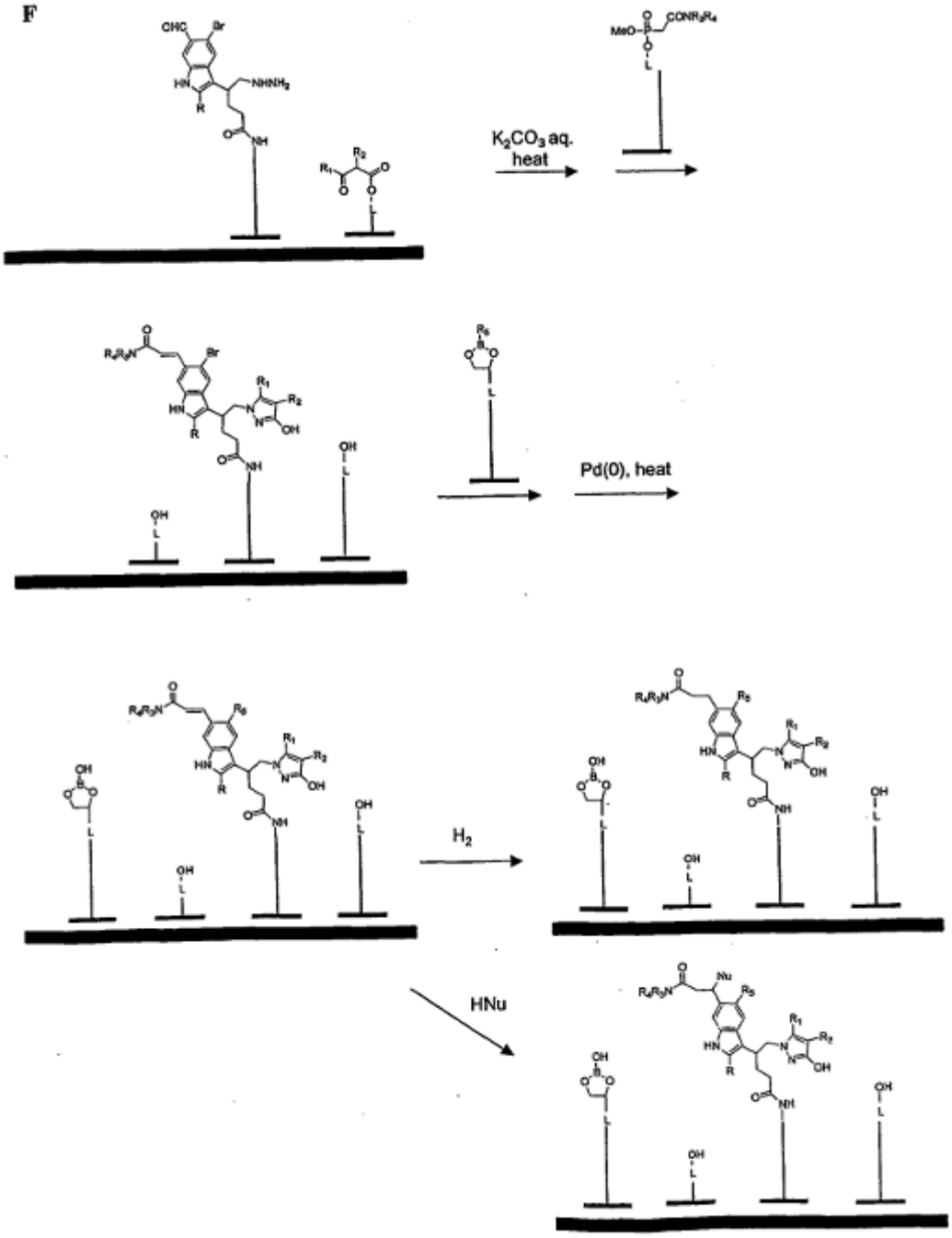


Fig. 19. Síntesis de plantilla en la cual el paso de reacción es preformado bajo las condiciones donde el específico recocido de bloques de construcción a la plantilla es ineficiente.

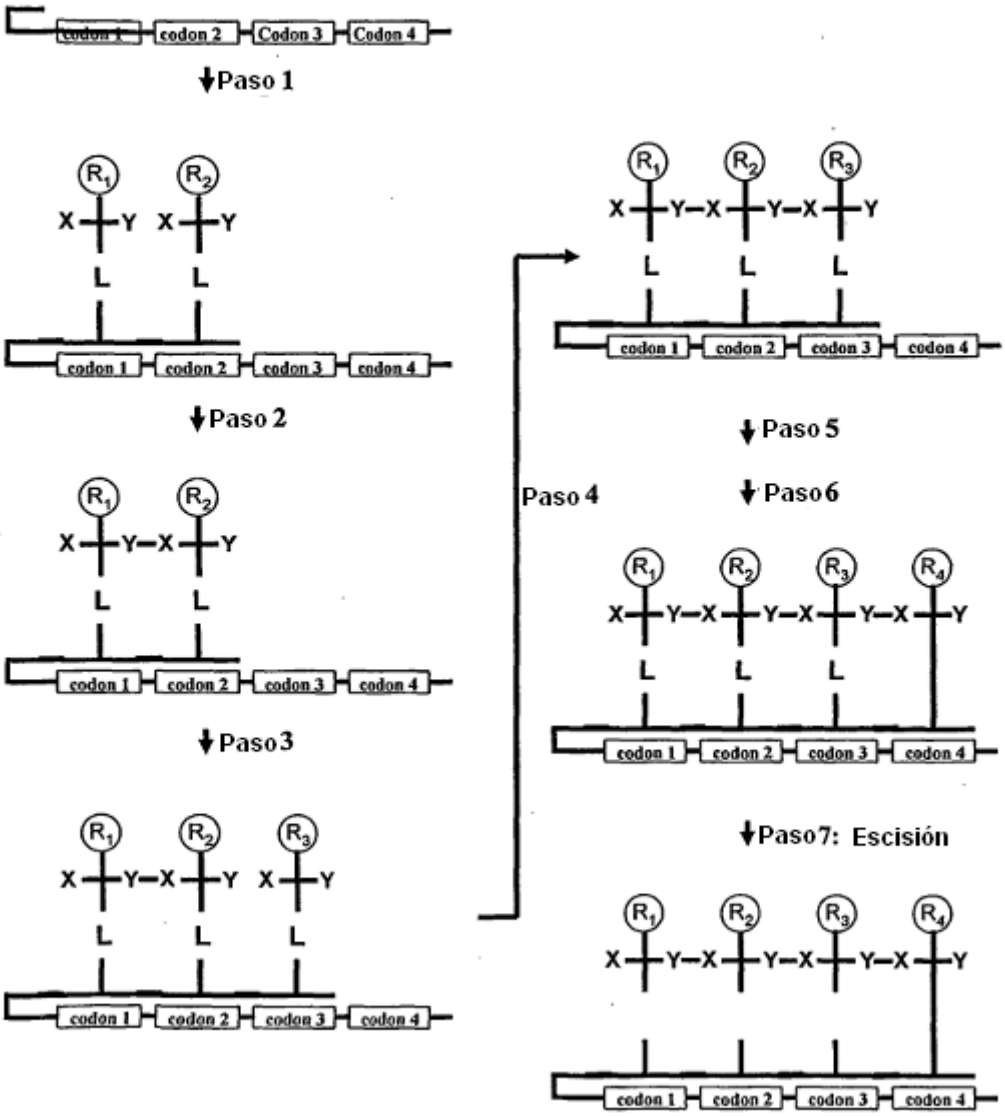
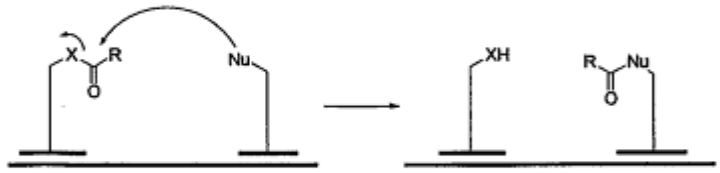


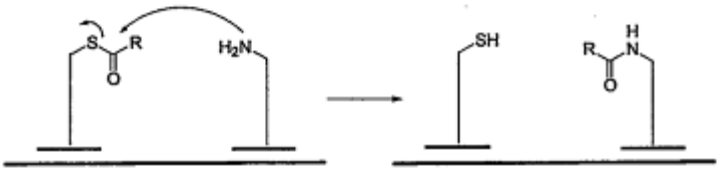
Fig. 20. Tipos de reacción permitiendo reacciones y activaciones simultaneas. Sustitución nucleofílica usando la activación de electrófilos.

A. Bloques de construcción de monómeros acilantes - principio

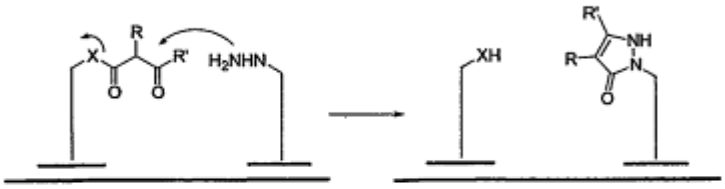


X= O, S Nu = oxígeno-, Nitrógeno, Sulfuro- y Carbon Nucleofilos

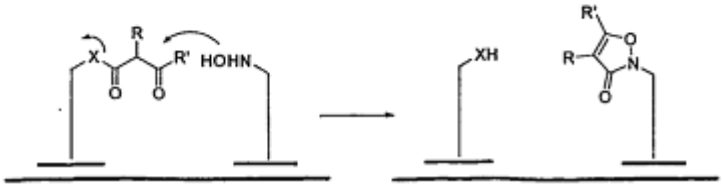
B. Acilación
Formación de amida por reacción de aminos con éster activados



C. Acilación
Formación de pirazolona por reacción de hidrazinas con β–Ketoesters

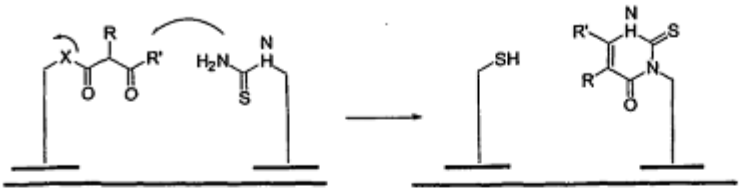


D. Acilación
Formación de isoxazolona por reacción con hidroxilaminas con β–Ketoesters



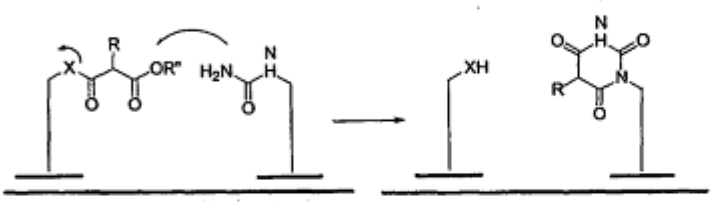
E. Acilación

Formación de pirimidina por reacción de tioureas con β–Ketoesters



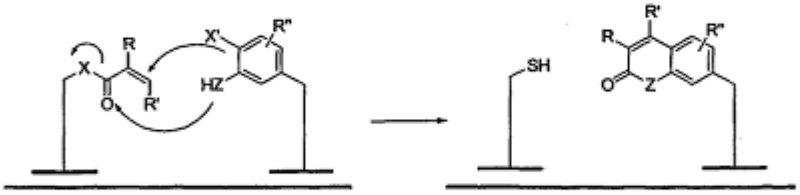
F. Acilación

Formación de pirimidina por reacción de ureas con Malonatos



G. Acilación

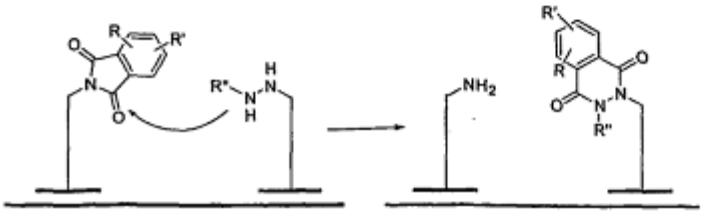
Formación de cumarina o quinolinona por uan reacción Heck seguida de una sustitución nucleofílica



X = O,S X' = Halogen, OTf, OMs Z = O, NH

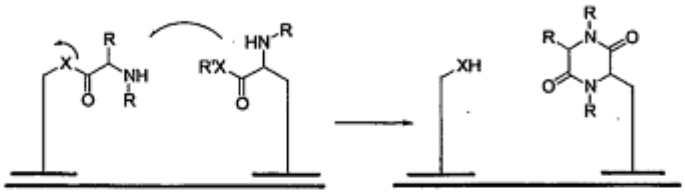
H. Acilación

Formación de ftalhidrazida por reacción de hidrazonas y ftalimidas



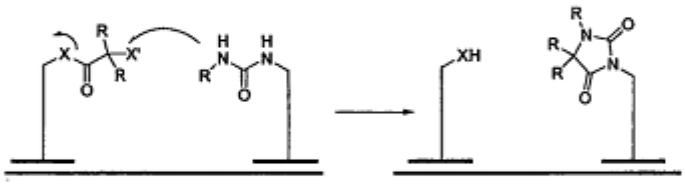
I. Acilación

Formación de dicetopiperazine por reacción de Amino Acidos Esteres



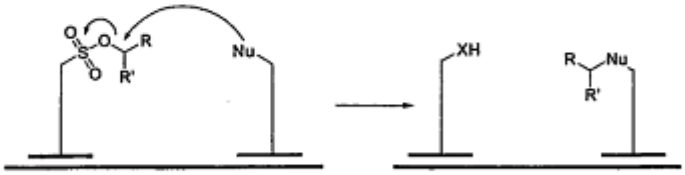
J. Acilación

Formación de Hidantoina por reacción de Urea y Esteres α-sustituidos

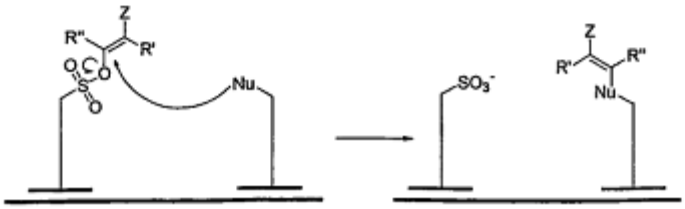


K. Bloques de construcción de monómeros alquilados - principio

Compuestos alquilados por reacción de Sulfonatos con Nucleofilos

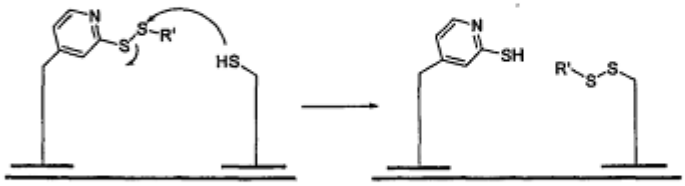


L. Bloques de construcción de monómeros vinilados - principio



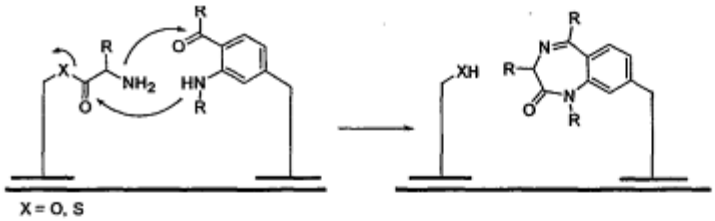
M. Electrofilos Heteroatomicos

Formación de disulfido por reacción de Piridil disulfido con Mercaptanos



N. Acilación

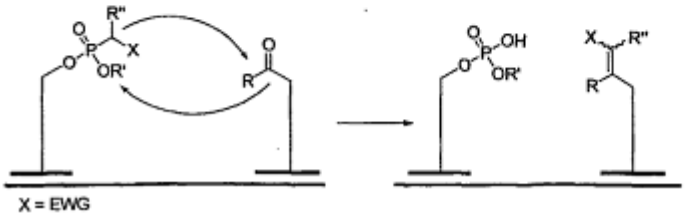
Formación de Benzodiazepinona por reacción de Amino Acidos Esteres y Amino cetonas



Adición de enlaces multiples de hetero-carbón

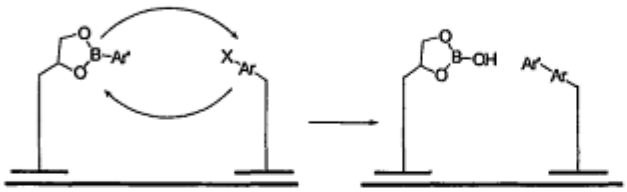
O. Reactivos de Wittig/Horner-Wittig-Emmons

Formación de sustitutos de alqueno por reacción de fosfonatos con Aldehidos o cetonas

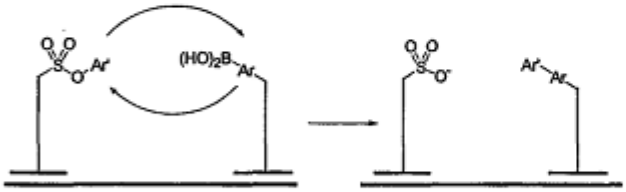


Metal de transición de reacciones catalizadas

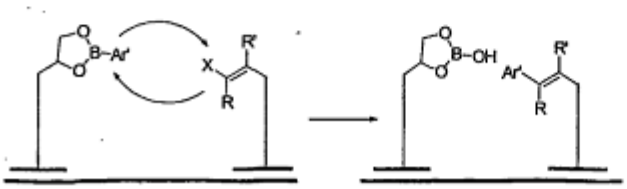
P.Arilación
Formación Biaril por reacción de Boratos con Arilos o Heteroarilos



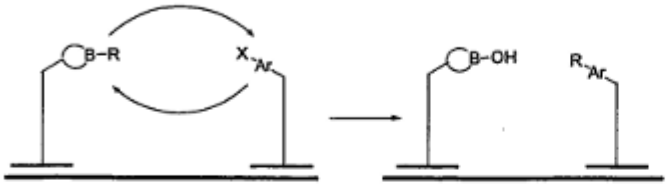
Q.Arilación
Formación Biaril por reacción de Boratos con Arilos o Heteroarilos



R. Arilación
Formación de vinilareno por reacción de alquenos con arilos o heteroarilos

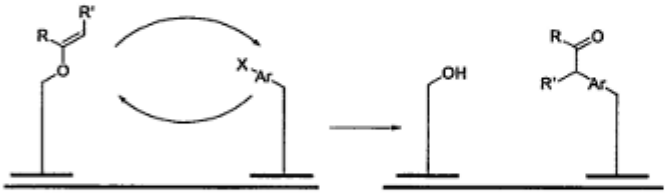


S. Alquilación
Alquilación de arenos/heteroarenos por reacción con boronatos de Alquilo



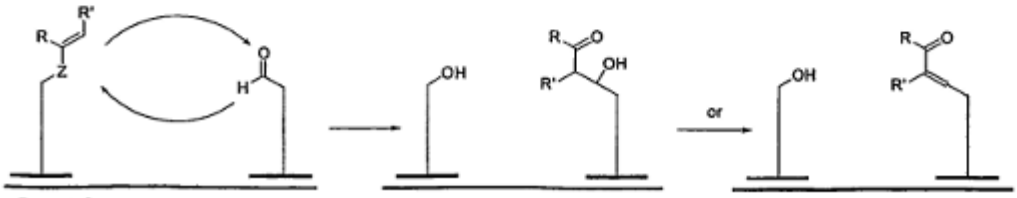
X= Halógeno, OMs, OTf, OTos, etc

T. Alquilación
Alquilación de arenos/heteroarenos por eracción con éteres de enol



X= Halógeno, OMs, OTf, OTos, etc

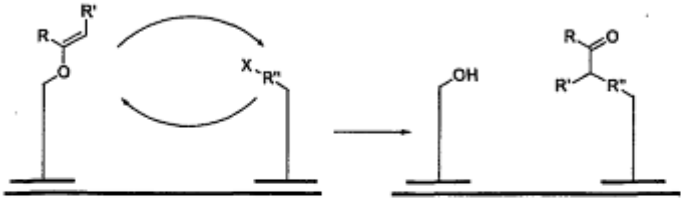
Sustitución Nucleofilica usando la activación de nucleófilos
U. Condensaciones
Alquilación de aldeidos con éteres de enol o enaminas



Z = NR, O; X= Halógeno, OMs, OTf, OTos, etc

V. Alquilación

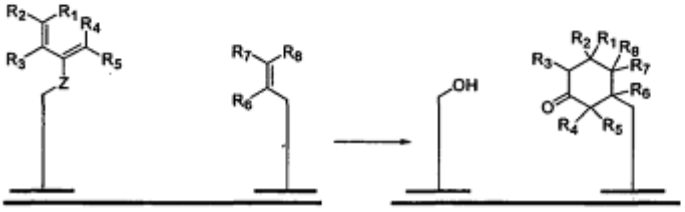
Alquilación de haluros alifáticos y tosilatos con éteres de enol o aminas



X= Halógeno, OMs, OTf, OTos, etc

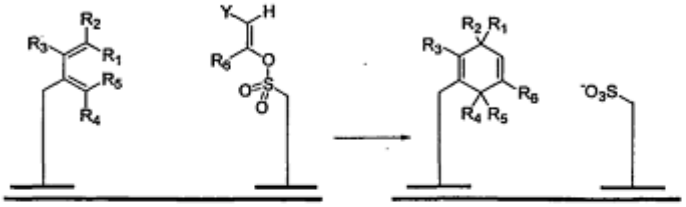
Cicloadiciónes

W. [2+4] Cicloadiciónes



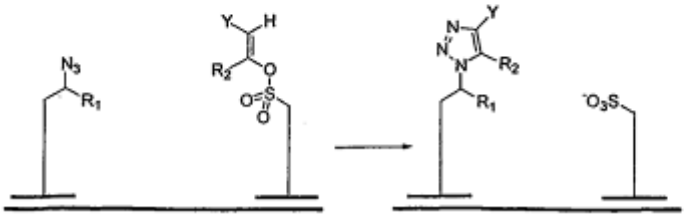
Z = O, NR

X. [2+4] Cicloadiciónes



Y, CN, COOR, COR, NO_2, SO_2R, S(=O)R, SO_2NR_2, F

Y. [3+2] Cicloadiciónes



Y, CN, COOR, COR, NO_2, SO_2R, S(=O)R, SO_2NR_2, F

Z. [3+2] Cicloadiciónes

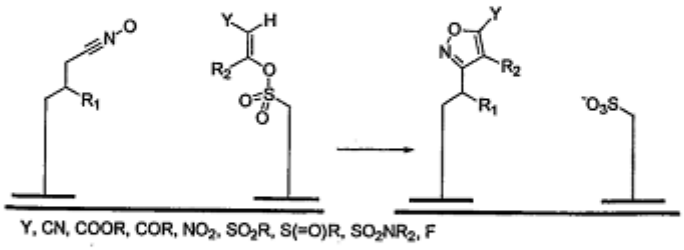
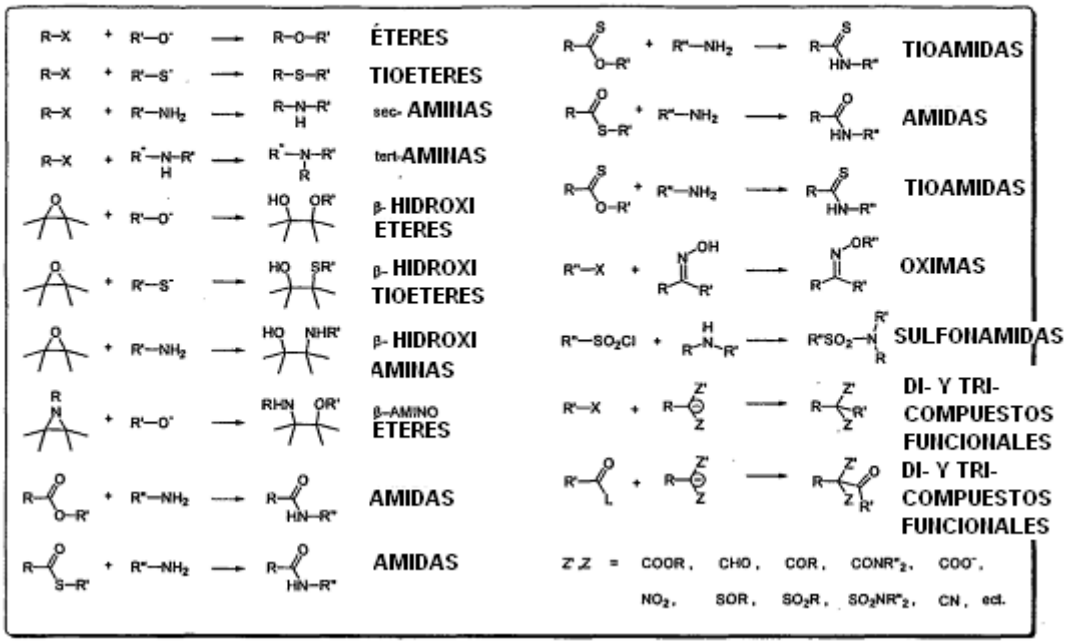
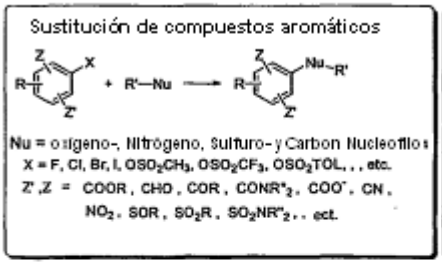


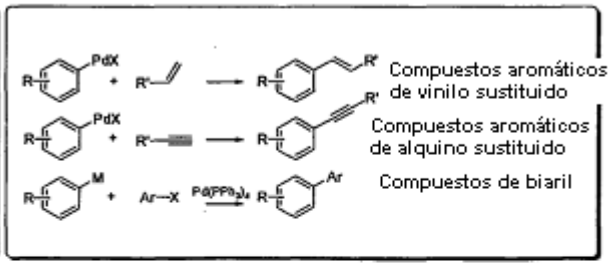
Fig. 21. Pares de grupos reactivos X,Y y el enlace resultante XY.
Reacción de sustitución Nucleofílica



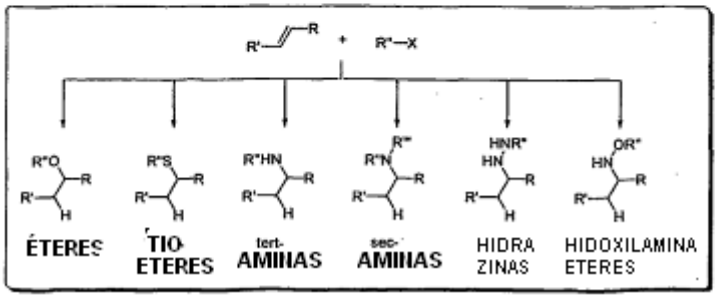
Sustitución nucleofilica aromatica

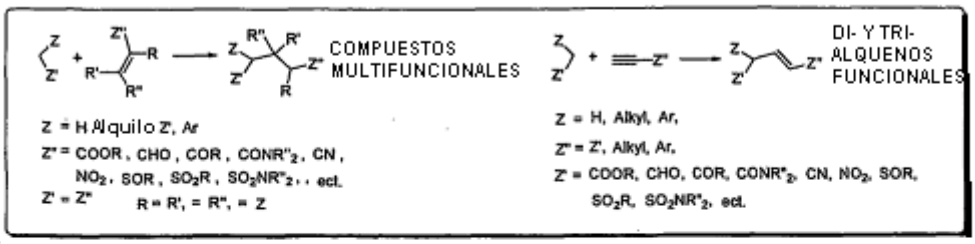


Reacciones catalizadas de metal de transición

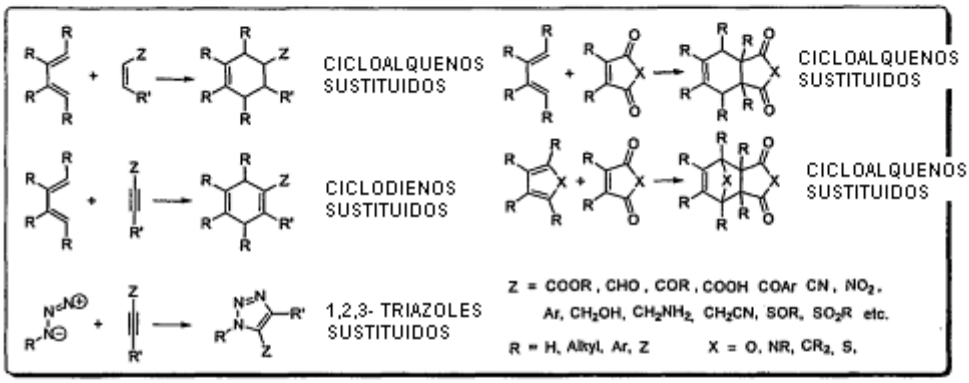


Adcición de enlaces multiples carbón-carbón





Cicloadición a enlaces múltiples



Adición a enlaces múltiples de hetero-carbón

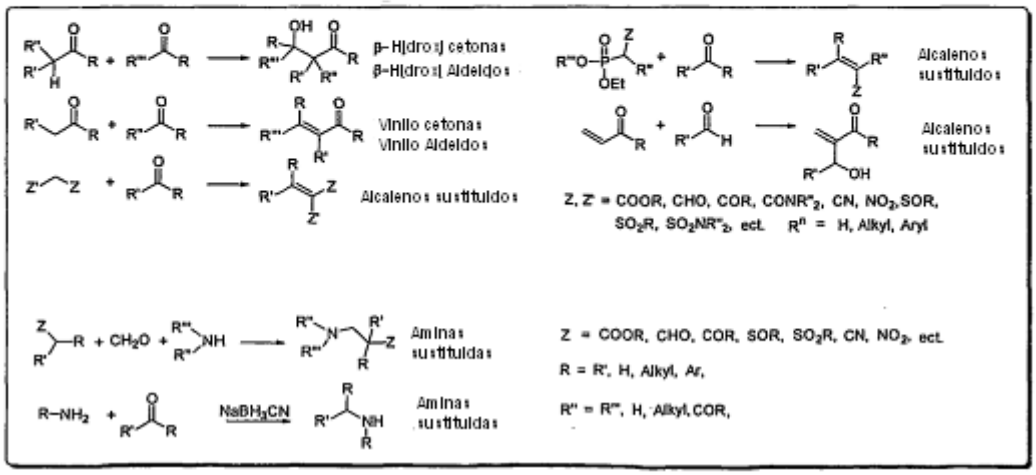


Fig. 22. Incremento del efecto de proximidad: Caja de cremallera.

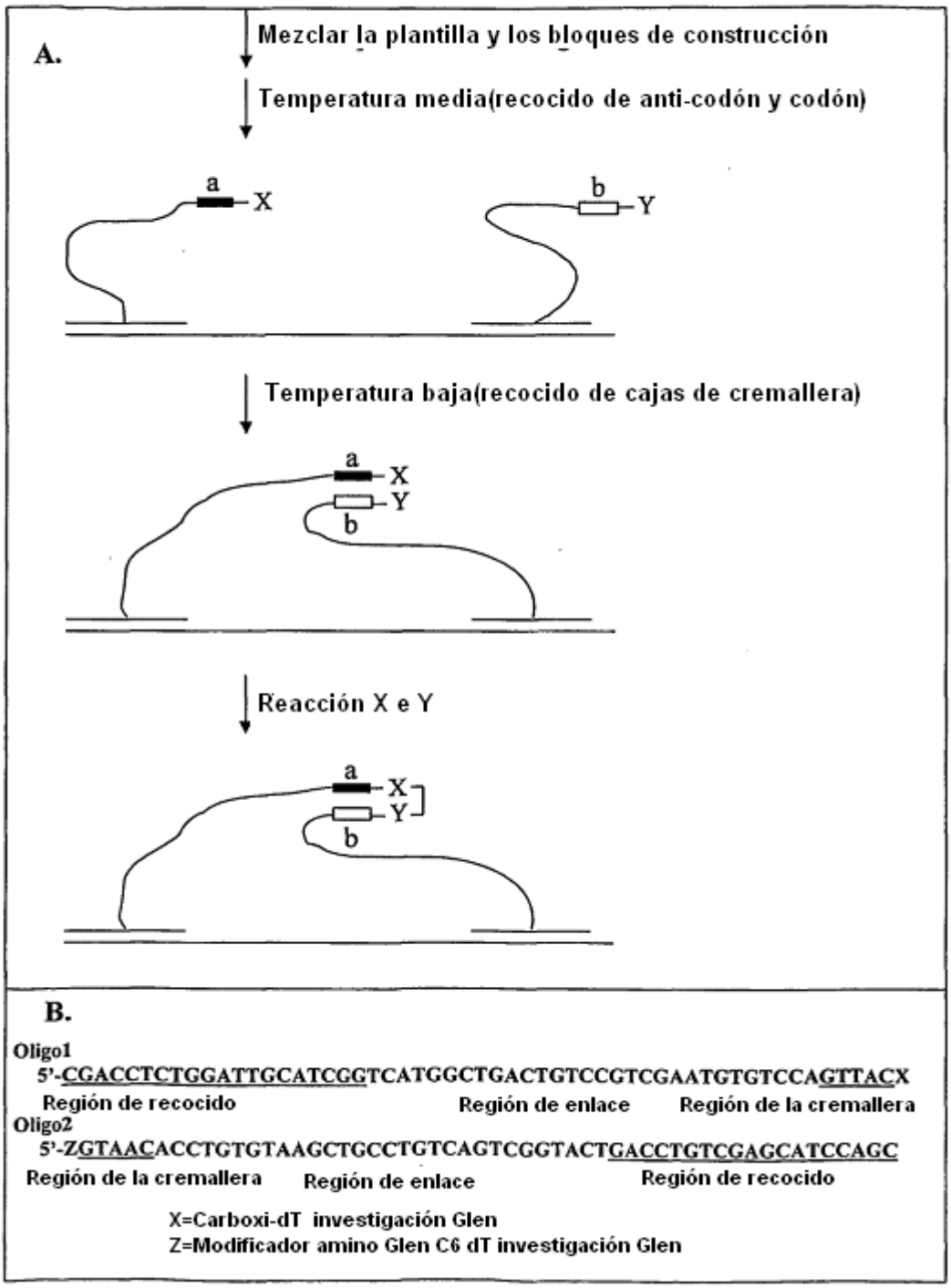


Fig. 23. Incremento de efecto de proximidad: Apilado de helio(A), Ligadura(B) y (C) enlazadores rígidos

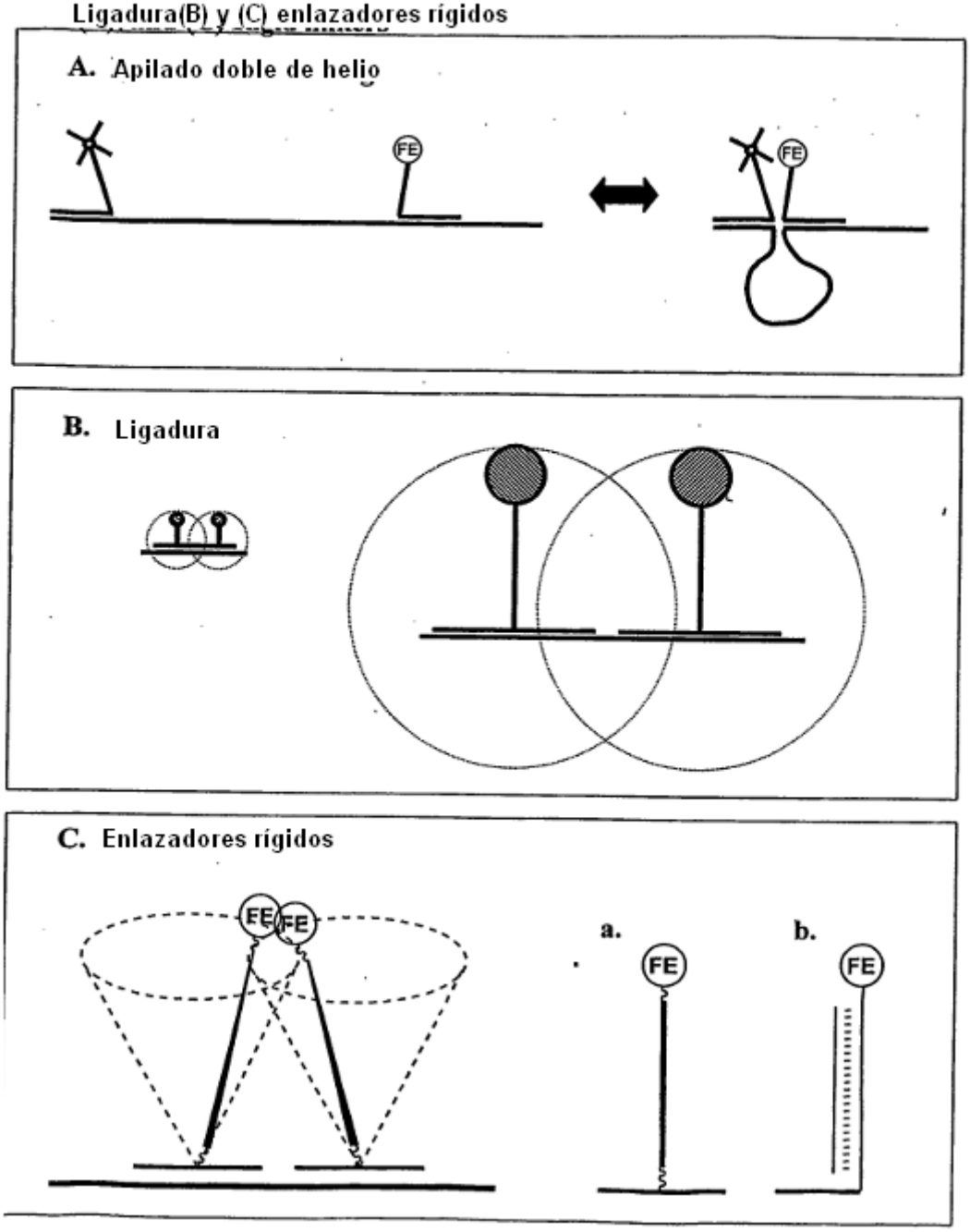
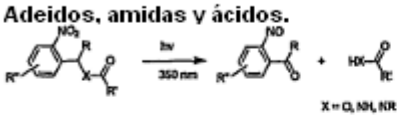
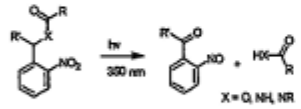


Fig. 24. Enlazadores escindibles

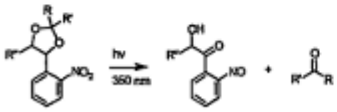
A. Enlazador para la formación de cetonas, Adeidos, amidas y ácidos.



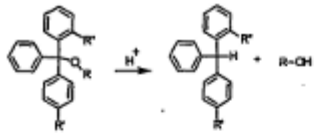
B. Enlazador para la formación de cetonas, Amidas y Ácidos



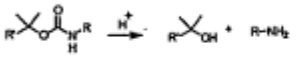
C. Enlazador para la formación de Aldeidos y cetonas



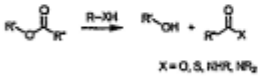
D. Enlazador para la formación de alcoholes y ácidos.



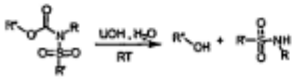
E. Enlazador para la formación de aminas y alcoholes



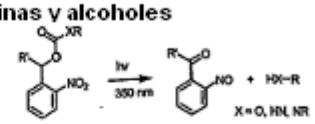
F. Enlazador para la formación de Esteres, Tioésteres, Amidas y alcoholes



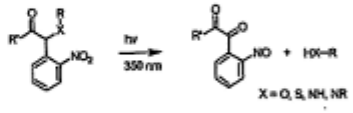
G.Enlazador para la formación de Sulfonamidas y Alcoholes



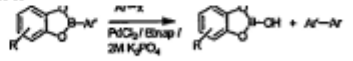
H. Enlazador para la formación de cetonas, aminas y alcoholes



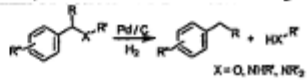
I. Enlazador para la formación de cetonas, aminas,alcoholes y mercaptanos.



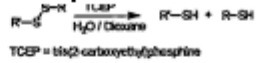
J. Enlazador para la formación de Biaril y Bietaril



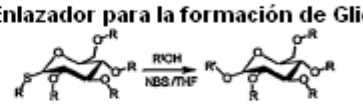
K.Enlazador para la formación de Benzilos, Aminas, Alcoholes de anilinas y fenoles



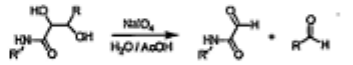
L. Enlazador para la formación de mercaptanos



M. Enlazador para la formación de Glicosidas



N. Enlazador para la formación de Aldeidos y Glicosilamidas



O. Enlazador para la formación de Aldeidos, cetonas y aminoalcoholes

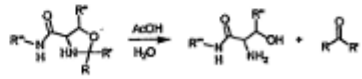


Fig. 25. Síntesis de plantillas por generación de nuevo grupo reactivo.

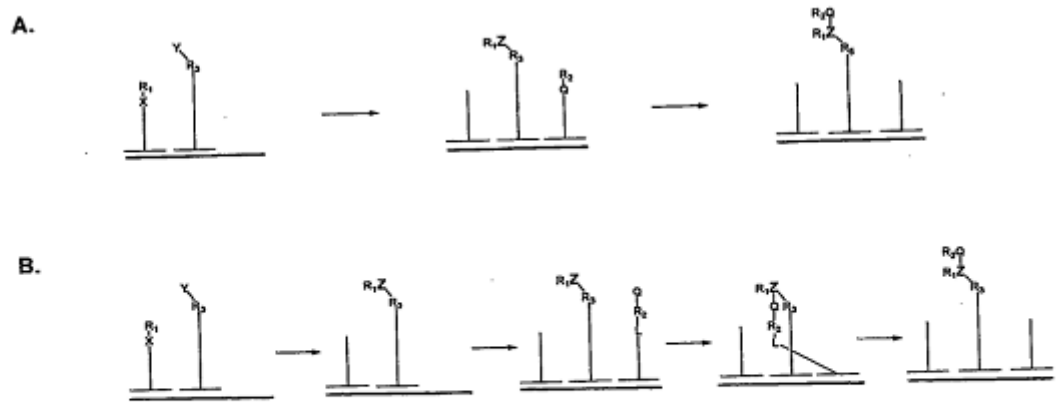


Fig. 25, ejemplo1. Generación de grupos reactivos en la primera ronda de reacción, seguido de la reacción de la generación de los grupos reactivos con los grupos reactivos introducidos.

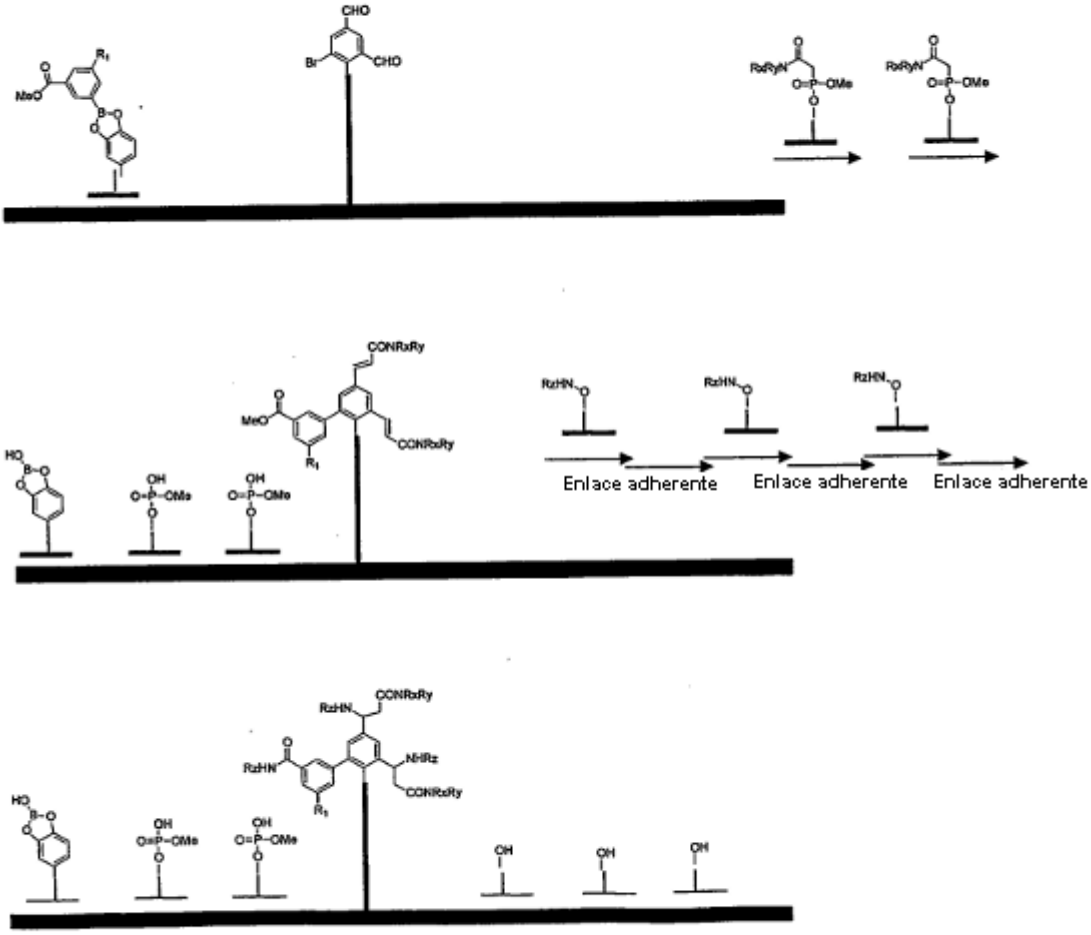
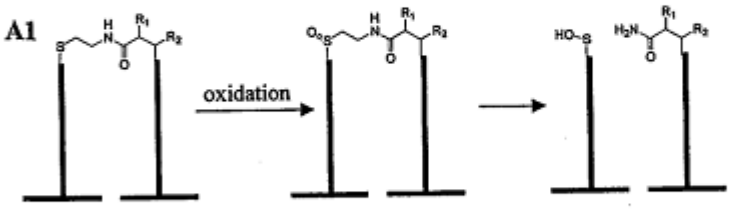


Fig.26. Modificación posterior a la plantilla de la molécula con plantilla

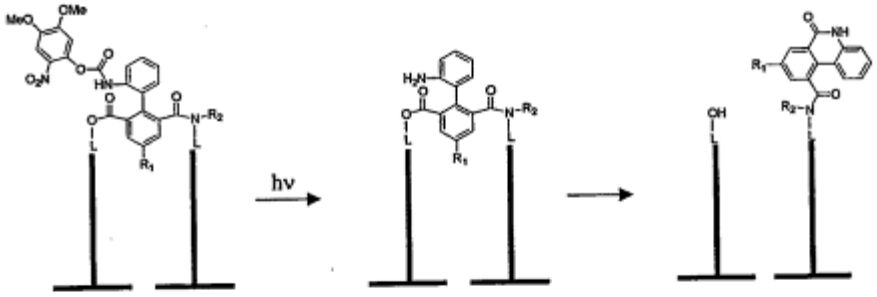
A Reordenamiento y la escisión en un solo paso,ej:

A1



A2

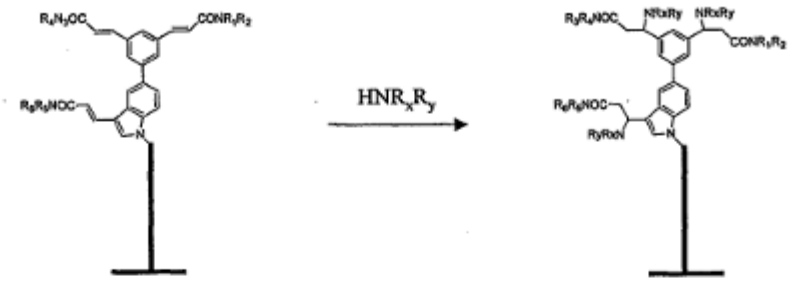
Grupo de protección foto labil



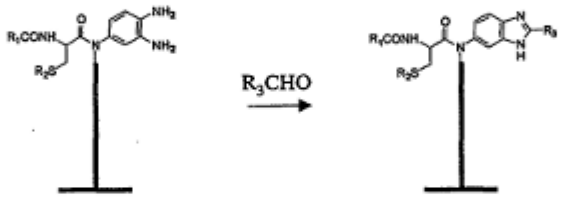
B Reacción de grupos funcionales presentes en una molécula con plantilla

B1 Adición Michael intramolecular:

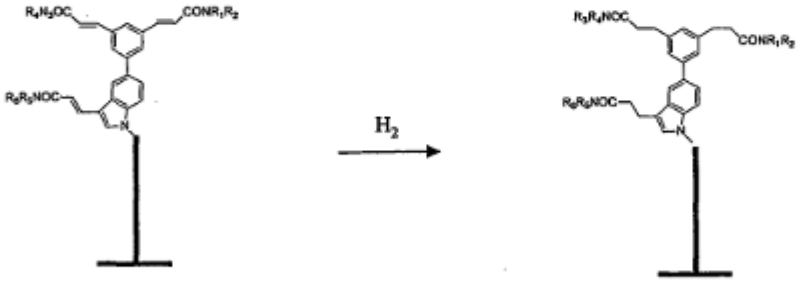
B2 Adición Michael intramolecular:



B3 Reacción de fenilenadiaminas y adeidos para formar bencimidazoles:



B4 Reducción de enlaces multiples



C modificación posterior de plantillas de enlazador para extender la distancia entre la plantilla y la molécula de plantilla

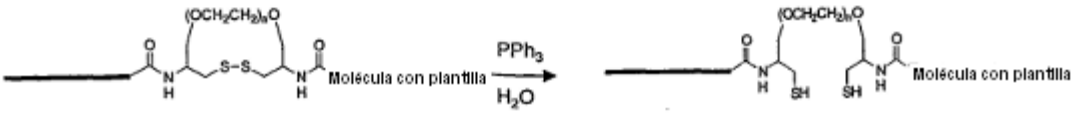
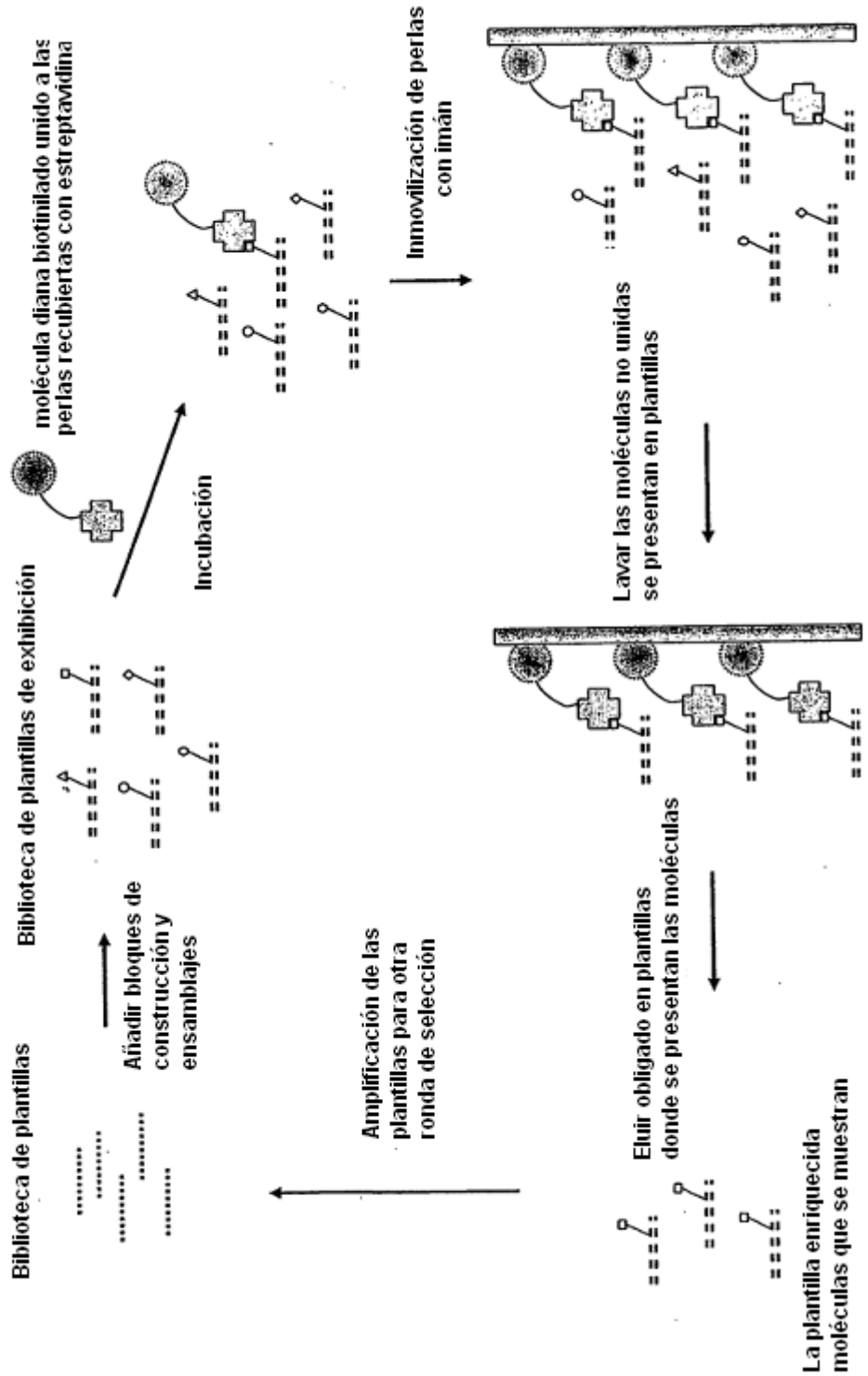


Figura 27.

Un protocolo típico para paneo selección de moléculas de molde-exhibición



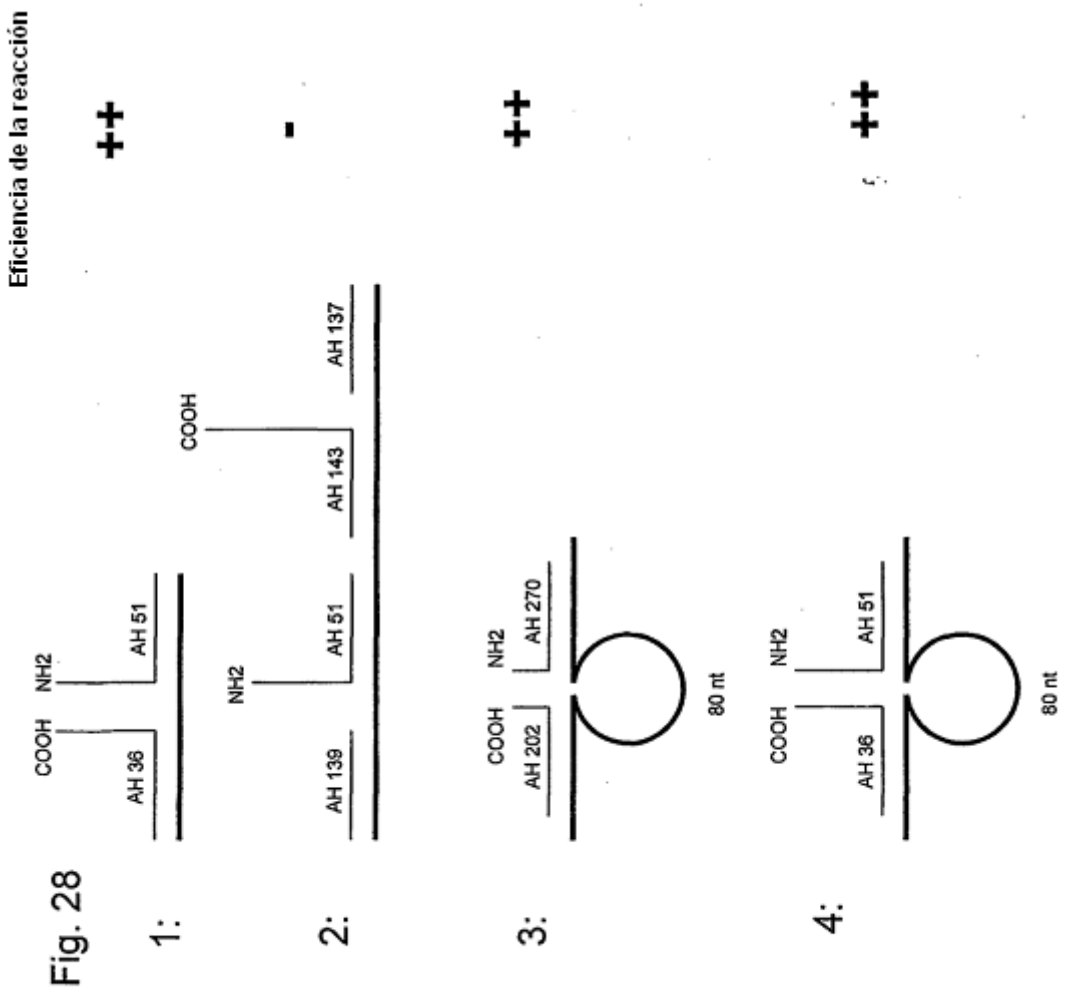


Fig. 28
Eficiencia de la reacción
1:
COOH
NH2
AH 36
AH 51
++
2:
NH2
COOH
AH 139
AH 51
AH 143
AH 137
-
3:
COOH
NH2
AH 202
AH 270
80 nt
++
4:
COOH
NH2
AH 36
AH 51
80 nt
++

Fig. 28

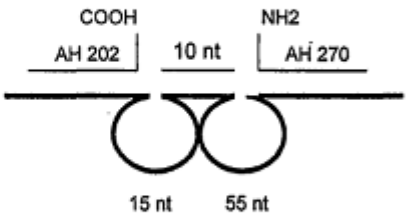
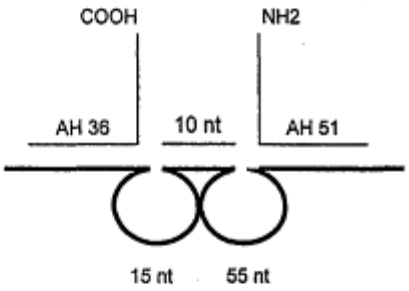
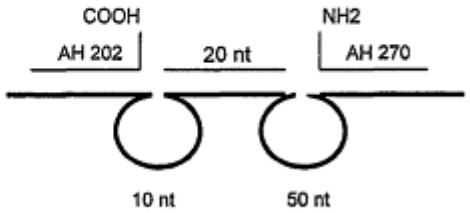
		Eficiencia de la reacción
5:		(+)
6:		++
7:		-

Fig. 28

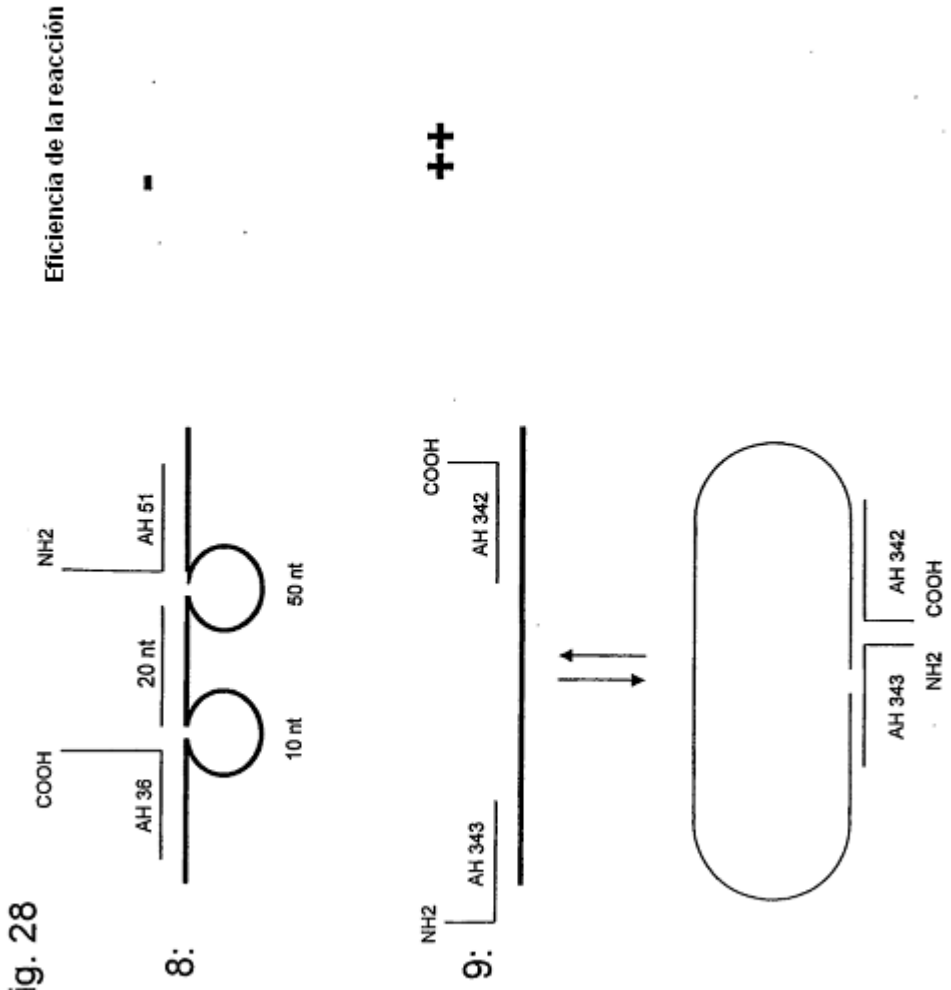

Eficiencia de la reacción
8:
COOH
AH 36
10 nt
20 nt
NH2
AH 51
50 nt
-
9:
NH2
AH 343
COOH
AH 342
++
AH 343
NH2
AH 342
COOH

Fig. 28

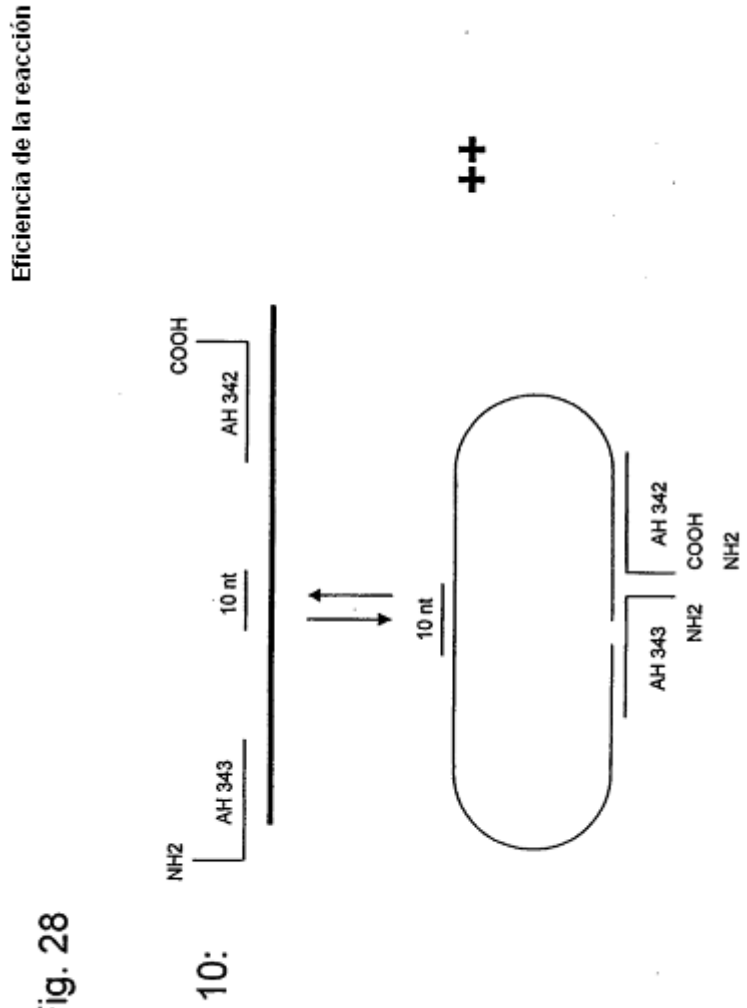

Eficiencia de la reacción
10:
NH2
AH 343
10 nt
COOH
AH 342
10 nt
AH 343
NH2
AH 342
COOH
NH2
++

Fig. 28

11:

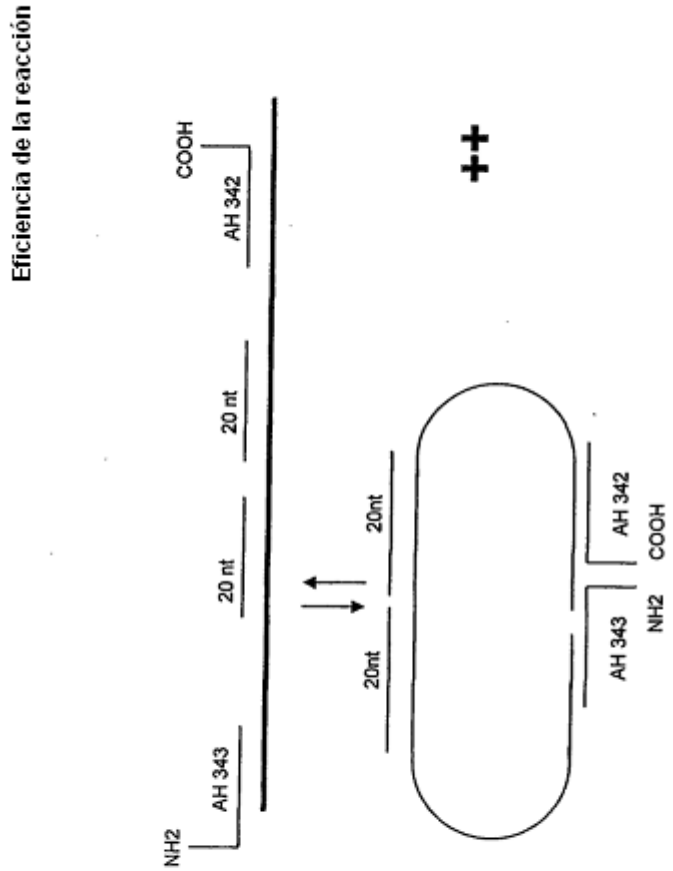
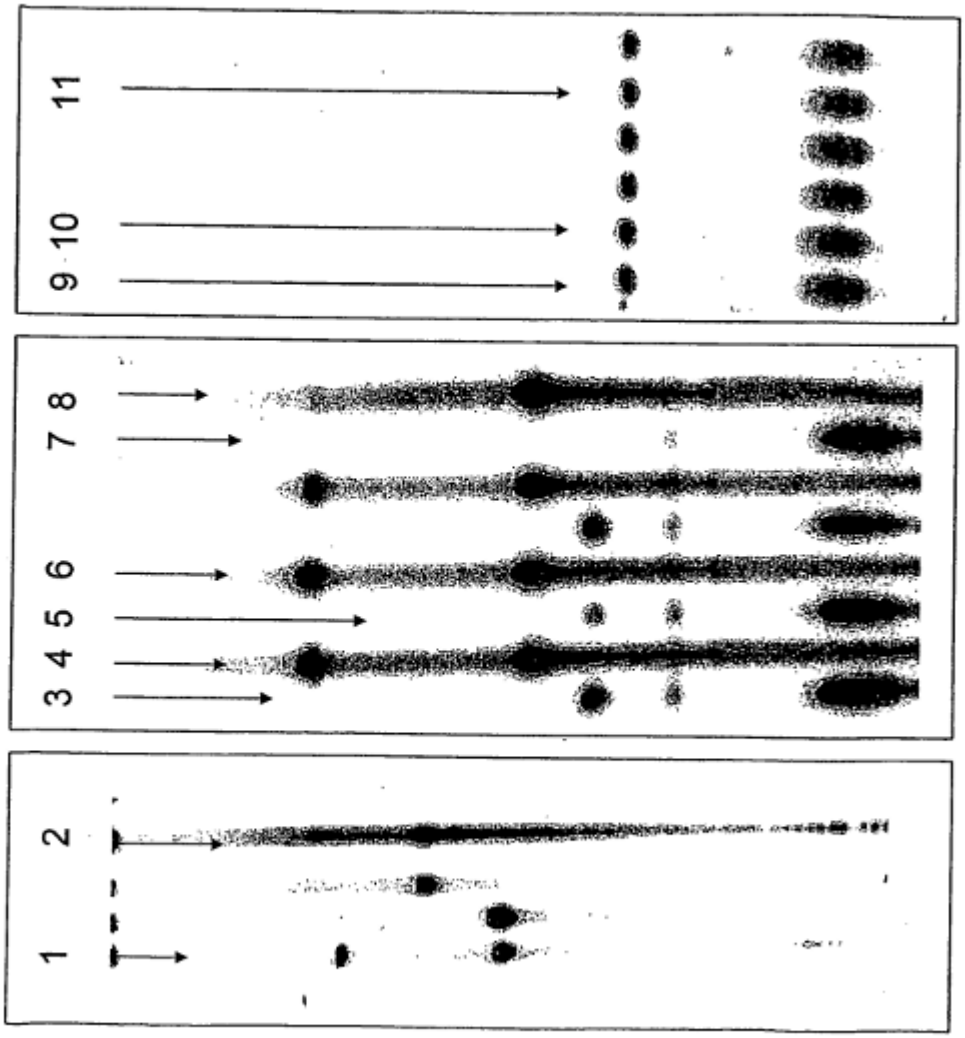

Eficiencia de la reacción
NH2
AH 343
20 nt
20 nt
AH 342
COOH
20nt
20nt
++
AH 343
NH2
AH 342
COOH

Fig. 29



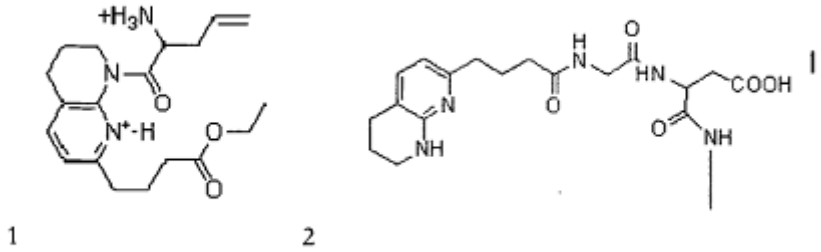


Figura 30.

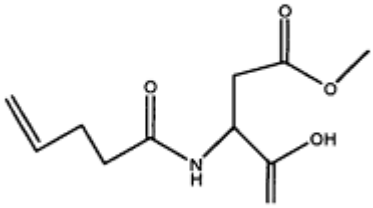


Figura 31.

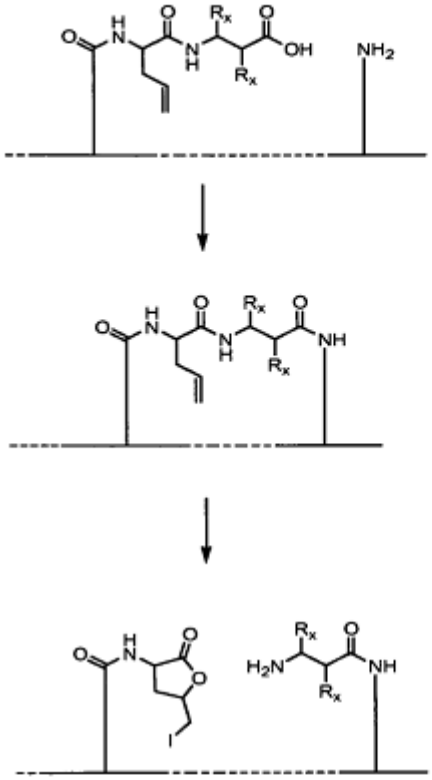


Figura 32.

Figura 33.

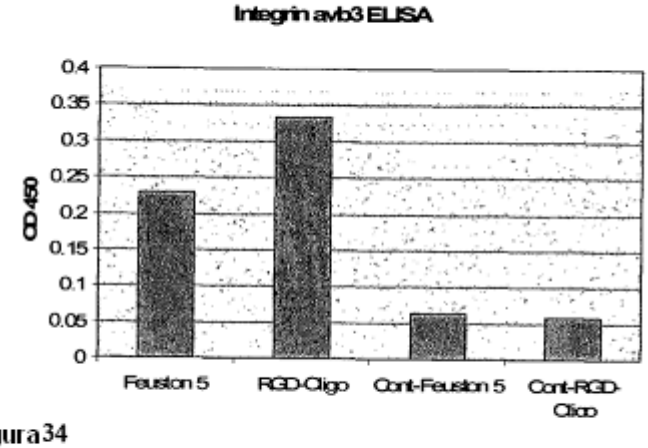

Integrin avb3 ELISA
OD 450
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
Feuston 5
RGD-Oligo
Cont-Feuston 5
Cont-RGD-Oligo

Figura 34