(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 640 279**

(51) Int. CI.:

C12N 15/10 (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01)
C07B 61/00 (2006.01)
C40B 40/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2003 E 10184069 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017 EP 2348125**

(54) Título: **Procedimiento para la síntesis de un complejo bifuncional**

(30) Prioridad:

30.10.2002 DK 200201652
30.10.2002 US 422167 P
19.12.2002 DK 200201955
19.12.2002 US 434425 P
11.07.2003 DK 200301064
11.07.2003 US 486199 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.11.2017

(73) Titular/es:

NUEVOLUTION A/S (100.0%)
Rønnegade 8, 5th floor
2100 Copenhagen, DK

(72) Inventor/es:

FRESKGARD, PER-OLA;
FRANCH, THOMAS;
GOULIAEV, ALEX HAAHR;
LUNDORF, MIKKEL, DYBRO;
FELDING, JAKOB;
OLSEN, EVA, KAMPMANN;
HOLTMANN, ANETTE;
JAKOBSEN, SOREN, NYBOE;
SAMS, CHRISTIAN;
GLAD, SANNE, SCHRØDER;
JENSEN, KIM BIRKEBÆK y
PEDERSEN, HENRIK

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

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).

Procedimiento para la síntesis de un complejo bifuncional

Descripción

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. nº de serie 60/422.167 presentada el 30 de octubre de 2002; la solicitud provisional de EE.UU. nº de serie 60/434.425 presentada el 19 de diciembre de 2002 y la solicitud provisional de EE.UU. nº de serie 60/486.199 presentada el 11 de julio de 2003.

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para obtener un complejo bifuncional que comprende parte de molécula de presentación y una parte codificante. La invención también se refiere a un procedimiento para la generación de una biblioteca de complejos bifuncionales, a un procedimiento para identificar una molécula de presentación que tiene una propiedad preseleccionada.

Antecedentes

Se han desarrollado enfoques que permiten la codificación sintética de polipéptidos y otros polímeros bioquímicos. Un ejemplo de este enfoque se desvela en el documento US 5.723.598 que se refiere a la generación de una biblioteca de moléculas bifuncionales. Una parte del complejo bifuncional es el polipéptido y la otra parte es un oligonucleótido identificador que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica e identifica los aminoácidos que han participado en la formación del polipéptido. 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 que tienen afinidad hacia la diana. La biblioteca de complejos bifuncionales se produce mediante un procedimiento comúnmente conocido como división y mezcla. El procedimiento implica que una molécula de ligador se divida en compartimentos separados espaciales y reaccione con un precursor de aminoácido específico en un extremo en cada compartimento y se añada una marca de ácido nucleico que codifica este precursor de aminoácido específico en el otro extremo por una reacción química ortogonal. Posteriormente, el contenido de los diversos compartimentos se recoge (se mezclan) y luego se dividen de nuevo en varios compartimentos para una nueva ronda de reacción alterna con precursor de aminoácido y marca de nucleótido. El procedimiento de división y mezcla continúa hasta que se alcanza la longitud deseada de polipéptido.

Este procedimiento de la técnica anterior está limitado en su aplicación debido a que debe haber químicas compatibles entre los dos procedimientos de síntesis alternos para añadir una unidad química con respecto al de añadir una secuencia de nucleótidos u oligonucleótidos. Según la técnica anterior, el problema de la compatibilidad de síntesis se resuelve por la correcta elección de grupos protectores compatibles a medida que se sintetizan polímeros alternos, y por la correcta elección de procedimientos para la desprotección de un polímero en crecimiento selectivamente mientras que el otro polímero en crecimiento permanece bloqueado.

El documento WO 93/20242 y Brenner & Lerner (Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 89, 1992, páginas 5381-5383) describen procedimientos para sintetizar bibliotecas combinatorias etiquetadas que contienen un polímero químico y un oligonucleotido identificados que define al polímero químico. Las marcas se desprotegen antes de ser añadidas químicamente a un ligador - o a otra etiqueta de nucleótido.

Kinoshita y Nishigaki (Nucleic Acids Symposium Series, vol. 34, 1995, páginas 201-202) describen un procedimiento para la ligación enzimática de oligonucleótidos usando una ARN ligasa T4.

Halpin y Harbury han sugerido en el documento WO 00/23458 otro enfoque en el que las moléculas formadas no sólo se identifican, sino que también son dirigidas por la marca de ácido nucleico. El enfoque también se basa en la estrategia de división y mezcla para obtener 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. Los moldes se separan por hibridación de los codones con una sonda inmovilizada y posteriormente cada una de las cadenas se hace reaccionar 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 10^3 y 10^6 compuestos diferentes. El procedimiento tiene la desventaja de que debe proporcionarse un gran número de moldes de ácido nucleico. En el caso de que se desee una biblioteca final de 10^6 compuestos diferentes debe sintetizarse un total de 10^6 moldes de ácido nucleico. La síntesis es generalmente engorrosa y cara debido a que los moldes de ácido nucleico deben ser de una longitud considerable para asegurar una hibridación suficiente entre la región de codón y la sonda.

En el documento WO 02/074929 se desvela un procedimiento para la síntesis de compuestos químicos. Los compuestos se sintetizan poniendo inicialmente en contacto una unidad de transferencia que comprende un anti-

codón y una unidad reactiva con un molde que tiene una unidad reactiva asociada al mismo en condiciones que permitan la hibridación del anti-codón al molde y posteriormente haciendo reaccionar las unidades reactivas. Por tanto, este procedimiento sufre la desventaja de que inicialmente debe proporcionarse un gran número de moldes de ácido nucleico.

Los procedimientos de la técnica anterior usando moldes sufren la desventaja de que la codificación depende del reconocimiento entre el anti-codón y el molde. La hibridación entre dos oligonucleótidos puede producirse en caso de que haya una complementariedad suficiente entre éstos. Ocasionalmente, la hibridación se producirá aún cuando no esté presente una coincidencia completa entre los oligonucleótidos. Entonces, el efecto es, en el caso de que esté presente una pluralidad de unidades de transferencia, que la secuencia de codones del molde no se corresponde algunas veces con la unidad reactiva realmente reaccionada. Este efecto no deseado es incluso más pronunciado cuando está prevista la formación de la biblioteca debido a una pluralidad de moldes y se supone que los bloques de construcción se encuentran en los medios de reacción. Si la etapa de hibridación no es completamente correcta, se generarán moléculas que están codificadas por los codones incorrectos en el molde. Esto tendrá dos efectos principales sobre el procedimiento de selección realizado en la biblioteca. Primero, los moldes con una combinación de codones que codifica ligandos de unión se perderán en el proceso de selección. En segundo lugar, y puede ser más importante, los moldes con una combinación de codones que codifica ligandos de no unión se enriquecerán.

En un aspecto de la presente invención un objeto es proporcionar un procedimiento no dependiente del molde para obtener una molécula codificada, permitiendo dicho procedimiento que se apliquen químicas versátiles en la formación de la molécula codificada debido a que puede evitarse la aplicación de grupos de protección ortogonales compatibles en la formación alterna de la molécula codificada y la marca de oligonucleótido. La presente invención intenta mejorar en un aspecto preferido el procedimiento de hibridación propenso a error previo sugerido en el procedimiento de reconocimiento de codones. Además, un objeto de la invención es reducir los productos de reacción no específicos formados. Por tanto, en un aspecto de la presente invención, el presente procedimiento tiene una facilidad de corrección inherente que asegura que el fenotipo esté codificado con exactitud por el genotipo.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para obtener un complejo bifuncional que comprende una parte de molécula de presentación y una parte codificante, en el que un complejo bifuncional naciente que comprende un sitio reactivo químico y un sitio de cebado para la adición enzimática de una marca, se hace reaccionar en el sitio reactivo químico con uno o más reactivos, y está provisto de una(s) respectiva(s) marca(s) que identifica(n) el(los) reactivo(s) en el sitio de cebado usando una o más enzimas.

Las enzimas son en general específicas de sustrato, que supone que la adición enzimática de una marca al sitio de cebado no es probable que interfiera con la molécula de presentación que se forma. Por tanto, la aplicación de grupos de protección en la parte codificante, además de la molécula de presentación naciente, puede evitarse por este motivo. Sin embargo, puede desearse por otros motivos proteger la molécula de presentación en crecimiento. Están disponibles enzimas que tienen actividad en medios acuosos y orgánicos. Sin embargo, la gran mayoría de las enzimas tienen una mayor actividad en un medio acuoso en comparación con un medio orgánico. Por tanto, antes o después de proveer la marca puede desearse cambiar los medios con el fin de obtener condiciones aplicables para la reacción del reactivo en el sitio de reacción química.

Generalmente, la parte de molécula de presentación se forma por más de una única ronda de reacción entre uno o más reactivos y el sitio de reacción química. En un cierto aspecto de la invención, el complejo bifuncional naciente reaccionado con uno o más reactivos y provisto de marca(s) respectiva(s) se hace reaccionar adicionalmente una o más veces con uno o más reactivos y se provee de marca(s) identificador(as) respectiva(s) para producir un producto de reacción como parte del complejo bifuncional y una parte identificadora que comprende marcas que codifican la identidad de los reactivos que han participado en la formación del producto de reacción.

En un cierto aspecto de la invención, una ronda o ciclo de reacción implica que un único reactivo se haga reaccionar con el sitio de reacción química y que una marca respectiva que identifica el reactivo se proporcione en el sitio de cebado para la adición enzimática. En otro aspecto de la invención, una ronda de reacción implica que múltiples reactivos se hagan reaccionar en el sitio de reacción química y que marcas que identifican uno o más, pero no necesariamente todos los reactivos, se proporcionen en el sitio de cebado para la adición enzimática. La reacción en el sitio de reacción química y la adición de marcas pueden producirse en cualquier orden, es decir, la reacción puede producirse posterior a, simultáneamente con o previamente a la adición de marcas. La elección del orden puede depender, entre otras cosas, del tipo de enzimas, las condiciones de reacción y el tipo de reactivo.

El complejo bifuncional naciente comprende un sitio de reacción química y un sitio de cebado para la adición enzimática de una marca. Opcionalmente, el complejo bifuncional naciente también comprende un resto de enlace que conecta el sitio de reacción química con el sitio de cebado.

El resto de enlace puede servir para diversos fines, tales como distanciar suficientemente entre sí el sitio de cebado

del sitio de reacción química para permitir que una enzima realice la adición de marcas y proporcionar una región de hibridación. En un aspecto de la invención, el resto de enlace es una secuencia de ácidos nucleicos. La longitud del oligonucleótido es preferentemente adecuada para hibridarse con un oligonucleótido complementario, es decir, el número de nucleótidos en el resto de enlace es adecuadamente 8 o superior. En una cierta realización, el resto de enlace está unido al sitio de reacción química mediante un espaciador que comprende un ligador selectivamente escindible para permitir un desprendimiento de la molécula de presentación de la parte codificante en una etapa posterior a la formación del complejo bifuncional final. Un complejo bifuncional naciente también se denomina en lo sucesivo un complejo en crecimiento y especifica un complejo inicial o intermedio que va a procesarse según el procedimiento de la presente invención. Un complejo intermedio designa un complejo inicial que se ha sometido a una o más rondas de reacción con reactivo y adición de marcas.

El sitio de reacción química puede comprender un único o múltiples grupos reactivos que pueden hacerse reaccionar con uno o más reactivos. En un cierto aspecto, el sitio de reacción química comprende un andamiaje que tiene uno o más grupos reactivos unidos. Ejemplos de grupos reactivos adecuados incluyen grupos amina, ácido carboxílico, tio, aldehído e hidroxilo. Ejemplos de andamiajes incluyen benzodiazepinas, esteroides, hidantoínas, piperazinas, dicetopiperazinas, morfolinas, tropanos, cumarinas, quinolinas, indoles, furanos, pirroles, oxazoles, precursores de aminoácidos y tiazoles. Además, los grupos reactivos del sitio de reacción química pueden estar en una pro-forma que tiene que activarse antes de que pueda tener lugar una reacción con el reactivo. Como ejemplo, los grupos reactivos pueden protegerse con un grupo adecuado que necesita eliminarse antes de que pueda continuar una reacción con el reactivo. Una molécula de presentación en la presente descripción con reivindicaciones indica un sitio de reacción química que ha reaccionado con uno o más reactivos.

Los reactivos de la presente invención incluyen reactivos libres, además de reactivos que comprenden una entidad funcional y una secuencia de ácidos nucleicos. El reactivo libre participa en la reacción con el sitio de reacción química y puede dar lugar a una estructura química de la molécula de presentación final. Una entidad funcional unida a un ácido nucleico puede referirse en este documento como un bloque constructivo y especifica una entidad química en la que la entidad funcional puede hacerse reaccionar en el sitio de reacción química. En un cierto aspecto de la invención, la entidad funcional se separa de la parte de ácido nucleico y se transfiere al sitio de reacción química. El oligonucleótido del bloque constructivo puede o puede no contener información sobre la identidad de la entidad funcional. En una cierta realización de la presente invención, el reactivo es un bloque constructivo que comprende un oligonucleótido suficiente complementario al resto de enlace para permitir la hibridación, una entidad funcional transferible y un anti-codón que identifica la entidad funcional. El reactivo libre generalmente no está unido a un ácido nucleico a menos que un componente de ácido nucleico esté previsto en la molécula de presentación final. El reactivo libre puede tener cualquier estructura química y preferentemente comprende un grupo reactivo o un precursor que, por tanto, permitirá una reacción con un sitio de reacción química. Ejemplos de grupos reactivos incluyen grupos hidroxilo, grupos ácido carboxílico, tioles, isocianatos, aminas, ésteres y tioésteres. Opcionalmente, otro reactivo se produce para mediar en una conexión entre el reactivo libre y el sitio de reacción química. La entidad funcional de un bloque constructivo se parece al reactivo libre en la medida en la que se refiere el requisito para la reacción con el sitio de reacción química. Además, sin embargo, en la mayoría de los casos es necesario escindir la conexión entre la entidad funcional y el ácido nucleico tras la reacción. Opcionalmente, la reacción y la escisión pueden producirse en una única etapa. Más adelante se desvelan en detalle diversos tipos de bloques constructivos. En un cierto aspecto de la invención, el reactivo libre o la entidad funcional no incluyen un nucleótido.

La parte codificante del complejo bifuncional naciente se forma mediante la adición de al menos una marca a un sitio de cebado usando una o más enzimas. Otras marcas pueden unirse a una marca previa de manera que se produzca un identificador lineal o ramificado. Siempre que al menos una marca identificadora se una por una reacción catalizada enzimática, otras marcas podrán proporcionarse usando medios químicos o medios enzimáticos a discreción del investigador. En una cierta realización de la invención, todas las marcas se proporcionan usando una reacción catalizada enzimática. Una marca comprende adecuadamente unidades de reconocimiento, es decir, unidades que pueden ser reconocidas por grupos de reconocimiento. La unidad de reconocimiento posee una capacidad para llevar información de manera que se identifique un reactivo. En la naturaleza existe una variedad de diferentes tipos de reconocimiento. Ejemplos son anticuerpos que reconocen un epítope, proteínas que reconocen otra proteína, ARNm que reconoce una proteína y oligonucleótidos que reconocen secuencias de oligonucleótidos complementarias. Generalmente se prefiere que la marca sea una secuencia de nucleótidos.

La parte codificante del complejo bifuncional es en un aspecto preferido de la invención amplificable. La capacidad de ser amplificado permite el uso de una baja cantidad de complejo bifuncional durante un procedimiento de selección. En el caso de que la marca sea una proteína, la proteína puede amplificarse uniendo el ARNm que ha codificado la síntesis del mismo, generando el ADNc del ARNm y sometiendo dicho ARNm a un sistema de traducción. Tal sistema se desvela en el documento WO 98/31700. Un procedimiento alternativo para amplificar una marca de proteína es usar proteínas expresadas en fago. En general, sin embargo, la marca es una secuencia de nucleótidos que puede amplificarse usando técnicas convencionales como PCR. Cuando dos o más marcas están presentes en un oligonucleótido identificador lineal, dicho oligonucleótido consiste generalmente en un cierto tipo de estructura de esqueleto, de manera que se permite que una enzima reconozca el oligonucleótido como sustrato. Como ejemplo, la estructura del esqueleto puede ser ADN o ARN.

El sitio de cebado de un complejo bifuncional naciente puede recibir una marca. La identidad química del sitio de cebado depende, entre otras cosas, del tipo de marca y de la enzima particular usada. En el caso de que la marca sea un polinucleótido, el sitio de cebado comprende generalmente un grupo 3'-OH o 5'-fosfato de un nucleótido receptor, o derivados funcionales de tales grupos. Enzimas que pueden usarse para la adición enzimática de una marca al sitio de cebado incluyen una enzima seleccionada de polimerasa, ligasa y recombinasa, y una combinación de estas enzimas.

La reacción entre el sitio de reacción química y el uno o más reactivos puede tener lugar bajo condiciones adecuadas que favorezcan la reacción. En algunos aspectos de la invención, la reacción se realiza bajo condiciones de hibridación, es decir, una hibridación entre dos oligonucleótidos complementarios sigue durante las condiciones de reacción. En otros aspectos de la invención, la reacción se realiza bajo condiciones desnaturalizantes para permitir que se produzca la condición adecuada para la reacción. En el caso de que la parte codificante del complejo en crecimiento comprenda un oligonucleótido, dicho oligonucleótido está en un aspecto de la invención en una forma bicatenaria durante la reacción para reducir la probabilidad de reacciones laterales entre componentes del oligonucleótido y reactivos.

La marca que identifica un reactivo puede añadirse al sitio de cebado usando cualquier enzima apropiada. En una cierta realización, una marca se proporciona en el sitio de cebado del complejo bifuncional naciente utilizando una reacción de extensión enzimática. La reacción de extensión puede realizarse por una polimerasa o una ligasa o una combinación de las mismas. La extensión usando una polimerasa se realiza adecuadamente usando un oligonucleótido anti-marca como molde. El oligonucleótido anti-marca se hibrida en el extremo 3' de la parte de oligonucleótido del complejo bifuncional naciente con un nucleótido protuberante monocatenario que comprende un anti-codón que identifica el reactivo. El anti-codón de la anti-marca puede transcribirse en la parte identificadora usando una polimerasa y una mezcla de dNTP. Alternativamente se usa una ligasa para la adición de la marca usando uno o más oligonucleótidos como sustratos. La ligación puede realizarse en un estado monocatenario o bicatenario dependiendo de la enzima usada. En general se prefiere ligar en un estado bicatenario, es decir, que los oligonucleótidos se van a ligarse juntos se mantengan juntos por un oligonucleótido complementario que complementa los extremos de los dos oligonucleótidos.

Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen ADN polimerasa, ARN polimerasa, transcriptasa inversa, ADN ligasa, ARN ligasa, ADN polimerasa Taq, polimerasa Pfu, polimerasa Vent, transcriptasa inversa del VIH-1, fragmento de Klenow o cualquier otra enzima que catalizará la incorporación de elementos complementarios tales como mono-, di- o polinucleótidos. También podrían usarse otros tipos de polimerasas que permitan la extensión por desapareamiento tales como, por ejemplo, ADN polimerasa η (Washington y col., (2001) JBC 276: 2263-2266), ADN polimerasa τ (Vaisman y col., (2001) JBC 276: 30615-30622), o cualquier otra enzima que permita la extensión de pares de bases hibridados desapareados. En otro aspecto, cuando se usan ligasas, ejemplos adecuados incluyen ADN ligasa Taq, ADN ligasa T4, ARN ligasa T4, ADN ligasa T7 y ADN ligasa de *E. coli*. La elección de la ligasa depende hasta un cierto grado del diseño de los extremos que va a unirse juntos. Por tanto, si los extremos están romos puede preferirse ARN ligasa T4, mientras que puede preferirse una ADN ligasa Taq para una ligación de extremos cohesivos, es decir, una ligación en LA que un nucleótido protuberante en cada extremo es un complemento para cada uno.

La marca añadida al sitio de cebado del complejo bifuncional naciente contiene información en cuanto al reactivo. En la presente invención con reivindicaciones, la información referente al reactivo se llamará codón. Aparte de una combinación de los nucleótidos que codifica la identidad del reactivo, una marca puede comprender adicionalmente nucleótidos. En un cierto aspecto de la invención, una marca comprende una secuencia de marco. La secuencia de marco puede servir para diversos fines, tales como una región de hibridación para anti-marcas y/o como una secuencia informativa del momento en el tiempo de la historia de síntesis en el que ha reaccionado el reactivo asociado.

La asociación entre el codón y la identidad del reactivo puede variar dependiendo del rendimiento deseado. En una cierta realización, el codón se usa para codificar varios reactivos diferentes. En una etapa de identificación posterior, la estructura de la molécula de presentación puede deducirse aprovechando el conocimiento de las diferentes químicas de unión, impedimento estérico, desprotección de grupos de protección ortogonales, etc. En otra realización, el mismo codón se usa para un grupo de reactivos que tiene una propiedad común tal como una naturaleza lipófila, peso molecular, una cierta química de unión, etc. Sin embargo, en una realización preferida, el codón es único, es decir, una combinación similar de nucleótidos no identifica otro reactivo. En un enfoque práctico, para un reactivo específico sólo se usa una combinación única de nucleótidos. En algunos aspectos de la invención puede ser ventajoso usar varios codones diferentes para el mismo reactivo. Los dos o más codones que identifican el mismo reactivo pueden llevar adicionalmente información relacionada con diferentes condiciones de reacción. En otro aspecto de la invención, un único codón especifica dos o más reactivos.

En un aspecto de la invención, cada complejo bifuncional se prepara por marcaje simultáneo o secuencialmente y reacción del reactivo como se ilustra en el siguiente esquema:

x-X → ax-XA → 1ax-XA1

Las letras en mayúsculas representan reactivo o sitio de reacción química. Las letras en minúscula representan marcas.

Un andamiaje “X” está ligado a una marca “x”. Un reactivo está ligado a “X”, por ejemplo, “A”, y, por tanto, es una marca para ese fragmento, por ejemplo, “a”. Adecuadamente, la marca es única.

La parte codificante del complejo bifuncional eventualmente formado contendrá todos los codones. La secuencia de cada uno de los codones se usa para descifrar la estructura de los reactivos que han participado en la formación de la molécula presentada, es decir, el producto de reacción. El orden de los codones también puede usarse para determinar el orden de incorporación de los reactivos. Esto puede ser de particular interés cuando se forme un polímero lineal debido a que la secuencia exacta del polímero puede determinarse descodificando la secuencia codificante. Normalmente, para facilitar la etapa de descodificación, una región constante o de unión se transfiere al complejo bifuncional junto con el codón. La región constante puede contener información sobre la posición del reactivo relacionado en la ruta de síntesis de la molécula de presentación.

La invención también se refiere a un procedimiento para identificar una molécula de presentación que tiene una propiedad preseleccionada que comprende las etapas de: someter la biblioteca producida según el procedimiento anteriormente indicado a una condición en la que una molécula de presentación o un subconjunto de moléculas de presentación que tienen una propiedad predeterminada se separe del resto de la biblioteca, e identificar la(s) molécula(s) de presentación que tiene(n) una función preseleccionada descodificando la parte codificante del complejo.

El procedimiento anterior, generalmente denominado en lo sucesivo selección, implica que una biblioteca se someta a una condición con el fin de seleccionar moléculas de presentación que tienen una propiedad que es responsable de esta condición. La condición puede implicar la exposición de la biblioteca a una diana. Los complejos bifuncionales que tienen una afinidad hacia esta diana pueden separarse del resto de la biblioteca eliminando complejos de no unión y eluyendo posteriormente bajo condiciones más rigurosas los complejos que se han unido a la diana. Alternativamente, la parte codificante del complejo bifuncional puede escindirse de la molécula de presentación después de la eliminación de complejos de no unión y la parte codificante puede recuperarse y descodificarse para identificar la molécula de presentación.

Es posible realizar una única o varias rondas de selección contra una diana específica con una amplificación posterior de las variantes seleccionadas. Entonces, estas variantes obtenidas se prueban por separado en un ensayo adecuado. La condición de selección puede ser rigurosa y específica para obtener moléculas de unión en una ronda de selección. Puede ser ventajoso realizar el procedimiento usando una única ronda de selección debido a que el número y la diversidad de los posibles ligantes son mayores en comparación con procedimientos usando selecciones adicionales en los que pueden perderse posibles ligantes. En otra realización, el procedimiento de selección implica varias rondas de selección usando condiciones de rigurosidad creciente. Entre cada selección puede ser deseable una amplificación del complejo seleccionado.

La parte codificante puede amplificarse usando PCR con cebadores que generan dos sitios de corte únicos. Estos sitios de corte pueden usarse para la multimerización de la región codificante clonando en un vector adecuado para secuenciación. Este enfoque permitirá simultáneamente la secuenciación de muchas regiones codificantes. Alternativamente, el producto de PCR se clona directamente en un vector adecuado usando, por ejemplo, clonación TA. En otro enfoque adicional, la identidad de la molécula de presentación se establece aplicando el producto de PCR a una micromatriz adecuada.

Está dentro de la capacidad del experto en la materia construir el diseño deseado de un oligonucleótido. Si se desea una temperatura de hibridación específica, es un procedimiento convencional sugerir composiciones apropiadas de monómeros de ácidos nucleicos y la longitud de los mismos. La construcción de un diseño apropiado puede asistirse por software, tal como Vector NTI Suite o la base de datos pública en la dirección de internet http://www.nwfsc.noaa.gov/protocols/oligoTMcalc.html. Las condiciones que permiten la hibridación de dos oligonucleótidos están influenciadas por varios factores que incluyen temperatura, concentración de sales, tipo de tampón y acidez. Está dentro de las capacidades del experto en la materia seleccionar condiciones apropiadas para garantizar que la puesta en contacto entre dos oligonucleótidos se realice en condiciones de hibridación. La temperatura a la que dos oligonucleótidos monocatenarios forman un dúplex se denomina en lo sucesivo la temperatura de hibridación o la temperatura de fusión. La curva de fusión no es normalmente muy marcada, que indica que la hibridación se produce durante un intervalo de temperatura.

La presente invención puede realizarse en dos modos básicos. Un primer modo usa un reactivo en el que un codón o anti-codón se conecta covalentemente con la entidad funcional que identifica. Un segundo modo usa un reactivo que no se une covalentemente a un codón o anti-codón. La marca se proporciona en el sitio de cebado del complejo bifuncional por una entidad separada del reactivo. Si se lleva a cabo más de una única ronda, el primer y el segundo modo pueden combinarse en cualquier orden. Si va a generarse una biblioteca de complejos bifuncionales

diferentes, los dos modos se realizan según dos enfoques diferentes. Una biblioteca producida usando el primer modo puede realizarse en un único recipiente, que en este documento se denominará en lo sucesivo una síntesis de una sola etapa, mientras que una biblioteca producida según el segundo modo requiere una síntesis por división y mezcla, es decir, la reacción y la adición de marcas deben llevarse a cabo en compartimentos separados para cada complejo. En una cierta realización de la invención, una o más marcas que codifican dos o más reactivos, respectivamente, se proporcionan antes de o después de la reacción que implica los dos o más reactivos y el sitio de reacción química.

Modo 1:

La presente invención se refiere en un primer modo a un procedimiento para codificar la identidad de una entidad química transferida a un complejo bifuncional, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de

a) proporcionar un complejo bifuncional naciente que comprende un grupo reactivo y una región identificadora de oligonucleótidos,
b) proporcionar un bloque constructivo que comprende un oligonucleótido suficiente complementario a la región identificadora para permitir la hibridación, una entidad funcional transferible y un anti-codón que identifica la entidad funcional,
c) mezclar el complejo bifuncional naciente y el bloque constructivo bajo condiciones de hibridación para formar un producto de hibridación,
d) transferir la entidad funcional del bloque constructivo al complejo bifuncional naciente mediante una reacción que implica el grupo reactivo del complejo bifuncional naciente, y
e) extender enzimáticamente la región identificadora de oligonucleótidos para obtener un codón unido al complejo bifuncional que ha recibido la entidad química.

El procedimiento de la invención implica la incorporación de un codón para la entidad funcional transferida al complejo. La incorporación del codón se realiza extendiendo sobre un anti-codón del bloque constructivo usando una enzima apropiada, es decir, una enzima activa en ácidos nucleicos. La transcripción de la región codificante puede llevarse a cabo por una enzima, tal como una polimerasa o una ligasa. En general se prefiere usar enzimas que son específicas hacia el sustrato y el producto final para obtener una transcripción lo más precisa posible del anti-codón. Generalmente está disponible un alto grado de especificidad para enzimas activas para ácido nucleico debido a que una actividad no específica podría destruir la capacidad de sobrevivir de las células vivas. Enzimas especialmente preferidas según la presente invención son polimerasas con actividad de corrección para la codificación con precisión, pero la conservación de las nucleobases en la dirección 5'.

La extensión enzimática puede producirse posterior a o simultáneamente con la transferencia de la entidad funcional o incluso antes de la transferencia. Sin embargo, en general se prefiere realizar la etapa de extensión posterior a la etapa de transferencia para evitar cualquier posible interacción entre la enzima y la entidad funcional.

Como la enzima realizará la extensión sólo cuando la región identificadora y la región identificadora complementaria se hayan hibridado entre sí para formar una doble hélice, se asegura que la entidad funcional y el grupo reactivo han estado en estrecha proximidad cuando el complejo está provisto de un codón. En comparación con el procedimiento de hibridación previamente sugerido, la presente invención tiene la ventaja de que complejos provistos de entidades funcionales mediante una reacción no dirigida no se proveerán de un codón. Por tanto, fácilmente pueden detectarse moléculas positivas falsas debido a la ausencia de un codón.

La invención también se refiere a un procedimiento para obtener un complejo bifuncional compuesto por una parte de molécula de presentación y una parte codificante, en el que el procedimiento para codificar la identidad de una entidad química transferida a un complejo bifuncional comprende además la etapa f) de separar los componentes del producto de hibridación y recuperar el complejo.

La invención puede realizarse transfiriendo sólo una única entidad funcional y el codón correspondiente al complejo bifuncional naciente. Sin embargo, en general se prefiere construir una molécula de presentación compuesta por dos de más entidades funcionales. Por tanto, en un aspecto preferido de la invención se idea un procedimiento para obtener un complejo bifuncional compuesto por una parte de molécula de presentación y una parte codificante, siendo dicha parte de molécula de presentación el producto de reacción de entidades funcionales y el grupo reactivo del complejo inicial, en el que la etapa c) a f) se repiten según convenga. En el ciclo final de la preparación del complejo bifuncional puede prescindirse de la etapa f), notablemente en casos en los que el oligonucleótido identificador bicatenario se obtenga debido a ácido nucleico bicatenario que normalmente es más estable en comparación con un oligonucleótido monocatenario correspondiente. El oligonucleótido identificador también puede convertirse en bicatenario por un procedimiento de extensión en el que un cebador se hibrida con el extremo 3' del oligonucleótido y se extiende usando una polimerasa adecuada. La capacidad de tener cadenas dobles puede ser una ventaja durante los posteriores procedimientos de selección debido a que un ácido nucleico monocatenario puede realizar interacciones con una diana biológica, en una forma similar a aptámeros. En la repetición del ciclo, el complejo bifuncional producido en un ciclo previo, es decir, un complejo bifuncional naciente que ha recibido una entidad funcional y un codón, se usa como complejo bifuncional naciente en el siguiente ciclo de transferencia de la

entidad funcional e incorporación de codones.

Los oligonucleótidos usados según el presente procedimiento son de un tamaño razonable. Por tanto, generalmente se evitan los moldes prefabricados largos sugeridos en la técnica anterior (en el documento WO 00/23458 se sugiere usar oligonucleótidos de al menos 220 y preferentemente 420 nucleótidos).

La invención también se refiere a un procedimiento para generar una biblioteca de complejos bifuncionales que comprende las etapas de:

a) proporcionar uno o más complejos bifuncionales nacientes diferentes que comprenden un grupo reactivo y una región identificadora de oligonucleótidos,
b) proporcionar una pluralidad de diferentes bloques constructivos, comprendiendo cada uno un oligonucleótido suficiente complementario a una región identificadora para permitir la hibridación, una entidad funcional transferible y un anti-codón que identifica la entidad funcional,
c) mezclar complejos bifuncionales nacientes y una pluralidad de bloques constructivos bajo condiciones de hibridación para formar productos de hibridación,
d) transferir entidades funcionales de los bloques constructivos a los complejos bifuncionales nacientes mediante una reacción que implica el grupo reactivo del complejo bifuncional naciente,
e) extender enzimáticamente el oligonucleótido de las regiones identificadoras para obtener codones unidos a los complejos bifuncionales que han recibido las entidades químicas,
f) separar los componentes de los productos de hibridación y recuperar los complejos,
g) repetir las etapas c) a f) una o más veces, según convenga.

Una desventaja asociada a la técnica de hibridación sugerida en la técnica anterior es evidente cuando se considera la formación de bibliotecas. Aún cuando dos oligonucleótidos bicatenarios tengan el mismo número de nucleótidos no se garantiza ni mucho menos que posean la misma temperatura de fusión. Esto es debido al menos en parte al hecho de que números diferentes de enlaces de hidrógeno participan en pares de bases diferentes (el par C-G implica tres enlaces de hidrógeno y el par de bases A-T implica dos enlaces de hidrógeno). Por tanto, el establecimiento de una temperatura para la hibridación de diversos bloques constructivos con un molde será un compromiso entre evitar el desapareamiento y asegurar una hibridación suficiente. La presente invención tiene como objetivo evitar esta desventaja proporcionándose, en una realización preferida de la invención, una región identificadora que tiene una afinidad similar hacia todos los bloques constructivos.

En el caso de que se use más de una secuencia identificadora, por ejemplo, cuando están presentes más de un tipo de grupo reactivo o andamiajes, un bloque constructivo puede ocasionalmente hibridarse erróneamente con la misma. Sin embargo, la entidad funcional transferida se codificará en realidad correctamente en el complejo mediante el procedimiento de extensión. Este enfoque se asemeja a la disposición que se está usando en la naturaleza: permitiendo la incorporación errónea de bases al nivel de ADN (compárese con la hibridación por desapareamiento de bloques constructivos) para obtener la diversificación, pero insistiendo en la codificación correcta del fenotipo (compárese con la extensión del codón derecho en el complejo).

La hibridación entre el identificador y el bloque constructivo puede ser tanto un procedimiento aleatorio como guiado por las secuencias en la región identificadora y la región identificadora complementaria. Un procedimiento aleatorio pueden lograrse usando la misma secuencia en todas las regiones identificadoras y las regiones identificadoras complementarias. Por tanto, una mezcla de identificadores y bloques constructivos se hibridará aleatoriamente o semi-aleatoriamente y creará combinaciones únicas de entidades funcionales. Alternativamente, un procedimiento aleatorio o semi-aleatorio puede lograrse usando bases universales en posiciones de las nucleobases que se oponen al bloque constructivo del identificador que codifica la identidad de un andamiaje particular o grupo reactivo. Las secuencias de los oligonucleótidos identificadores y los oligonucleótidos del bloque constructivo pueden optimizarse de forma que se asegure que las secuencias en una biblioteca que participa en el procedimiento de hibridación se ensamblarán a un grado igual de hibridación independientemente de la entidad funcional que esté unida al bloque constructivo. Por tanto, no habrá sesgo o habrá sesgo disminuido en el procedimiento de selección debido a diferentes propiedades de hibridación para bloques constructivos específicos. Además, las similitudes en el procedimiento de hibridación en cada etapa de hibridación y para cada producto de hibridación en una biblioteca asegurarán que la entidad funcional se presente igualmente para el grupo reactivo/andamiaje. Esto proporcionará condiciones óptimas para la etapa de transferencia.

El complejo bifuncional naciente comprende una región identificadora de oligonucleótidos y un grupo reactivo. El grupo reactivo puede conectarse al oligonucleótido mediante un ligador escindible que permite la separación del producto final de reacción del oligonucleótido. Puede estar presente un único grupo reactivo o pueden estar presentes múltiples grupos reactivos como parte de un andamiaje. El andamiaje puede unirse al oligonucleótido mediante un ligador escindible para permitir la posterior separación del andamiaje reaccionado. Los grupos reactivos pueden seleccionarse de cualquier grupo que pueda recibir una entidad funcional. Ejemplos de grupos reactivos adecuados incluyen grupos amina, carboxílico, tio e hidroxilo. Además, el grupo reactivo del complejo bifuncional naciente puede estar en una pro-forma que tiene que activarse antes de iniciarse el procedimiento de la invención. Un complejo bifuncional naciente también se denomina en lo sucesivo un complejo creciente y especifica un

complejo inicial o intermedio que va a procesarse adicionalmente según la presente invención.

El número de nucleótidos en la región identificadora de la molécula identificadora se determina a partir de cómo de fuerte y específica debe ser la hibridación entre el identificador y el bloque constructivo. Un procedimiento de hibridación más fuerte y más específico se obtiene generalmente con una secuencia de nucleótidos más larga. Normalmente, aproximadamente 10 - 20 nucleótidos son suficientes para lograr hibridación específica y eficiente. Sin embargo, en algunos aspectos de la invención, el intervalo puede ser 2 - 1000, lo más preferentemente entre 15 - 30 nucleótidos.

La región identificadora puede comprender en ciertas realizaciones información sobre la identidad del grupo reactivo o el andamiaje del complejo bifuncional naciente. Tal codón del andamiaje está generalmente en una posición separada del andamiaje para permitir la formación de una doble hélice estable en la parte que comprende la entidad funcional que va a transferirse y el andamiaje. El codón del andamiaje puede tener cualquier longitud, pero generalmente se selecciona con la misma longitud que los codones que especifican las entidades funcionales. La parte trasera de la región identificadora está generalmente provista de una secuencia constante o de unión. La secuencia de unión cuando se hibrida con una parte adecuada del bloque constructivo proporciona un sustrato para que la enzima realice la extensión.

El bloque constructivo comprende un oligonucleótido suficiente complementario a al menos una parte de la región identificadora para permitir la hibridación. El oligonucleótido del bloque constructivo puede no ser completamente complementario al identificador, es decir, pueden permitirse uno o más desapareamientos, pero debe asegurarse que el bloque constructivo pueda hibridarse con la región identificadora. Por sencillez, la parte del oligonucleótido del bloque constructivo que puede hibridarse con el identificador se denominará en lo sucesivo la región identificadora complementaria. En la presente descripción con reivindicaciones, el término hibridación debe entenderse como el procedimiento de unión de dos oligonucleótidos monocatenarios entre sí de forma que se forme un producto de hibridación.

El bloque constructivo también comprende una región anti-codón hecha de oligonucleótidos. El anti-codón identifica la identidad de la entidad funcional del bloque constructivo. En una cierta realización, el mismo anti-codón se usa para codificar varias entidades funcionales diferentes. En una etapa de identificación posterior, la estructura de la molécula de presentación puede deducirse aprovechando el conocimiento de diferentes químicas de unión, impedimento estérico, desprotección de grupos de protección ortogonales, etc. En otra realización, el mismo anti-codón se usa para un grupo de entidades de función que tienen una propiedad común, tal como una naturaleza lipófila, una cierta química de unión, etc. Sin embargo, en una realización preferida, el anti-codón es único, es decir, una combinación similar de nucleótidos no aparece en otro bloque constructivo que lleve otra entidad funcional. En un enfoque práctico, para una entidad funcional específica sólo se usa una única combinación de nucleótidos. En algunos aspectos de la invención puede ser ventajoso usar varios anti-codones para la misma entidad funcional, de la misma forma que la naturaleza usa hasta seis anti-codones diferentes para un único aminoácido. Los dos o más anti-codones que identifican la misma entidad funcional pueden llevar adicionalmente información relacionada con diferentes condiciones de reacción.

Los anti-codones individuales pueden distinguirse de otro anti-codón en la biblioteca por sólo un único nucleótido. Sin embargo, para facilitar un procedimiento de descodificación posterior, en general se desea tener dos o más desapareamientos entre un anti-codón particular y cualquier otro anti-codón que aparezca en los diversos bloques constructivos. Como ejemplo, si se selecciona un codón/anti-codón de 5 nucleótidos de longitud, existen más de 100 combinaciones de nucleótidos en las que aparecen dos o más desapareamientos. Para un cierto número de nucleótidos en el codón, generalmente se desea optimizar el número de desapareamientos entre un codón/anti-codón particular con respecto a cualquier otro codón/anti-codón que aparezca en la biblioteca.

El acoplamiento de la entidad funcional con la región identificadora complementaria puede hacerse con reacciones de acoplamiento adecuadas. Puede usarse cualquier reacción de acoplamiento o combinación de tales reacciones conocidas en la técnica según convenga como es fácilmente reconocido por aquellos expertos en la materia. La entidad funcional ligada a la región identificadora complementaria es una molécula que comprende preferentemente al menos un grupo reactivo que permite el enlace al grupo reactivo del identificador.

La secuencia del anti-codón identifica la entidad funcional unida en el mismo bloque constructivo. Esta secuencia del anti-codón está tanto directamente incluida en la secuencia del bloque constructivo como está unida a un bloque constructivo preexistente usando, por ejemplo, una polimerasa o una ligasa. En una cierta realización, como se desvela en detalle en el Ejemplo 7, las regiones identificadoras complementarias, llamadas oligonucleótidos vehículo en el ejemplo, se cargan inicialmente con las diversas entidades funcionales. Cada uno de los oligonucleótidos vehículo cargados se liga posteriormente a un oligonucleótido anti-codón usando un oligonucleótido puente para ensamblar los dos oligonucleótidos. La reacción de ligación sirve para conectar la entidad funcional que va a transferirse con un anti-codón que especifica la estructura de la entidad funcional. El oligonucleótido anti-codón puede diseñarse de diversas formas. Normalmente, en el diseño se incluye una región que permite la hibridación del puente. Sin embargo, algunas ligasas como la ARN ligasa T4 no requiere un estiramiento del ADN bicatenario. Por tanto, en algunas realizaciones puede prescindirse del puente y la parte de la hibridación de oligonucleótidos anti-

codón con el puente. En el caso de que la región identificadora comprenda un codón que codifica la identidad del andamiaje, el oligonucleótido anti-codón comprende un estiramiento de bases universales como inosinas. Puede prescindirse de las bases universales si una región que complementa una región de unión en la región identificadora se incluye en la dirección 3'. La última realización normalmente implicará que una parte del identificador forme un bucle. La región de unión complementaria se selecciona normalmente de forma que una polimerasa pueda reconocer una doble hélice formada con una región de unión de la molécula bifuncional naciente como sustrato. El anti-codón está adecuadamente posicionado en el lado 5' de la región de unión complementaria, por lo que puede transferirse al complejo naciente por una reacción de extensión. Adecuadamente, la región de unión complementaria se diseña de forma que sea posible identificar la posición del codón particular en la secuencia de codones que aparece en el complejo bifuncional eventual.

La secuencia del anti-codón se transcribe al identificador mediante un procedimiento de extensión para formar el codón en la molécula identificadora. Esto puede llevarse a cabo por cualquier procedimiento del estado de la materia que incluye, pero no se limita a, una reacción de extensión por polimerasa. Una reacción de extensión por polimerasa normalmente requiere la presencia de suficiente actividad de polimerasa junto con cada uno de los cuatro nucleótidos trifosfatos naturales (ATP, CTP, GTP y TTP) en un tampón adecuado. Por tanto, la secuencia de un anti-codón particular sólo se transfiere al identificador como un codón cuando el bloque constructivo y la molécula identificadora se hayan hibridado y permitan que tenga lugar la reacción entre la entidad funcional y el grupo reactivo receptor.

Los cuatro nucleótidos naturales pueden codificar 4^N variantes siendo N la longitud del codón. Por ejemplo, si el único codón tiene 5 nucleótidos de longitud, el número de posibles codificaciones de entidades funcionales diferentes es 1024. Los codones también pueden diseñarse usando un subconjunto de los cuatro nucleótidos naturales en cada posición. Esto puede ser útil en combinación con el uso de nucleobases universales. El anti-codón en cada bloque constructivo está codificando la entidad funcional en el mismo bloque constructivo. Esta secuencia puede incorporarse en un aspecto de la invención por PCR de la región identificadora complementaria con un cebador de la entidad funcional y un cebador del anti-codón.

La entidad funcional del bloque constructivo cumple la función de ser un precursor para la entidad estructural eventualmente incorporada en la molécula presentada. Por tanto, cuando en la presente solicitud con reivindicaciones se establezca que una entidad funcional se transfiere a un complejo bifuncional naciente debe entenderse que no necesariamente todos los átomos de la entidad funcional original van a encontrarse en la molécula de presentación eventualmente formada. Por tanto, como consecuencia de las reacciones implicadas en la conexión, la estructura de la entidad funcional puede cambiarse cuando aparece en la molécula de presentación naciente. Especialmente, la escisión que produce la liberación de la entidad funcional puede generar un grupo reactivo que en una etapa posterior puede participar en la formación de una conexión entre una molécula de presentación naciente y una entidad funcional.

La entidad funcional del bloque constructivo comprende preferentemente al menos un grupo reactivo que puede participar en una reacción que produce una conexión entre la entidad funcional del bloque constructivo y el identificador que lleva el grupo reactivo. El número de grupos reactivos que aparecen en la entidad funcional es adecuadamente de uno a diez. Una entidad funcional que muestra sólo un grupo reactivo se usa, entre otras cosas, en las posiciones terminales de polímeros o andamiajes, en las que las entidades funcionales que tienen dos grupos reactivos son adecuados para la formación de la parte del cuerpo de un polímero o de andamiajes que pueden hacerse reaccionar adicionalmente. En los andamiajes están normalmente presentes dos o más grupos reactivos previstos para la formación de conexiones. Un andamiaje es una estructura de núcleo que forma la base para la creación de múltiples variantes. Las formas variantes del andamiaje se forman normalmente mediante reacción de grupos reactivos del andamiaje con grupos reactivos de otras entidades funcionales, opcionalmente mediado por grupos de relleno o catalizadores. Las entidades funcionales que van a conectarse con el andamiaje pueden contener uno, dos o varios grupos reactivos capaces de formar conexiones. Ejemplos de andamiaje incluyen esteroides, hidantoínas, benzodiazepinas, etc.

El grupo reactivo del bloque constructivo puede ser capaz de formar una conexión directa con un grupo reactivo del identificador o el grupo reactivo del bloque constructivo puede ser capaz de formar una conexión con un grupo reactivo del identificador mediante un grupo de relleno de puente. Debe entenderse que no todos los átomos de un grupo reactivo se mantienen necesariamente en la conexión formada. Más bien, los grupos reactivos deben considerarse como precursores para la estructura de la conexión.

Después de o simultáneamente con la formación de la conexión se realiza una escisión para transferir la entidad funcional al identificador. La escisión puede realizarse en cualquier forma apropiada. En un aspecto de la invención, la escisión implica el uso de un reactivo o y enzima. La escisión produce una transferencia de la entidad funcional al complejo bifuncional naciente o una transferencia del complejo a la entidad funcional del bloque constructivo. En algunos casos puede ser ventajoso introducir nuevos grupos químicos como consecuencia de la escisión del ligador. Los nuevos grupos químicos pueden usarse para la reacción adicional en un ciclo posterior, tanto directamente como después de haberse activado. En otros casos se desea que no quede ninguna traza del ligador después de la escisión.

En otro aspecto, la conexión y la escisión se realizan como una reacción simultánea, es decir, tanto la entidad funcional del bloque constructivo como la molécula de presentación naciente es un grupo saliente de la reacción. En algunos aspectos de la invención se prefiere diseñar el sistema de forma que la conexión y la escisión se produzcan simultáneamente debido a que esto reducirá el número de etapas y la complejidad. La conexión simultánea y la escisión también pueden diseñarse de forma que tanto no quede traza del ligador como de forma que se introduzca un nuevo grupo químico para la posterior reacción, como se ha descrito anteriormente. En otros aspectos de la invención se prefiere realizar etapas de reticulación y de escisión separadas debido a que el enfoque escalonado permite dominar cada subetapa y una reducción en la probabilidad de transferencia no específica.

Preferentemente, al menos un ligador sigue intacto después de la etapa de escisión. El al menos un ligador ligará la molécula de presentación naciente a la región codificante. En caso de que el procedimiento implique esencialmente la transferencia de entidades funcionales a un andamiaje o un polímero en desarrollo, la molécula eventualmente con andamiaje o el polímero podrán unirse a un ligador selectivamente escindible. El ligador selectivamente escindible se diseña de forma que no se escinda en condiciones que produzcan una transferencia de la entidad funcional a la molécula naciente dirigida al molde.

Los ligadores escindibles pueden seleccionarse de una gran plétora de estructura químicas. Ejemplos de ligadores incluyen, pero no se limitan a, ligadores que tienen un sitio de escisión enzimática, ligadores que comprenden un componente degradable químico y ligadores escindibles por radiación electromagnética. Los ligadores escindibles de particular interés son actualmente ligadores que pueden escindirse por luz. Un ejemplo adecuado incluye un grupo o-nitrobencilo posicionado entre la molécula de presentación y la región identificadora.

Los bloques constructivos usados en el procedimiento según la presente invención pueden diseñarse según las entidades particulares implicadas en el bloque constructivo. Como ejemplo, el anti-codón puede unirse a la región identificadora complementaria con un ligador de polietilenglicol (PEG) y la entidad funcional puede unirse directamente a dicha región identificadora complementaria. En otro ejemplo y preferido, el anti-codón, la región identificadora complementaria y la entidad funcional es un oligonucleótido lineal contiguo. En una cierta realización de la invención, el bloque constructivo se diseña de forma que una parte del identificador forme un bucle. El bucle del identificador normalmente se produce debido a que el oligonucleótido del bloque constructivo no se hibrida con la longitud entera del identificador. Normalmente, el bloque constructivo se diseña de forma que pueda hibridarse con al menos la región identificadora del complejo bifuncional y con una región de unión en la parte trasera del identificador. La región identificadora complementaria y el anti-codón pueden conectarse directamente mediante un único enlace, conectarse mediante un ligador de PEG de una longitud adecuada, o una secuencia de nucleobases que puede o puede no comprender nucleobases que complementan los diversos codones y la región de unión en el identificador. En una cierta realización de la invención, el bloque constructivo se diseña sólo para hibridarse con una región de unión, normalmente en un extremo del identificador opuesto al extremo que tiene unida la molécula de presentación. En un aspecto de la invención, el bloque constructivo y/o el identificador naciente están compuestos por dos o más nucleótidos separados que pueden hibridarse entre sí para formar el complejo de hibridación. Los huecos entre los oligonucleótidos pueden llenarse con nucleótido adecuado usando una actividad enzimática apropiada tal como una polimerasa y una ligasa para producir un identificador coherente y o bloque constructivo.

La unión de la entidad funcional a la región identificadora complementaria se realiza normalmente mediante un ligador. Preferentemente, el ligador conecta la entidad funcional con la región identificadora complementaria en un nucleótido terminal o un nucleótido 1 o dos nucleótidos más abajo del oligonucleótido. La unión de la entidad funcional puede ser en cualquier entidad disponible para la unión, es decir, la entidad funcional puede unirse a un nucleótido del oligonucleótido en la nucleobase, o el esqueleto. En general, se prefiere unir la entidad funcional en el fósforo del enlace internucleosídico o en la nucleobase.

En un cierto aspecto de la invención, el grupo reactivo de la entidad funcional está unido al oligonucleótido del ligador. El grupo reactivo es preferentemente de un tipo tal que pueda crear una conexión con la molécula de presentación naciente por tanto reacción directa entre los grupos reactivos respectivos como usando un grupo de relleno adecuado. El grupo reactivo que acopla la entidad funcional con el ligador se escinde preferentemente simultáneamente con el establecimiento de la conexión. La entidad funcional puede contener en algunos casos un segundo grupo reactivo que puede participar en la formación de una conexión en un ciclo posterior. El segundo grupo reactivo puede ser de un tipo tal que necesite la activación antes de poder participar en la formación de una conexión.

En el caso de que dos o más entidades funcionales vayan a transferirse al complejo, los codones pueden separarse por una región constante o una región de unión. Una función de la región de unión puede ser establecer una plataforma en la que pueda unirse la polimerasa. Dependiendo de la molécula codificada formada, el identificador puede comprender adicionalmente codones, tales como 3, 4, 5 o más codones. Cada uno de los codones adicionales puede separarse por una región de unión adecuada. Preferentemente, todos o al menos la mayoría de los codones del identificador se separan de un codón vecino por una secuencia de unión. La región de unión puede tener cualquier número de nucleótidos adecuado, por ejemplo, 1 a 20.

La región de unión, si está presente, puede servir para diversos fines, además de servir de sustrato para una enzima. En un sistema de la invención, la región de unión identifica la posición del codón. Normalmente, la región de unión tanto en la dirección 5'' como en la dirección 3' de un codón comprende información que permite la determinación de la posición del codón. En otro sistema, las regiones de unión tienen secuencias alternas que permiten la adición de bloques constructivos de dos conjuntos en la formación de la biblioteca. Además, la región de unión puede ajustar la temperatura de hibridación a un nivel deseado.

Puede proporcionarse una región de unión con alta afinidad por la incorporación de una o más nucleobases que forman tres enlaces de hidrógeno con una nucleobase relacionada. Ejemplos de nucleobases que tienen esta propiedad son guanina y citosina. Alternativamente, o además, la región de unión puede someterse a modificación del esqueleto. Varias modificaciones del esqueleto proporcionan mayor afinidad, tales como la sustitución de 2'-O-metilo del resto de ribosa, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) y la ciclación de 2'-4' O-metileno del resto de ribosa, también denominado en lo sucesivo LNA (ácido nucleico bloqueado).

El identificador puede comprender regiones flanqueantes alrededor de los codones. La región flanqueante puede englobar un grupo de señal, tal como un fluoróforo o un grupo radiactivo que permita la detección de la presencia o ausencia de un complejo, o la región flanqueante puede comprender una marca que puede detectarse, tal como biotina. Si el identificador comprende un resto de biotina, el identificador puede recuperarse fácilmente.

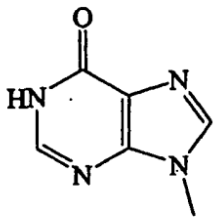
Las regiones flanqueantes también pueden servir de sitios de cebado para reacciones de amplificación tales como PCR. Normalmente, el último ciclo en la formación del complejo bifuncional incluye la incorporación de un sitio de cebado. La región identificadora del complejo bifuncional se usa normalmente para otro sitio de cebado, permitiéndose así la amplificación por PCR de la región codificante del complejo bifuncional.

Debe entenderse que cuando se usa el término identificador en la presente descripción y las reivindicaciones, el identificador puede estar en la forma sentido o antisentido, es decir, el identificador puede comprender una secuencia de codones que en realidad codifica la molécula o puede ser una secuencia complementaria a la misma. Además, el identificador puede ser monocatenario o bicatenario, según convenga.

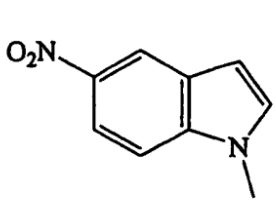
El diseño de la parte de la región identificadora complementaria o el oligonucleótido del bloque constructivo en general que comprende uno o más anti-codones que preceden al anti-codón activo puede ser aleatorio o semi-aleatorio y pueden permitirse uno o más desapareamientos con la región identificadora. Sin embargo, especialmente cuando se contempla una biblioteca, en una región que complementa un codón precedente puede ser ventajoso incorporar una o más nucleobases de apareamiento de bases no específico. Las nucleobases de apareamiento de bases no específico son bases que, cuando se unen a un esqueleto, pueden formar pares con al menos dos de las cinco nucleobases que se producen naturalmente (C, T, G, A y U). Preferentemente, el apareamiento de bases entre las dos o más nucleobases naturales y las nucleobases de apareamiento de bases no específico se produce esencialmente iso-enérgicamente, es decir, los enlaces formados tienen una fuerza del mismo orden. El término “nucleobase de apareamiento de bases no específico” se usa en este documento indistintamente con el término “base universal”.

La nucleobase inosina se encuentra en ARNt natural. La inosina tiene la capacidad de hibridarse no específicamente con tres de las nucleobases, es decir, citosina, timina y adenina. A continuación se representan la inosina y ejemplos de otros compuestos sintéticos que tienen la misma capacidad de apareamiento de bases no específico con nucleobases naturales.

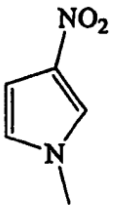
Ejemplos de bases universales:



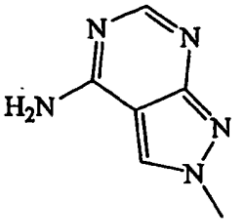
Inosina



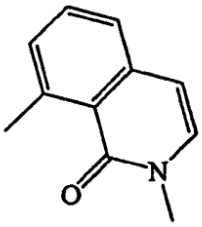
5-Nitroindol



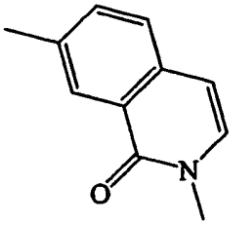
3-Nitropirrol



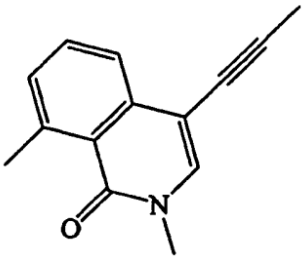
N^8-8-aza-7-deaza-adenina



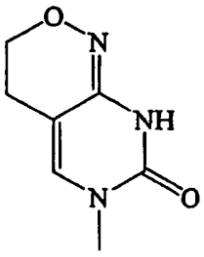
MICS



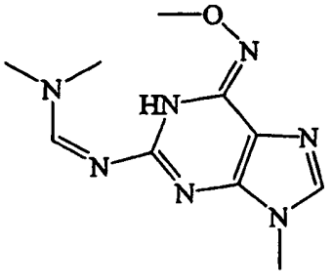
5MICS



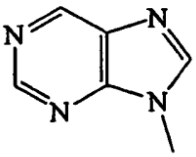
PIM



dP



dK



Nebularina

El uso de bases universales en el presente procedimiento tiene una ventaja en la generación de una biblioteca debido a que las nucleobases de codones previamente transferidos pueden aparearse con bases universales en la región complementaria del bloque constructivo. La complementación de un codón usado con una secuencia de bases universales permite el uso del mismo bloque constructivo para una variedad de complejos bifuncionales en crecimiento.

La codificación por el principio de extensión también puede usarse usando un procedimiento de tres cadenas. Cada etapa implica una biblioteca de moléculas de plataforma de ensamblaje hibridada con un vehículo de la entidad funcional (Figura 7). La plataforma de ensamblaje comprende una secuencia fija (región identificadora complementaria) que se une igualmente de bien a todas o a un subconjunto de moléculas identificadoras mediante la región identificadora. Alternativamente, esta secuencia identificadora complementaria también puede ser aleatoria o semi-aleatoria para aumentar la diversidad de la biblioteca ya que esto permitiría el uso de diferentes moléculas de

andamiaje. La plataforma de ensamblaje también contiene una región del anti-codón único con una secuencia específica. Esta secuencia específica se hibridará con la región del codón único en el vehículo, formando así un bloque constructivo en el que la entidad funcional transferible se acopla a un anti-codón único por hibridación. La secuencia del anti-codón único y la región del anti-codón único se ligan, permitiendo un acoplamiento directo entre estas dos secuencias. Este acoplamiento se obtiene, por ejemplo, cuando se sintetiza la plataforma de ensamblaje.

El anti-codón único puede ser tanto idéntico a la región del anti-codón único como a una secuencia más corta o más larga. Sin embargo, un requisito previo es que estas dos secuencias (el anti-codón único y la región del anti-codón único) se liguen entre sí, por ejemplo, mediante la región identificadora complementaria y, opcionalmente, la región de conexión. La secuencia del anti-codón único puede usarse para descodificar la región del anti-codón único. Esto obtendrá la región del codón único que codifica la entidad funcional. La región de conexión es opcionalmente una secuencia que puede variarse para obtener reactividad óptima entre la entidad funcional y la entidad de unión. Si se crean polímeros usando este sistema, la región de conexión podría extenderse mediante los ciclos de ensamblaje.

La formación de moléculas presentadas a identificador por el principio de ensamblaje de tres cadenas se realiza en etapas secuenciales. Cada etapa individual implica la hibridación del vehículo y las moléculas identificadoras con la plataforma de ensamblaje. Después de la etapa de hibridación tienen lugar dos acontecimientos importantes: 1) la reacción entre la entidad de unión y la entidad funcional para realizar la transferencia de la entidad funcional a la molécula identificadora, y 2) la extensión de la única secuencia del codón en la molécula identificadora usando la secuencia del anti-codón único en la plataforma de ensamblaje como secuencia de lectura.

La formación de una biblioteca de complejos bifuncionales según la invención puede realizarse usando un soporte sólido para la molécula de plataforma como se muestra en la Fig. 9 y 10. Esto permite una transferencia secuencial en la que cada biblioteca de moléculas de plataforma de ensamblaje, con diferente adición de la región no codificante y región de unión complementaria dependiente de qué etapa específica, se inmoviliza en viales separados y se suministra una biblioteca de identificador y moléculas del bloque constructivo. Después de las etapas de hibridación- reacción/transferencia-extensión, la biblioteca se extrae (por ejemplo con temperatura elevada) y se transfiere a otro vial con una biblioteca de plataforma de ensamblaje inmovilizada (con una región no codificante adicional y de unión complementaria) para permitir la siguiente etapa en el procedimiento.

Modo 2:

La presente invención desvela en un segundo modo de la invención un procedimiento para generar un complejo que comprende una parte de molécula de presentación y una parte codificante, en el que un complejo bifuncional naciente que comprende un sitio de reacción química y un sitio de cebado para la adición enzimática de una marca se hace reaccionar en el sitio de reacción química con uno o más reactivos y en el sitio de cebado se provee de marcas respectivas que identifican el uno o más reactivos usando una o más enzimas.
ÈLa falta de un enlace covalente entre la parte reactiva y la parte codificante del bloque constructivo implica que va a La falta de un enlace covalente entre la parte reactiva y la parte codificante del bloque constructivo implica que va a producirse una biblioteca por una estrategia de división y mezcla. En una primera etapa, un complejo bifuncional naciente se dispensa en uno o más compartimentos separados y posteriormente se expone a un reactivo en cada compartimento, que reacciona en el sitio de reacción química, y un agente que proporciona la marca que identifica dicho reactivo en el sitio de cebado. Por tanto, el agente que proporciona la marca incluye una enzima y un sustrato. En una cierta realización de la invención, la marca se proporciona extendiendo sobre un anti-codón usando una polimerasa. En otra realización de la invención, la marca se proporciona en el sitio de cebado por ligación de un oligonucleótido de codón que contiene información sobre la identidad del reactivo.

Si la enzima es una polimerasa, el sustrato es normalmente una mezcla de nucleótidos trifosfatos seleccionados del grupo que comprende dATP, dGTP, dTTP, dCTP, rATP, rGTP, rTTP, rCTP, rUTP. Los sustratos para ligasas son oligo y polinucleótidos, es decir, ácidos nucleicos que comprenden dos o más nucleótidos. Una ligación enzimática puede realizarse en un modo mono o bicatenario. Si se realiza una ligación monocatenaria, un grupo 3'-OH de un primer ácido nucleico se liga a un grupo 5'-fosfato de un segundo ácido nucleico. La ligación bicatenaria usa un tercer oligonucleótido que complementa una parte del extremo 3' y 5' del primer y segundo ácido nucleico para ayudar en la ligación. Generalmente se prefiere realizar ligación bicatenaria.

En algunas realizaciones de la invención se usa una combinación de transcripción con polimerasa y acoplamiento por ligación. Como ejemplo, un hueco en un ácido nucleico por lo demás bicatenario puede llenarse por una polimerasa y una ligasa puede ligar el producto de extensión con el oligonucleótido en la dirección 5' para producir un ácido nucleico completamente bicatenario.

El **Modo 2** se realiza en compartimentos separados para cada reacción, como se ha tratado anteriormente. Por tanto, la adición de una marca se produce sin competición de los ácidos nucleicos presentes y la probabilidad de codificación cruzada se reduce considerablemente. La adición enzimática de una marca puede producirse antes de, después de o simultáneamente con la reacción. En algunos aspectos de la invención se prefiere añadir la marca al complejo bifuncional naciente antes de la reacción, debido a que puede ser preferible aplicar condiciones para la reacción que sean diferentes de las condiciones usadas por la enzima. Generalmente, las reacciones enzimáticas se

realizan en medios acuosos, mientras que la reacción entre el reactivo y el sitio de reacción química para ciertas reacciones se favorece por un disolvente orgánico. Un enfoque apropiado para obtener la condición adecuada para ambas reacciones es realizar la reacción enzimática en un medio acuoso, liofilizar y posteriormente disolver o dispersar en un medio adecuado para que tenga lugar la reacción en el sitio reactivo químico. En un enfoque alternativo puede prescindirse de la etapa de liofilización ya que la condición de reacción apropiada puede obtenerse añadiendo un disolvente a los medios acuosos. El disolvente puede ser miscible con los medios acuosos para producir un medio de reacción homogéneo o inmiscible para producir un medio bifásico.

El reactivo según el segundo modo puede ser un reactivo libre o un bloque constructivo de cremallera. Un reactivo libre no está unido a un código que identifica otra parte del reactivo. En la mayoría de los casos, un reactivo libre comprende una estructura química que comprende uno, dos o más grupos reactivos que pueden reaccionar con el sitio de reacción química. Un bloque constructivo de cremallera es una entidad funcional que está unida a una entidad química que se une en la vecindad del sitio de reacción química. La entidad de unión química puede ser un oligonucleótido que se hibrida con un resto de enlace del complejo bifuncional naciente antes de la reacción. El acontecimiento de hibridación aumentará la proximidad entre la entidad funcional y el sitio de reacción química, reduciendo así la posibilidad de reacciones laterales y promoviendo la reacción debido a una alta concentración local.

El complejo bifuncional naciente se construye teniendo en cuenta el procedimiento codificante. Por tanto, si una polimerasa se usa para la codificación, normalmente se proporciona una región de hibridación en el resto de ligador. La región de hibridación permitirá que una región de unión de un oligonucleótido complementario que comprende un anti-codón se hibride con el complejo bifuncional naciente. La región de unión sirve de sitio de unión para una polimerasa, que luego puede producir un producto de extensión usando el oligonucleótido anti-codón como molde. Si se usa una ligasa para la codificación, el sitio de cebado del complejo bifuncional naciente comprende uno o más nucleótidos que la ligasa puede considerar como sustrato. En una ligación monocatenaria, un oligonucleótido presente en los medios y que posee información sobre la identidad del grupo reactivo se ligará con la molécula bifuncional naciente. La ligación bicatenaria requiere que el sitio de cebado del complejo bifuncional naciente pueda hibridarse con un oligonucleótido complementario antes de la ligación. Adecuadamente, el sitio de cebado comprende uno, dos o más nucleótidos con los que puede hibridarse un oligonucleótido complementario. El oligonucleótido complementario se hibrida en el otro extremo con el oligonucleótido de codón, que contiene la información de un reactivo particular.

El resto de ligador del complejo bifuncional naciente puede comprender información referente a la identidad del sitio de reacción química. En un enfoque aplicable, el resto de ligador comprende un codón informativo de la identidad del sitio de reacción química.

Los oligonucleótidos que poseen la información sobre el reactivo pertinente pueden comprender, aparte de la combinación de nucleótidos que identifica el reactivo, regiones flanqueantes. Las regiones flanqueantes pueden servir de regiones de unión que pueden hibridarse con el complejo bifuncional naciente. La región de unión puede diseñarse de manera que se hibride de forma promiscua con más de un único complejo bifuncional naciente. Alternativamente, la región de unión en el oligonucleótido codificante puede ligarse a una región de unión usando el complejo bifuncional naciente un oligonucleótido de puente como mediador.

La invención puede realizarse haciendo reaccionar un único reactivo con el complejo bifuncional naciente y añadiendo la marca correspondiente. Sin embargo, en general se prefiere construir una molécula de presentación que comprenda el producto de reacción de dos de más reactivos. Por tanto, en un cierto aspecto de la invención se idea un procedimiento para obtener un complejo bifuncional compuesto por una parte de molécula de presentación y una parte codificante, siendo dicha parte de molécula de presentación el producto de reacción de reactivos y el sitio de reacción química del complejo inicial. En un aspecto de la invención se realizan dos síntesis paralelas alternas de manera que la marca se ligue enzimáticamente al complejo bifuncional naciente en paralelo con una reacción entre un sitio de reacción química y un reactivo. En cada ronda, la adición de la marca va seguida o precedida de una reacción entre el reactivo y el sitio de reacción química. En cada ronda posterior de síntesis paralela, el producto de reacción de las reacciones previas sirve de sitio de reacción química y la última marca incorporada proporciona un sitio de cebado que permite la adición enzimática de una marca. En otros aspectos de la invención, dos o más marcas se proporcionan antes de o después de la reacción con los reactivos respectivos.

La parte codificante que comprende todas las marcas puede transformarse en la forma bicatenaria por un procedimiento de extensión en el que un cebador se hibrida con el extremo 3' del oligonucleótido y se extiende usando una polimerasa adecuada. La capacidad de tener cadenas dobles puede ser una ventaja durante los procedimientos de selección posteriores debido a que un ácido nucleico monocatenario puede realizar interacciones con una diana biológica en una forma similar a aptámeros.

En un cierto aspecto del modo 2 se idea un procedimiento para generar una biblioteca de complejos bifuncionales que comprende una parte de molécula de presentación y una parte codificante. El procedimiento comprende las etapas de proporcionar en compartimentos separados complejos bifuncionales nacientes, comprendiendo cada uno un sitio de reacción química y un sitio de cebado para la adición enzimática de una marca y realizar en cualquier

orden la reacción en cada compartimento entre el sitio de reacción química y uno o más reactivos, y la adición de una o más marcas respectivas que identifican el uno o más reactivos en el sitio de cebado usando una o más enzimas.

Los complejos bifuncionales nacientes en cada compartimento pueden ser idénticos o diferentes. En el caso de que el complejo bifuncional naciente se diferencie en el sitio de reacción química, el complejo bifuncional naciente adecuado comprende un codón que identifica la estructura del sitio de reacción química. Similarmente, los reactivos aplicados en cada compartimento pueden ser idénticos o diferentes según lo requiera el caso. Por tanto, las condiciones de reacción en cada compartimento pueden ser similares o diferentes.

Normalmente se desea hacer reaccionar el complejo con más de un único reactivo. En un cierto aspecto de la invención, el contenido de dos o más compartimentos se reúnen juntos y posteriormente se dividen en una matriz de compartimentos para una nueva ronda de reacción. Por tanto, en cualquier ronda posterior a la primera ronda, el producto final de una ronda precedente de reacción se usa como complejo bifuncional naciente para obtener una biblioteca de complejos bifuncionales, en la que cada miembro de la biblioteca comprende un producto de reacción específico de reactivo y marcas respectivas que codifican la identidad de cada uno de los reactivos que han participado en la formación del producto de reacción. Entre cada ronda de reacción, el contenido de los compartimentos se mezclan juntos en un aspecto de la invención y se dividen en compartimentos de nuevo. En otros aspectos de la invención, el contenido de un compartimento se divide después de haber recibido un codón, pero antes de que se haya producido una reacción, en más compartimentos en los que el otro codón es recibido y se produce una reacción con los dos reactivos que se han codificado. En otro aspecto de la invención, más de dos codones son codificados antes de que se permita que tenga lugar una reacción entre el sitio de reacción química y los reactivos. Provisionalmente se permite que se produzcan dos o más reacciones antes de que se inicie una codificación con las marcas respectivas.

Los codones individuales pueden distinguirse de otro codón en la biblioteca por sólo un único nucleótido. Sin embargo, para facilitar un posterior procedimiento de descodificación, en general se desea tener dos o más diferencias entre un codón particular y cualquier otro codón. Como un ejemplo, si se selecciona una longitud de codón/anti-codón de 5 nucleótidos, existen más de 100 combinaciones de nucleótidos en las que aparecen dos o más diferencias. Para un cierto número de nucleótidos en el codón, generalmente se desea optimizar el número de diferencias entre un codón/anti-codón particular con respecto a cualquier otro codón/anti-codón que aparece en la biblioteca. Un codón de oligonucleótido puede comprender cualquier número de nucleótidos adecuado, tal como de 2 a 100, 3 a 50, 4 a 20 ó 5 a 15 nucleótidos.

El reactivo puede ser un reactivo libre o un bloque constructivo de cremallera. El reactivo cumple la función de ser un precursor para la entidad estructural eventualmente incorporada en la parte de molécula presentada. La estructura de un reactivo puede cambiarse después de la reacción con un sitio de reacción química en una ronda posterior. En el caso de que el reactivo sea un bloque constructivo de cremallera, la escisión del enlace entre la entidad funcional y el oligonucleótido se realiza normalmente después de la reacción. Una excepción es en la ronda final, en la que puede prescindirse de la escisión. La escisión puede producirse posterior a o simultáneamente con la reacción con el sitio de reacción química. La escisión puede generar un grupo reactivo que en una etapa posterior puede participar en la formación de una conexión entre la molécula de presentación naciente y un reactivo.

El reactivo libre o la entidad funcional del bloque constructivo de cremallera comprenden preferentemente al menos un grupo reactivo que puede participar en una reacción que produce una conexión con el sitio de reacción química de la molécula bifuncional naciente. El número de grupos reactivos que aparecen en el reactivo libre y la entidad funcional es adecuadamente de uno a diez. Un reactivo libre o una entidad funcional que muestra sólo un grupo reactivo se usa, entre otras cosas, en las posiciones terminales de polímeros o andamiajes en las que las entidades funcionales que tienen dos grupos reactivos son adecuadas para la formación de la parte del cuerpo de un polímero o de andamiajes que pueden hacerse reaccionar adicionalmente. En los andamiajes están normalmente presentes dos o más grupos reactivos previstos para la formación de conexiones. Un andamiaje es una estructura de núcleo que forma la base para la creación de múltiples variantes. Las formas variantes del andamiaje se forman normalmente mediante reacción de grupos reactivos del andamiaje con grupos reactivos de otros reactivos, opcionalmente mediado por grupos de relleno o catalizadores. Las entidades funcionales o los reactivos libres que van a conectarse con el andamiaje pueden contener uno, dos o varios grupos reactivos que pueden formar conexiones. Ejemplos de andamiajes incluyen esteroides, hidantoínas, benzodiazepinas, etc.

El grupo reactivo del reactivo libre o la entidad funcional unida a un ácido nucleico que comprende una región de cremallera, es decir, una región que se une promiscuamente con un resto de enlace del complejo bifuncional naciente, puede formar una conexión directa con grupos reactivos del sitio reactivo químico o el reactivo puede formar una conexión con un grupo reactivo del sitio reactivo químico mediante un grupo de relleno de puente. Debe entenderse que no todos los átomos de los grupos reactivos se mantienen necesariamente en la conexión formada. Más bien, los grupos reactivos deben considerarse como precursores para la estructura de la conexión.

Si se usa un bloque constructivo de cremallera, la escisión puede realizarse después de o simultáneamente con la formación de la conexión entre el sitio de reacción química y la entidad funcional. La escisión puede realizarse en

cualquier forma apropiada. En un aspecto de la invención, la escisión implica el uso de un reactivo o enzima. La escisión produce una transferencia de la entidad funcional al complejo bifuncional naciente o una transferencia del complejo a la entidad funcional del bloque constructivo de cremallera. En algunos casos puede ser ventajoso introducir nuevos grupos químicos como consecuencia de la escisión. Los nuevos grupos químicos pueden usarse para la posterior reacción en un ciclo posterior, tanto directamente como después de haberse activado. En otros casos es deseable que no quede ninguna traza del ligador después de la escisión. En algunos aspectos de la invención puede no desearse escindir uno o más enlaces químicos. Como un ejemplo puede desearse mantener la conexión entre el dominio de cremallera y la entidad funcional en la última ronda.

En algunos aspectos de la invención, la conexión y la escisión se realizan como una reacción simultánea, es decir, tanto la entidad funcional del bloque constructivo de cremallera como el sitio reactivo químico del complejo bifuncional naciente es un grupo saliente de la reacción. En algunos aspectos de la invención se prefiere diseñar el sistema de forma que la escisión se produzca simultáneamente debido a que esto reducirá el número de etapas y la complejidad. La conexión simultánea y la escisión también pueden diseñarse de forma que tanto no quede traza del ligador como de forma que se introduzca un nuevo grupo químico para la posterior reacción, como se ha descrito anteriormente. En otros aspectos de la invención se prefiere realizar etapas de reticulación y de escisión separadas debido a que el enfoque escalonado permite dominar cada subetapa y una reducción en la probabilidad de transferencia no específica.

La unión de la entidad funcional al oligonucleótido que comprende un dominio de cremallera se realiza normalmente mediante un ligador. Preferentemente, el ligador conecta la entidad funcional con el oligonucleótido en un nucleótido terminal o un nucleótido 1 o dos nucleótidos más abajo del oligonucleótido. La unión de la entidad funcional puede ser en cualquier entidad disponible para la unión, es decir, la entidad funcional puede unirse a un nucleótido del oligonucleótido en la nucleobase, o el esqueleto. En general, se prefiere unir la entidad funcional en el fósforo del enlace internucleosídico o en la nucleobase.

En un cierto aspecto de la invención, el grupo reactivo de la entidad funcional está unido al oligonucleótido, opcionalmente mediante un espaciador adecuado. El grupo reactivo es preferentemente de un tipo tal que pueda crear una conexión con la molécula de presentación naciente por tanto reacción directa entre los grupos reactivos respectivos como usando un grupo de relleno adecuado. El grupo reactivo que acopla la entidad funcional con el oligonucleótido se escinde preferentemente simultáneamente con el establecimiento de la conexión. La entidad funcional puede contener en algunos casos un segundo grupo reactivo que puede participar en la formación de una conexión en un ciclo posterior. El segundo grupo reactivo puede ser de un tipo tal que necesite la activación antes de poder participar en la formación de una conexión.

Preferentemente, al menos un ligador sigue intacto después de la etapa de escisión. El al menos un ligador ligará la molécula de presentación a la parte codificante, es decir, la parte que comprende la una o más marcas que identifican los diversos reactivos que han participado en la formación de la molécula de presentación. Puede desearse conectar la parte de molécula de presentación a la parte codificante del complejo bifuncional mediante un espacio que comprende un ligador selectivamente escindible. El ligador selectivamente escindible se diseña de forma que no se escinda en condiciones que produzcan una transferencia de una entidad de función al sitio de reacción química.

Los ligadores escindibles pueden seleccionarse de una gran plétora de estructura químicas. Ejemplos de ligadores incluyen, pero no se limitan a, ligadores que tienen un sitio de escisión enzimática, ligadores que comprenden un componente degradable químico y ligadores escindibles por radiación electromagnética. Los ligadores escindibles de particular interés son actualmente ligadores que pueden escindirse por luz. Un ejemplo adecuado incluye un grupo o-nitrobencilo posicionado entre la molécula de presentación y la parte codificante del complejo bifuncional.

En el caso de que se hagan reaccionar dos o más reactivos con el sitio reactivo químico, los codones de la parte codificante pueden separarse por una región constante o una región de unión. Una función de la región de unión puede ser establecer una plataforma en la que una enzima, tal como polimerasa o ligasa, pueda reconocerse como un sustrato. Dependiendo de la molécula codificada formada, el identificador puede comprender adicionalmente codones tales como 3, 4, 5 o más codones. Cada uno de los codones adicionales puede separarse por una región de unión adecuada. Preferentemente, todos o al menos la mayoría de los codones del identificador se separan de un codón vecino por una secuencia de unión. La región de unión puede tener cualquier número de nucleótidos adecuado, por ejemplo, 1 a 20.

La región de unión, si está presente, puede servir para diversos fines, además de servir de sustrato para una enzima. En un sistema de la invención, la región de unión identifica la posición del codón. Normalmente, la región de unión tanto en la dirección 5' o en la dirección 3' de un codón comprende información que permite la determinación de la posición del codón. En otro sistema, las regiones de unión tienen secuencias alternas que permiten la adición de bloques constructivos de dos conjuntos en la formación de la biblioteca. Además, la región de unión puede ajustar la temperatura de hibridación a un nivel deseado.

Puede proporcionarse una región de unión con alta afinidad por la incorporación de una o más nucleobases que

forman tres enlaces de hidrógeno con una nucleobase relacionada. Ejemplos de nucleobases que tienen esta propiedad son guanina y citosina. Alternativamente, o además, la región de unión puede someterse a modificación del esqueleto. Varias modificaciones del esqueleto proporcionan mayor afinidad, tales como la sustitución de 2'-O-metilo del resto de ribosa, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) y la ciclación de 2'-4' O-metileno del resto de ribosa, también denominado en lo sucesivo LNA (ácido nucleico bloqueado).

El identificador puede comprender regiones flanqueantes alrededor de los codones. La región flanqueante puede englobar un grupo de señal, tal como un fluoróforo o un grupo radiactivo que permita la detección de la presencia o ausencia de un complejo, o la región flanqueante puede comprender una marca que puede detectarse, tal como biotina. Si el identificador comprende un resto de biotina, el identificador puede recuperarse fácilmente.

Las regiones flanqueantes también pueden servir de sitios de cebado para reacciones de amplificación tales como PCR. Normalmente, el último ciclo en la formación del complejo bifuncional incluye la incorporación de un sitio de cebado. Una región del complejo bifuncional próxima a la molécula de presentación, tal como una secuencia de ácidos nucleicos entre la molécula de presentación y el codón que codifica la molécula de andamiaje, se usa normalmente para otro sitio de cebado, permitiéndose así la amplificación por PCR de la región codificante del complejo bifuncional.

Combinación del Modo 1 y el Modo 2:

En un cierto aspecto de la invención, el Modo 1 y el Modo 2 descritos anteriormente se combinan, es decir, se usan diferentes reactivos en diferentes rondas. Dentro del Modo 1 y el Modo 2 también pueden usarse diferentes bloques constructivos en diferentes rondas.

En la formación de una biblioteca puede ser ventajoso usar una combinación de una estrategia de síntesis una sola etapa (Modo 1) y una de estrategia de división y mezcla (Modo 2), debido a que cada uno del modo 1 y el modo 2 tienen sus virtudes. La estrategia de una sola etapa ofrece la posibilidad de tener los grupos reactivos en estrecha proximidad antes de la reacción, obteniéndose así una alta concentración local y la comodidad de tener un único recipiente. La estrategia de división y mezcla ofrece la posibilidad de tener un reactivo libre y condiciones de reacción de no hibridación, proporcionando reacciones versátiles. Puede ser apropiado referirse a la Fig. 15 en la que se muestran diversos procedimientos enzimáticos codificantes individuales. Generalmente se usa una estrategia de síntesis por división y mezcla para reactivos que no tienen un enlace covalente entre el reactivo/entidad funcional y el codón/anti-codón, es decir, reactivos libres y bloques constructivos de cremallera. Generalmente se usa una estrategia de síntesis de una sola etapa para reactivos en los que existe un enlace covalente entre la entidad funcional y el codón/anti-codón que identifica dicha entidad funcional, es decir, los bloques constructivos E2, bloques constructivos de bucle y los bloques constructivos N.

En una cierta realización de la invención se genera una biblioteca intermedia de complejos bifuncionales usando una estrategia de síntesis de una sola etapa. Esta biblioteca intermedia se usa posteriormente para la generación de una biblioteca final por una síntesis por división y mezcla. La biblioteca intermedia puede generarse usando una única ronda o múltiples rondas de síntesis de una sola etapa y la biblioteca final puede producirse aplicando una única o múltiples rondas de división y mezcla. El uso de una síntesis por división y mezcla en la última ronda de la generación de bibliotecas ofrece la posibilidad de usar un medio de reacción no compatible con el mantenimiento de una hibridación, por ejemplo, alta fuerza iónica o disolventes orgánicos, para el reactivo final.

En otra realización se produce una biblioteca intermedia usando una estrategia de síntesis por división y mezcla. La biblioteca intermedia se usa para la generación de una biblioteca final usando una estrategia de síntesis de una sola etapa. La biblioteca intermedia puede producirse usando una única o múltiples rondas de síntesis por división y mezcla y la biblioteca final puede fabricarse aplicando una o más rondas de síntesis de una sola etapa. La síntesis de una sola etapa en la ronda final proporciona una estrecha proximidad entre la molécula codificada en crecimiento y la entidad funcional. La estrecha proximidad produce una alta local concentración que promueve la reacción incluso para reactivos que tienen una tendencia relativamente baja a reaccionar.

Codificación múltiple

La codificación múltiple implica que dos o más codones se proporcionen en el identificador antes de o posterior a una reacción entre el sitio reactivo químico y dos o más reactivos. La codificación múltiple tiene diversas ventajas, tales como permitir una variedad más amplia de reacciones posibles, ya que muchos compuestos sólo pueden sintetizarse por una reacción de tres (o más) componentes debido a que no es estable un producto intermedio entre el primer reactivo y el sitio reactivo químico. Otras ventajas se refieren al uso de disolventes orgánicos y la disponibilidad de dos o más reactivos libres en ciertas realizaciones.

Por tanto, en un cierto aspecto la invención se refiere a un procedimiento para obtener un complejo bifuncional que comprende una parte de molécula de presentación y una parte codificante, en el que la molécula de presentación se obtiene haciendo reaccionar un sitio reactivo químico con dos o más reactivos, y la parte codificante comprende marca(s) que identifican los reactivos.

En un cierto aspecto de la invención, un primer reactivo forma un producto intermedio tras la reacción con el sitio reactivo químico y un segundo reactivo reacciona con el producto intermedio para obtener la molécula de presentación o un precursor de la misma. En otro aspecto de la invención, dos o más reactivos reaccionan entre sí para formar un producto intermedio y el sitio reactivo químico reacciona con este producto intermedio para obtener la molécula de presentación o un precursor de la misma. El producto intermedio puede obtenerse haciendo reaccionar los dos o más reactivos por separado y luego en una etapa posterior hacer reaccionar el producto intermedio con el sitio reactivo químico. El hacer reaccionar los reactivos en una etapa separada proporciona la posibilidad de usar condiciones que no resistirían las marcas. Por tanto, en el caso de que la parte codificante comprenda ácidos nucleicos, la reacción entre el reactivo puede realizarse a condiciones que de otro modo degradarían el ácido nucleico.

Las reacciones pueden llevarse a cabo según el esquema mostrado a continuación. El esquema muestra un ejemplo en el que las marcas de identificación para dos reactivos y el sitio reactivo químico (andamiaje) unido al sitio de reacción química se proporcionan en compartimentos separados. Los compartimentos están dispuestos en una matriz, tal como una placa de microtitulación, que permite cualquier combinación de los diferentes agentes acilantes y los diferentes agentes alquilantes.

Situación de partida:

Agentes alquilantes / Agentes acilantes	A	B	C	…
1	Tagx11-X	Tagx12-X	Tagx13-X	…
2	Tagx21-X	Tagx22-X	Tagx23-X	…
3	Tagx31-X	Tagx32-X	Tagx33-X	…
…	…	…	…	…

X denota un sitio de reacción química tal como un andamiaje.

Los dos reactivos se hacen reaccionar entre sí o bien por separado en cualquier combinación o bien se añaden posteriormente a cada compartimento según las marcas de la parte codificante o bien los reactivos pueden añadirse en cualquier orden a cada compartimento para permitir una reacción directa. El esquema de a continuación muestra el resultado de la reacción.

Ilustración de productos

Agentes alquilantes / Agentes acilantes	A	B	C	…
1	Tagx11-XA1	Tagx12-XB1	Tagx13-XC1	…
2	Tagx21-X A2	Tagx22-XB2	Tagx23-XC2	…
3	Tagx31-XA3	Tagx32-XB3	Tagx33-XC3	…
…	…	…	…	…

Como un ejemplo, XA2 denota la molécula de presentación XA2 en su estado final, es decir, completamente ensamblada a partir de los fragmentos X, A y 2.

La parte codificante que comprende las dos o más marcas que identifican los reactivos pueden prepararse de cualquier forma adecuada tanto antes de como después de la reacción. En un aspecto de la invención, cada una de las partes codificantes se sintetizan por química del fosforamidito habitual. En otro aspecto, las marcas se preparan y se ensamblan en la parte codificante final por ligación química o enzimática.

Existen diversas posibilidades para la ligación química. Ejemplos adecuados incluyen que

a) un primer extremo del oligonucleótido comprenda un grupo 3'-OH y el segundo extremo del oligonucleótido comprenda un grupo 5'-fosforo-2-imidazol. Cuando reaccionan se forma un enlace internucleosídico fosfodiéster,
b) un primer extremo del oligonucleótido comprenda un grupo fosfoimidazolida y el extremo 3' y un grupo fosfoimidazolida en el extremo 5'. Cuando reaccionan juntos se forma un enlace internucleosídico fosfodiéster,
c) un primer extremo del oligonucleótido comprenda un grupo 3'-fosforotioato y un segundo oligonucleótido comprenda 5'-yodo. Cuando los dos grupos se hacen reaccionar se forma un enlace internucleosídico 3'-OP(=O)(OH)-S-5', y
d) un primer extremo del oligonucleótido comprenda un grupo 3'-fosforotioato y un segundo oligonucleótido comprenda 5'-tosilato. Cuando reaccionan se forma un enlace internucleosídico 3'-O-P(=O)(OH)-S-5'.

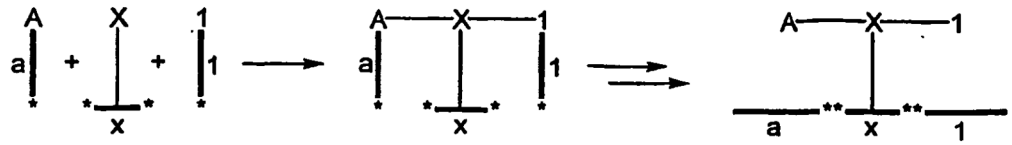
Adecuadamente, las marcas se unen operativamente juntas, de manera que se permita que una enzima activa de ácido nucleico reconozca el área de ligación como sustrato. Notablemente, en una realización preferida, la ligación se realiza de manera que se permita que una polimerasa reconozca la cadena ligada como molde. Por tanto, en un aspecto preferido, una estrategia de reacción química para la etapa de acoplamiento incluye generalmente la formación de un enlace internucleosídico fosfodiéster. Según este aspecto se prefieren el procedimiento a) y b) anterior.

En otro aspecto, si se usan ligasas para la ligación, ejemplos adecuados incluyen ADN ligasa Taq, ADN ligasa T4, ADN ligasa T7 y ADN ligasa de *E. coli*. La elección de la ligasa depende hasta cierto grado del diseño de los extremos que van a unirse juntos. Por tanto, si los extremos son romos, puede preferirse la ADN ligasa T4, mientras que puede preferirse una ADN ligasa Taq para un extremo de ligación cohesivo, es decir, una ligación en la que un nucleótido protuberante en cada extremo es un complemento para cada uno.

En un cierto aspecto de la invención se prefiere la codificación enzimática debido a la especificidad que proporcionan las enzimas. La Fig. 17 desvela una variedad de procedimientos para codificar enzimáticamente dos o más reactivos en la parte codificante de la molécula bifuncional. La elección del procedimiento de codificación depende de una variedad de factores, tales como la necesidad de reactivos libres, la necesidad de proximidad y la necesidad de conveniencia. Los procedimientos de codificación doble enzimáticos mostrados en la Fig. 17 pueden expandirse fácilmente a codificación triple, cuádruple, etc.

Según una cierta realización, las entidades funcionales están unidas para identificar marcas, y cada entidad funcional lleva uno o más grupos reactivos. Todas las entidades funcionales reaccionan entre sí para generar el producto final que contiene tantas marcas como entidades funcionales. Las marcas pueden combinarse en una única parte codificante, normalmente un oligonucleótido mediante una reacción intermolecular o asociación seguida de la escisión de dos de los ligadores, como se muestra a continuación:

A.

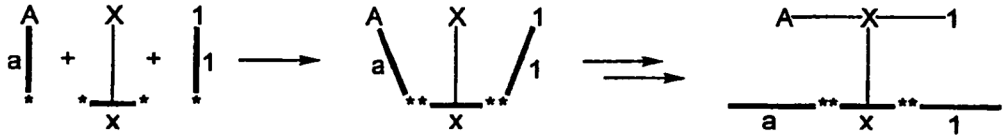


Las líneas en negrita representan marcas. Las líneas delgadas representan ligadores o enlaces. "*" denota un sitio de cebado. En algunos aspectos de la invención, X se considera el sitio reactivo químico.

En un aspecto de la realización anterior, las marcas son de oligonucleótidos que se combinan mediante ligación química o ligación catalizada por enzimas.

Alternativamente, las marcas se acoplan antes de la reacción de las entidades funcionales. En ese procedimiento, las entidades funcionales se escindirán de sus marcas o se escindirán después. Por ejemplo

B.



Una realización de la representación esquemática anterior comprende, cuando las marcas son nucleótidos, la combinación de marcas mediante ligación química o ligación catalizada por enzimas.

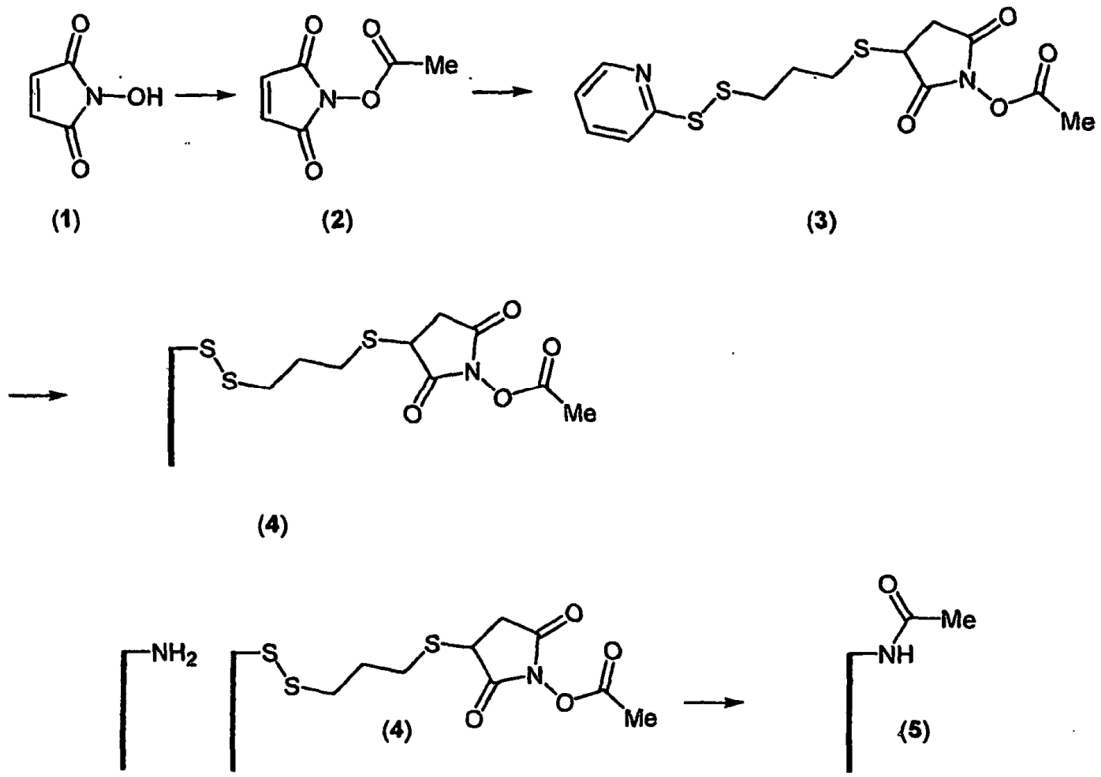
El Ejemplo 9 ilustra una reacción multicomponente en la que se usa codificación triple. Por tanto, después de la reacción de los tres reactivos libres con un sitio reactivo químico, la parte codificante está provista de tres marcas de identificación por ligación enzimática.

Bloques constructivos que pueden transferir entidades funcionales.

Las siguientes secciones describen la formación y el uso de bloques constructivos a modo de ejemplo que pueden transferir una entidad funcional a un grupo reactivo de un complejo bifuncional. Una línea en negrita indica un oligonucleótido.

A. Reacciones de acilación

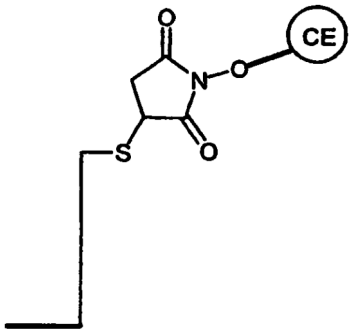
Ruta general para la formación de bloques constructivos acilantes y el uso de éstos:



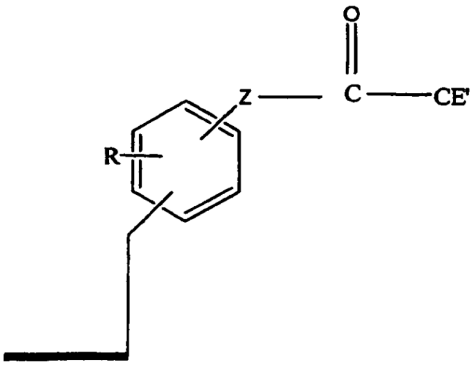
La N-hidroximaleimida (**1**) puede acilarse usando un cloruro de acilo, por ejemplo, cloruro de acetilo o alternativamente acilarse en, por ejemplo, THF usando diciclohexilcarbodiimida o diisopropilcarbodiimida y ácido, por ejemplo, ácido acético. El producto intermedio puede someterse a adición de Michael usando 1,3-propanoditiol en exceso, seguido de reacción con tanto disulfuro de 4,4'-dipiridilo como disulfuro de 2,2'-dipiridilo. Este producto intermedio (**3**) puede entonces cargarse sobre un oligonucleótido que lleva un asa de tiol para generar el bloque constructivo (**4**). Obviamente, el producto intermedio (**2**) puede unirse al oligonucleótido usando otro enlace distinto del enlace disulfuro, tal como un enlace amida, y la N-hidroximaleimida puede separarse del oligonucleótido usando una variedad de espaciadores.

El bloque constructivo (**4**) puede hacerse reaccionar con un oligonucleótido identificador que comprende un grupo amina receptor, por ejemplo, siguiendo el procedimiento: El bloque constructivo (**4**) (1 nmol) se mezcla con un amino-oligonucleótido (1 nmol) en tampón HEPES (20 µl de HEPES 100 mM y una disolución de NaCl 1 M, pH=7,5) y agua (39 ul). Los oligonucleótidos se hibridan juntos mediante calentamiento a 50ºC y enfriamiento (2ºC/ segundo) a 30ºC. Entonces, la mezcla se deja durante la noche a una temperatura fluctuante (10ºC durante 1 segundo, luego 35ºC durante 1 segundo), dando el producto (**5**).

En términos más generales, los bloques constructivos indicados más adelante pueden transferir una entidad química (CE) a un grupo nucleófilo receptor, normalmente un grupo amina. La línea horizontal inferior en negrita ilustra el bloque constructivo y la línea vertical ilustra un espaciador. El anillo de N-hidroxisuccinimida (NHS) sustituido de 5 miembros sirve de activador, es decir, se forma un enlace lábil entre el átomo de oxígeno conectado al anillo de NHS y la entidad química. El enlace lábil puede escindirse por un grupo nucleófilo, por ejemplo, posicionado en un andamiaje



Otro bloque constructivo que puede formar un enlace amida es



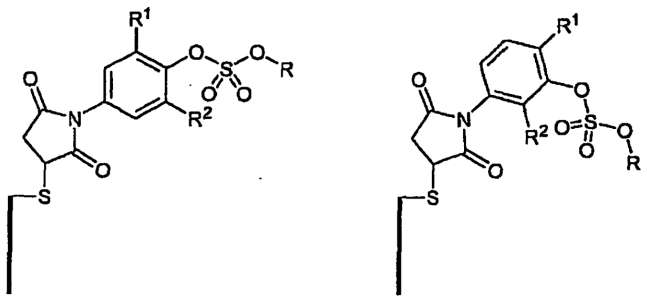
R puede estar ausente o ser NO_2, CF_3, halógeno, preferentemente Cl, Br, o I, y Z puede ser S u O. Este tipo de bloque constructivo se desvela en la solicitud de patente danesa nº PA 2002 0951 y la solicitud de patente provisional de EE.UU. presentada el 20 de diciembre de 2002 con el título “Un bloque constructivo que puede transferir una entidad funcional a un grupo reactivo receptor”.

Un grupo nucleófilo puede escindir el enlace entre Z y el grupo carbonilo transfiriendo así la entidad química -(C=O)-CE' a dicho grupo nucleófilo.

B. Alquilación

Ruta general para la formación de bloques constructivos alquilantes/vinilantes y uso de éstos:

Los bloques constructivos alquilantes pueden tener la siguiente estructura general:

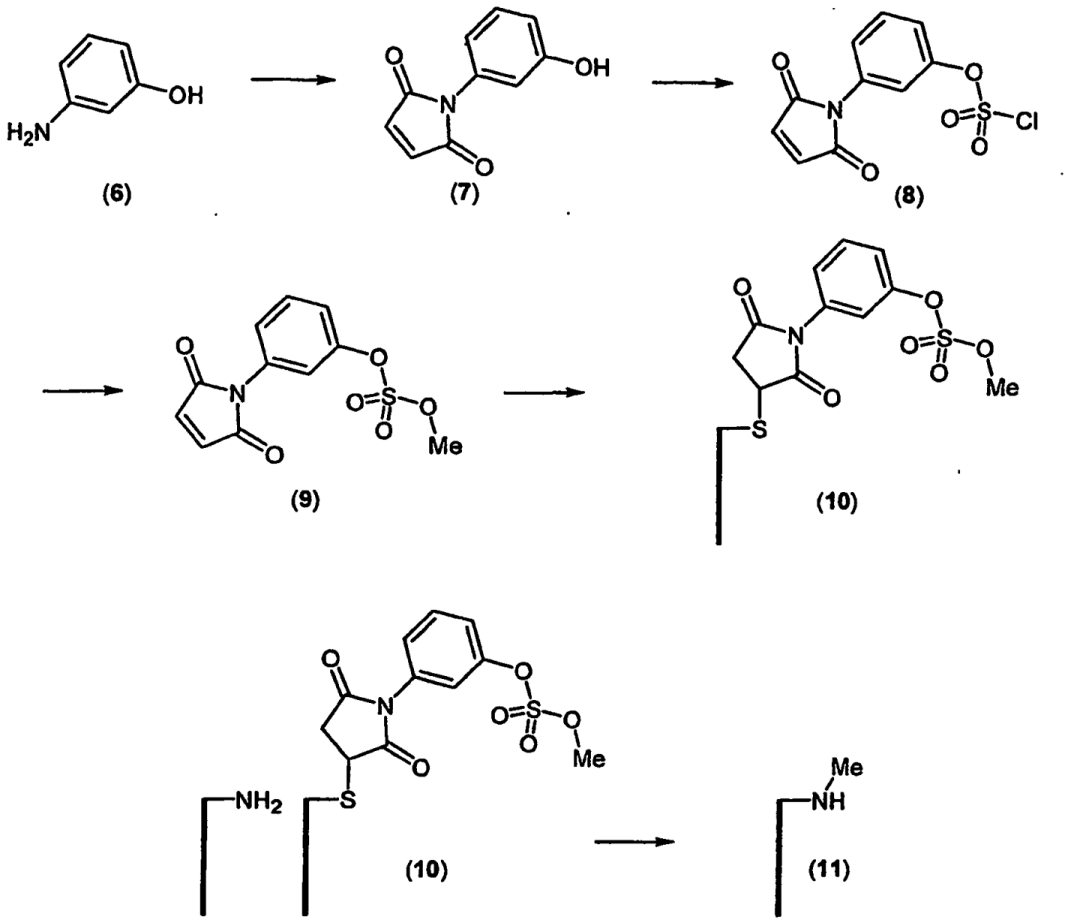


R^1 = H, Me, Et, iPr, Cl, NO_2
R^2 = H, Me, Et, iPr, Cl, NO_2

R^1 y R^2 pueden usarse para sintonizar la reactividad del sulfato para permitir reactividad apropiada. La sustitución de cloro y nitro aumentará la reactividad. Los grupos alquilo disminuirán la reactividad. Los sustituyentes orto al sulfato

dirigirán, debido a motivos estéricos, a nucleófilos entrantes al ataque del grupo R selectivamente y evitarán el ataque en el azufre.

Un ejemplo de la formación de un bloque constructivo alquilante y la transferencia de una entidad funcional se representa a continuación:

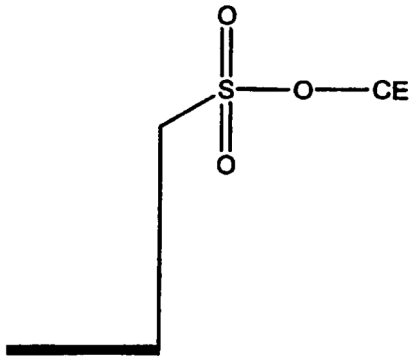


Se trata 3-aminofenol (**6**) con anhídrido maleico, seguido de tratamiento con un ácido, por ejemplo, H_2SO_4 o P_2O_5, y se calienta dando la maleimida (**7**). El cierre de anillo para la maleimida también puede lograrse cuando un grupo de *O*-protección estable ácido se usa mediante tratamiento con AC_2O, con o sin calentamiento, seguido de *O*-desprotección. Alternativamente, reflujo en AC_2O, seguido de *O*-desacetilación en agua caliente/dioxano dando (**7**). Adicionalmente, el tratamiento de (**7**) con SO_2Cl_2, con o sin trietilamina o carbonato de potasio en diclorometano o un disolvente de mayor punto de ebullición, dará el producto intermedio (**8**), que puede aislarse o directamente transformarse adicionalmente en el sulfato de arilalquilo por la extinción con el alcohol apropiado, en este caso MeOH, por lo que se formará (**9**).

El resto orgánico (**9**) puede conectarse a un oligonucleótido del siguiente modo: un oligonucleótido que lleva tiol en tampón MOPS 50 mM o HEPES o fosfato a pH 7,5 se trata con una disolución 1-100 mM y preferentemente disolución 7,5 mM del bloque constructivo orgánico (**9**) en DMSO o alternativamente DMF, de forma que la concentración de DMSO/DMF sea el 5-50%, y preferentemente el 10%. La mezcla se deja durante 1-16 h y preferentemente 2-4 h a 25ºC para dar el agente alquilante, en este caso un bloque constructivo metilante (**10**).

La reacción del bloque constructivo alquilante (**10**) con una amina que posee complejo bifuncional naciente puede realizarse del siguiente modo: el complejo bifuncional (1 nmol) se mezcla con el bloque constructivo (**10**) (1 nmol) en tampón HEPES (20 µl de HEPES 100 mM y una disolución de NaCl 1 M, pH=7,5) y agua (39 ul). Los oligonucleótidos se hibridan entre sí mediante calentamiento a 50ºC y se enfrían (2ºC/ segundo) a 30ºC. La mezcla se deja entonces durante la noche a una temperatura fluctuante (10ºC durante 1 segundo, luego 35ºC durante 1 segundo), dando el producto de reacción de metilamina (**11**).

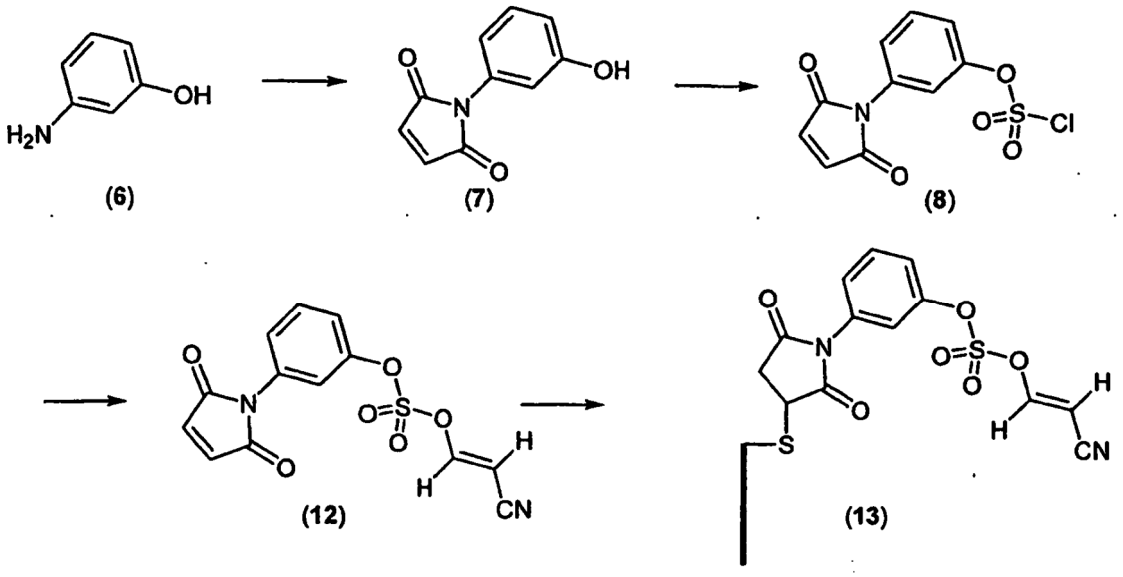
En términos más generales, un bloque constructivo que puede transferir una entidad química a un grupo reactivo receptor que forma un enlace sencillo es



El grupo receptor puede ser un nucleófilo, tal como un grupo que comprende un heteroátomo, formándose así un enlace sencillo entre la entidad química y el heteroátomo, o el grupo receptor puede ser un átomo de carbono electronegativo, formándose así un enlace C-C entre la entidad química y el andamiaje.

C. Reacciones de vinilación

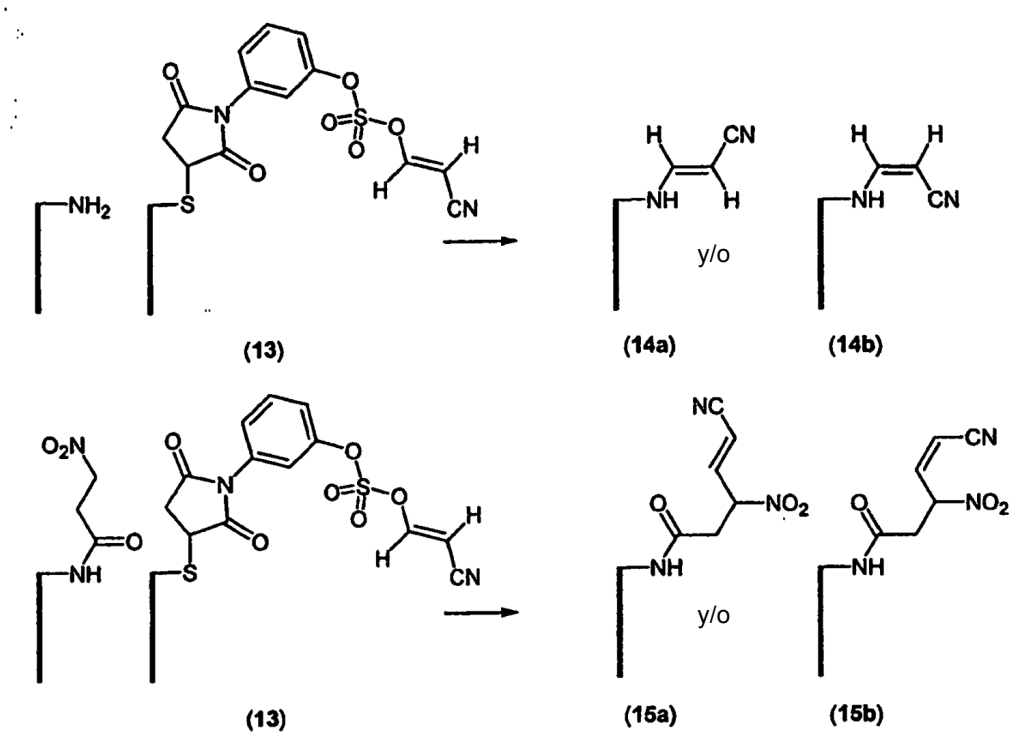
Un bloque constructivo vinilante puede prepararse y usarse similarmente a como se ha descrito anteriormente para un bloque constructivo alquilante. Aunque, en lugar de hacer reaccionar el clorosulfonato (**8**, antes) con un alcohol, el clorosulfato intermedio se aísla y se trata con un enolato u enolato de *O*-trialquilsililo con o sin la presencia de fluoruro, por ejemplo,



Formación de un bloque constructivo vinilante (**13**) a modo de ejemplo:

El oligonucleótido que lleva el tiol en tampón MOPS 50 mM o HEPES o fosfato a pH 7,5 se trata con una disolución 1-100 mM y preferentemente disolución 7,5 mM del resto orgánico (**12**) en DMSO o alternativamente DMF, de forma que la concentración de DMSO/DMF sea del 5-50%, y preferentemente del 10%. La mezcla se deja durante 1-16 h y preferentemente 2-4 h a 25ºC dando el bloque constructivo vinilante (**13**).

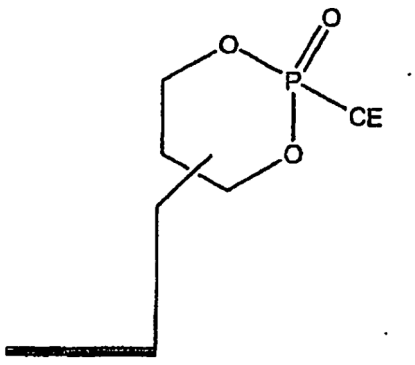
El enolato de sulfonilo (**13**) puede usarse para reaccionar con el andamiaje que lleva amina dando una enamina (**14a** y/o **14b**) o, por ejemplo, reaccionar con un carbanión dando (**15a** y/o **15b**), por ejemplo,



La reacción del bloque constructivo vinilante (**13**) y un identificador que lleva amina o nitroalquilo puede realizarse del siguiente modo:

El identificador de amino-oligonucleótido (1 nmol) o nitroalquil-oligonucleótido (1 nmol) se mezcla con el bloque constructivo (1 nmol) (**13**) en tampón TAPS 0,1 M, fosfato o HEPES y disolución de NaCl 300 mM, pH=7,5-8,5 y preferentemente pH=8,5. Los oligonucleótidos se hibridan con el molde mediante calentamiento a 50ºC y se enfrían (2ºC/ segundo) a 30ºC. Entonces, la mezcla se deja durante la noche a una temperatura fluctuante (10ºC durante 1 segundo, luego 35ºC durante 1 segundo) dando el producto de reacción (**14a/b** o **15a/b**). Alternativamente a los sulfatos de alquilo y vinilo descritos anteriormente, igualmente pueden ser eficaces los sulfonatos como, por ejemplo, (**31**) (sin embargo con R" en lugar de alquilo o vinilo), descritos más adelante, preparados a partir de (**28**, con el grupo fenilo sustituido con un grupo alquilo) y (**29**), y usarse como agentes alquilantes y vinilantes.

Otro bloque constructivo que puede formar un doble enlace por la transferencia de una entidad química a un grupo aldehído receptor se muestra a continuación. Un doble enlace entre el carbono del aldehído y la entidad química se forma mediante la reacción.



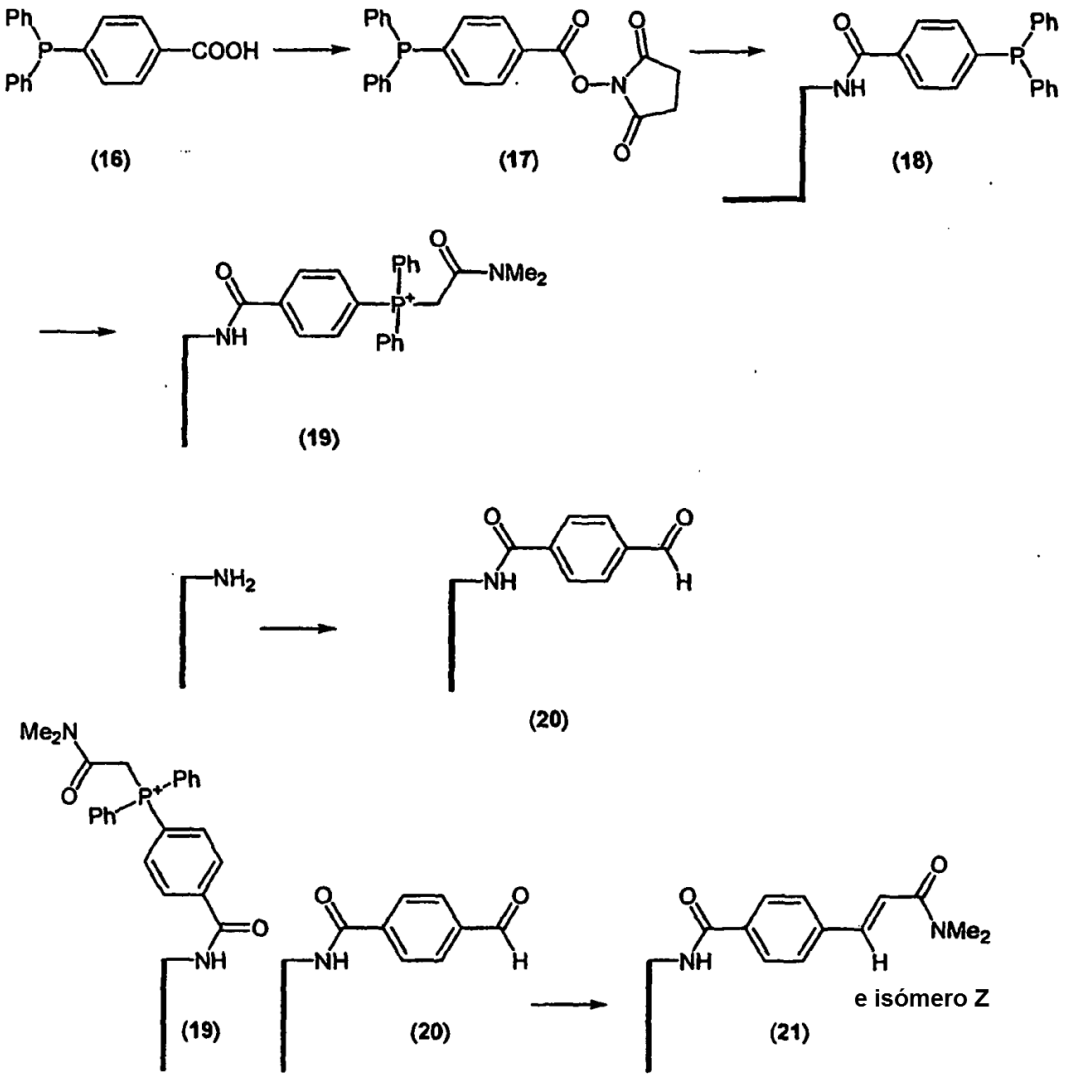
El bloque constructivo anterior está comprendido por la solicitud de patente danesa nº DK PA 2002 01952 y la solicitud de patente provisional de EE.UU. presentada el 20 de diciembre de 2002 con el título “Un bloque constructivo que puede transferir una entidad funcional a un grupo reactivo receptor que forma un doble enlace C=C”.

D. Reacciones de alquenilidación

Ruta general para la formación de bloques constructivos de Wittig y HWE y uso de éstos:

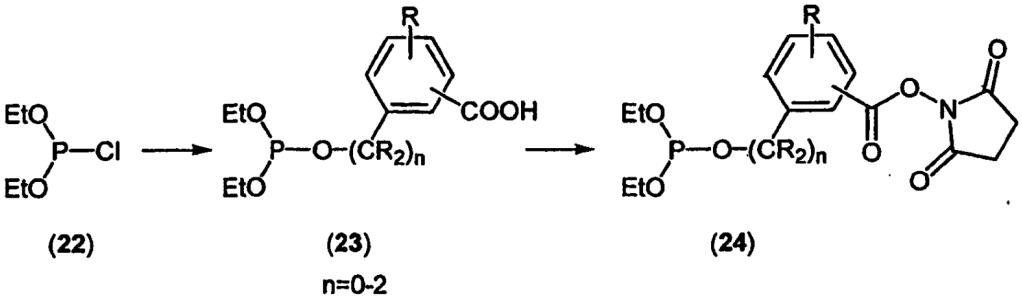
El compuesto (**16**) comercialmente disponible puede transformarse en el éster de NHS (**17**) por medios convencionales, es decir, acoplamientos por DCC o DIC. Un oligonucleótido que lleva amina en tampón MOPS 50 mM o HEPES o fosfato a pH 7,5 se trata con una disolución 1-100 mM, y preferentemente disolución 7,5 mM, del compuesto orgánico en DMSO o alternativamente DMF, de forma que la concentración de DMSO/DMF sea del 5-50%, y preferentemente del 10%. La mezcla se deja durante 1-16 h y preferentemente 2-4 h a 25ºC dando el bloque constructivo precursor unido a fosfina (**18**). Este bloque constructivo precursor se transforma adicionalmente mediante la adición del haluro de alquilo apropiado, por ejemplo, *N,N*-dimetil-2-yodoacetamida como disolución 1-100 mM y preferentemente 7,5 mM en DMSO o DMF de forma que la concentración de DMSO/DMF sea del 5-50%, y preferentemente del 10%. La mezcla se deja durante 1-16 h y preferentemente 2-4 h a 25ºC dando el bloque constructivo (**19**). Como alternativa a esto, el compuesto orgánico (**17**) puede *P*-alquilarse con un haluro de alquilo y luego acoplarse sobre un oligonucleótido que lleva amina dando (**19**).

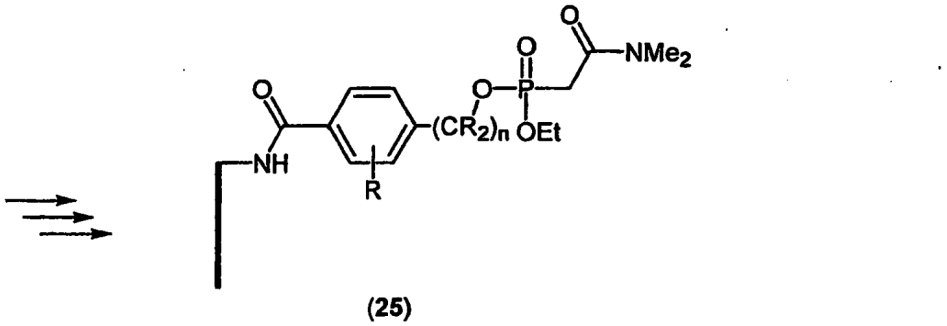
Un identificador que lleva aldehído (**20**) puede formarse mediante la reacción entre el éster de NHS de ácido 4-formilbenzoico y un oligonucleótido que lleva amina usando condiciones similares a aquellas descritas anteriormente. El identificador (**20**) reacciona con (**19**) bajo condiciones ligeramente alcalinas dando el alqueno (**21**).



La reacción de bloques constructivos monoméricos (**19**) e identificador (**20**) puede realizarse del siguiente modo: el identificador (**20**) (1 nmol) se mezcla con el bloque constructivo (**19**) (1 nmol) en TAPS 0,1 M, fosfato o tampón HEPES y disolución de NaCl 1 M, pH=7,5-8,5 y preferentemente pH=8,0. La mezcla de reacción se deja a 35-65ºC, preferentemente a 58ºC, durante la noche dando el producto de reacción (**21**).

Como alternativa a (**17**), en su lugar pueden usarse fosfonatos (**24**). Pueden prepararse mediante la reacción entre clorofosfito de dietilo (**22**) y el alcohol que lleva carboxi apropiado. El ácido carboxílico se transforma entonces en el éster de NHS (**24**) y puede aplicarse el procedimiento y las alternativas descritas anteriormente. Aunque, en lugar de una simple *P*-alquilación, el fosfito puede someterse a reacción de Arbuzov y generar el fosfonato. El bloque constructivo (**25**) se beneficia del hecho de que sea más reactivo que su homólogo de fosfonio (**19**).

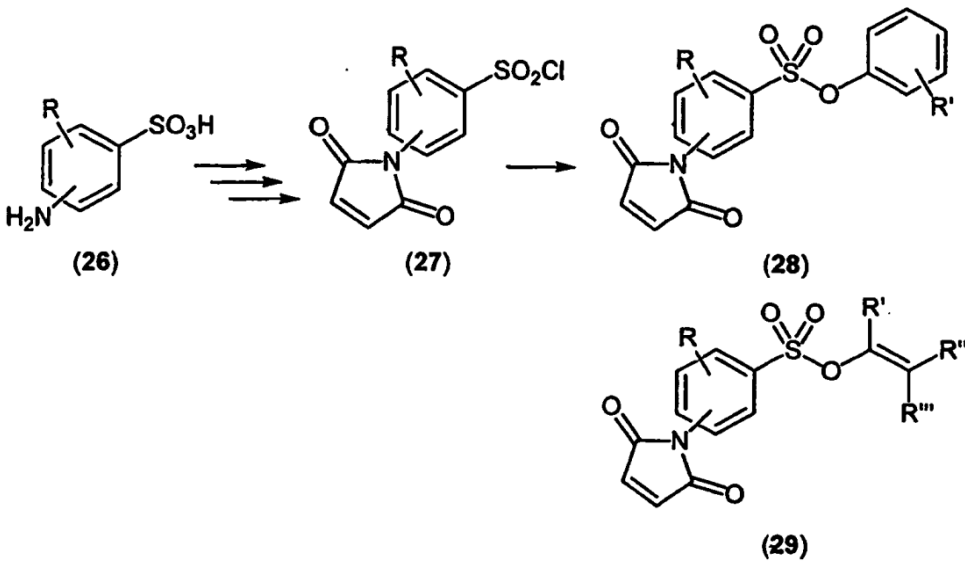


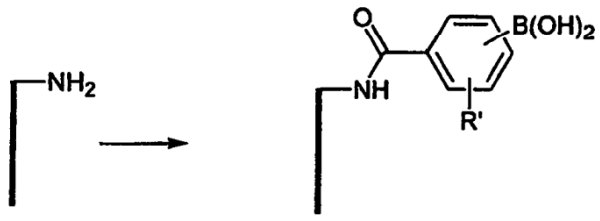


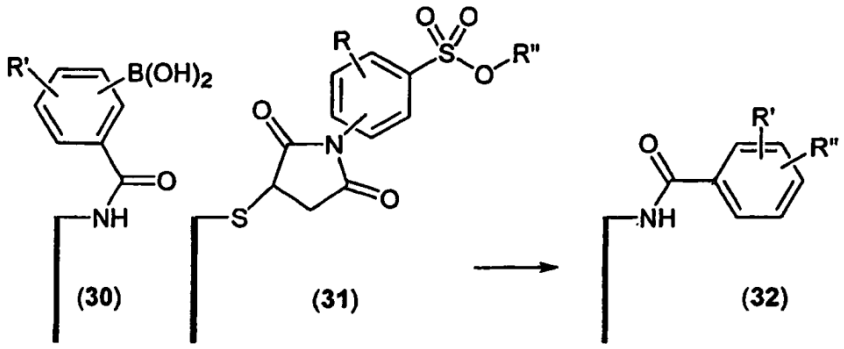
E. Reacciones de arilación, hetarilación y vinilación catalizadas por metales de transición

Los bloques constructivos electrófilos (**31**) que puede transferir una funcionalidad arilo, hetarilo o vinilo pueden prepararse a partir de compuestos orgánicos (**28**) y (**29**) usando procedimientos de acoplamiento para derivados de maleimida con los oligonucleótidos que llevan SH descritos anteriormente. Alternativamente a la maleimida, los derivados del éster de NHS pueden prepararse a partir de, por ejemplo, derivados de ácido carboxibencenosulfónico, usarse acoplando éstos a un oligonucleótido que lleva amina. El grupo R de (**28**) y (**29**) se usa para sintonizar la reactividad del sulfonato dando la reactividad apropiada.

El acoplamiento cruzado catalizado por metales de transición puede realizarse del siguiente modo: una premezcla de Na_2PdCl_4 1,4 mM y $P(p\text{-}SO_3C_6H_4)_3$ 2,8 mM en agua dejada durante 15 min se añadió a una mezcla del identificador (**30**) y el bloque constructivo (**31**) (ambos 1 nmol) en tampón NaOAc 0,5 M a pH=5 y NaCl 75 mM ([Pd] final = 0,3 mM). Entonces, la mezcla se deja durante la noche a 35-65ºC, preferentemente 58ºC, dando el producto de reacción (**32**).





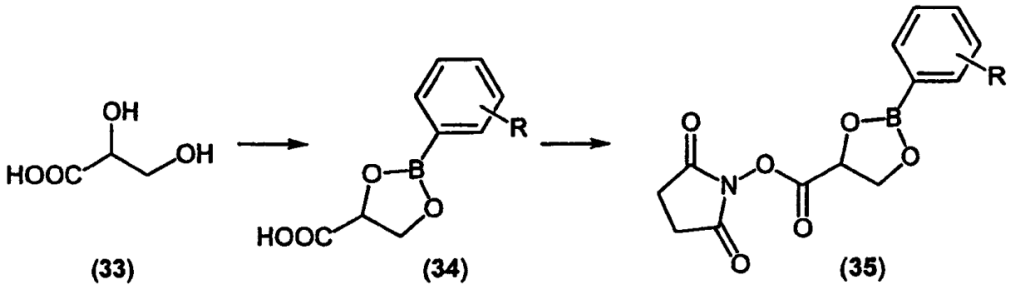


R" = arilo, hetarilo o vinilo

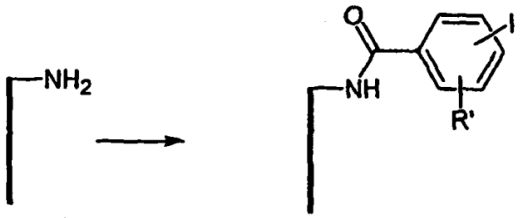
Los bloques constructivos monoméricos nucleófilos correspondientes que pueden transferir una funcionalidad arilo, hetarilo o vinilo pueden prepararse a partir de compuestos orgánicos del tipo (**35**). Éste está disponible por esterificación de un ácido borónico por un diol, por ejemplo, (**33**), seguido de transformación en el derivado de éster de NHS. El derivado de éster de NHS puede entonces acoplarse a un oligonucleótido usando procedimientos de acoplamiento para derivados de éster de NHS con los oligonucleótidos que llevan amina descritos anteriormente para generar el tipo de bloque constructivo (**37**). Alternativamente, los derivados de maleimida pueden prepararse como se ha descrito anteriormente y cargarse sobre oligonucleótidos que llevan SH.

El acoplamiento cruzado catalizado por metales de transición se realiza del siguiente modo:

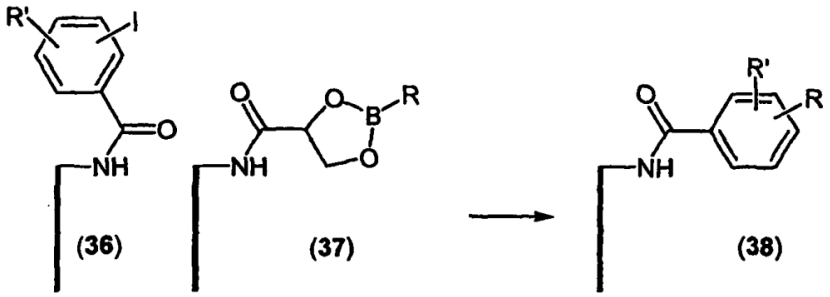
Una premezcla de Na_2PdCl_4 1,4 mM y $P(p\text{-}SO_3C_6H_4)_3$ 2,8 mM en agua dejada durante 15 min se añadió a una mezcla del identificador (**36**) y el bloque constructivo (**37**) (ambos 1 nmol) en tampón NaOAc 0,5 M a pH=5 y NaCl 75 mM ([Pd] final =0,3 mM). Entonces, la mezcla se deja durante la noche a 35-65ºC, preferentemente a 58ºC, dando molde unido (**38**).



(33) (34) (35)



(36)

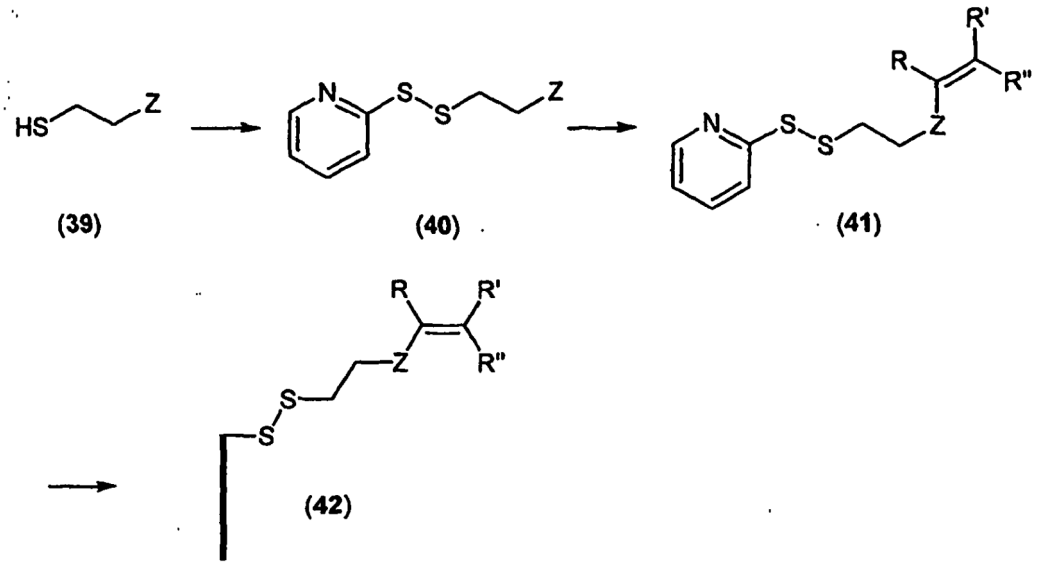


(36) (37) (38)

R = arilo, hetarilo o vinilo

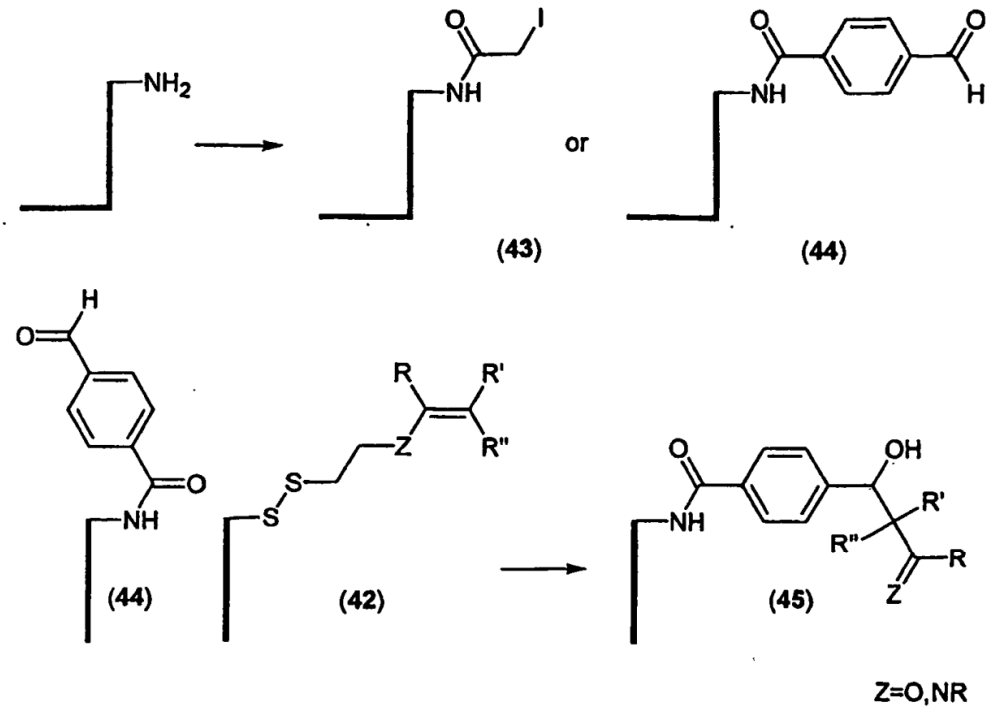
F. Reacciones de bloques constructivos monoméricos de enamina y éter enólico

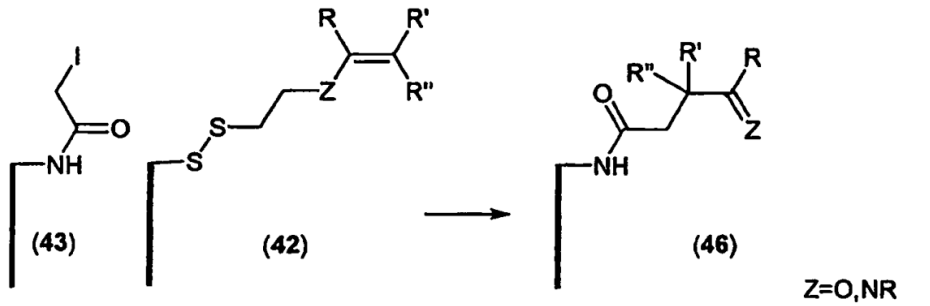
Los bloques constructivos cargados con enaminas y éteres enólicos pueden prepararse del siguiente modo: para Z=NHR (R=H, alquilo, arilo, hetarilo), una 2-mercaptoetilamina puede hacerse reaccionar con un disulfuro de dipiridilo para generar el disulfuro activado (**40**), que puede entonces condensarse en una cetona o un aldehído bajo condiciones de deshidratación dando la enamina (**41**). Para Z=OH, 2-mercaptoetanol se hace reaccionar con un disulfuro de dipiridilo, seguido de *O*-tosilación (Z=OTs). El tosilato (**40**) puede entonces hacerse reaccionar directamente con un enolato o en presencia de fluoruro con un enolato de O-trialquilsililo para generar el enolato (**41**). La enamina o el enolato (**41**) pueden entonces acoplarse sobre un oligonucleótido que lleva SH como se ha descrito anteriormente dando el bloque constructivo (**42**).



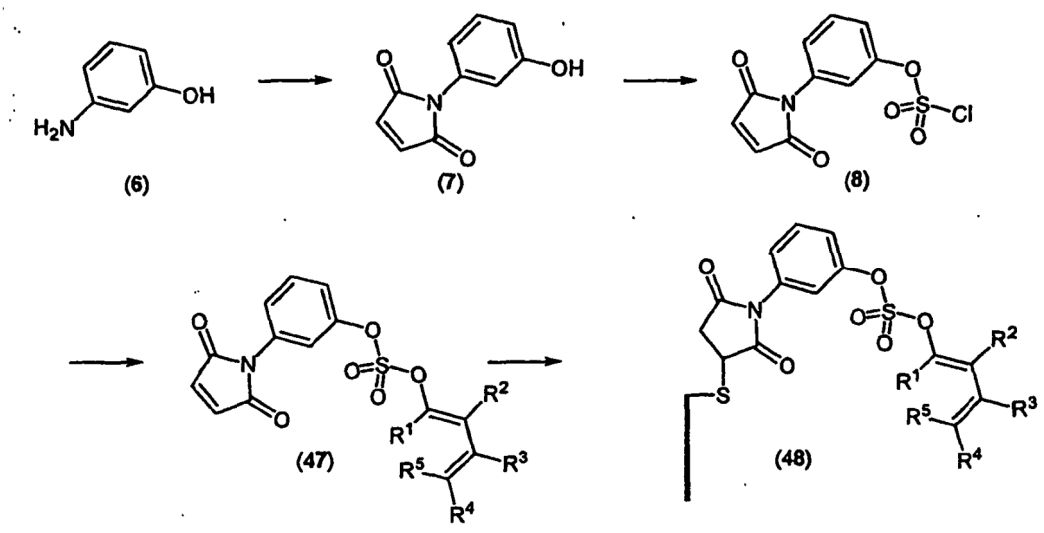
El bloque constructivo (**42**) puede hacerse reaccionar con un oligonucleótido identificador que lleva carbonilo como (**44**) o alternativamente un oligonucleótido que lleva haluro de alquilo como (**43**) del siguiente modo: el bloque constructivo (**42**) (1 nmol) se mezcla con el identificador (**43**) (1 nmol) en tampón MOPS 50 mM, fosfato o HEPES y disolución de NaCl 250 mM, pH=7,5-8,5 y preferentemente pH=7,5. La mezcla de reacción se deja a 35-65ºC, preferentemente a 58ºC, durante la noche o alternativamente a una temperatura fluctuante (10ºC durante 1 segundo, luego 35ºC durante 1 segundo) dando el producto de reacción (**46**) en el que Z=O o NR. Para compuestos en los que Z=NR pueden aplicarse condiciones ligeramente ácidas para dar el producto (**46**) con Z=O.

El bloque constructivo (**42**) (1 nmol) se mezcla con el identificador (**44**) (1 nmol) en tampón TAPS 0,1 M, fosfato o HEPES y disolución de NaCl 300 mM, pH=7,5-8,5 y preferentemente pH=8,0. La mezcla de reacción se deja a 35-65ºC, preferentemente a 58ºC, durante la noche o alternativamente a una temperatura fluctuante (10ºC durante 1 segundo, luego 35ºC durante 1 segundo) dando el producto de reacción (**45**) en el que Z=O o NR. Para compuestos en los que Z=NR pueden aplicarse condiciones ligeramente ácidas para dar el producto (**45**) con Z=O.



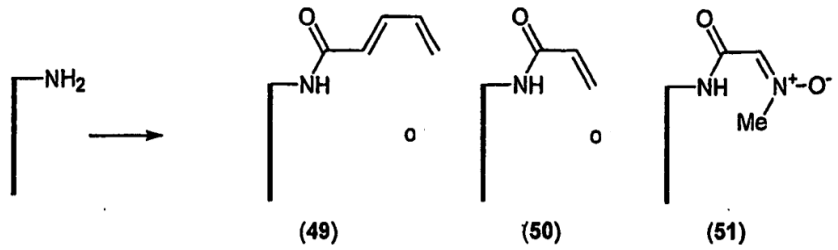


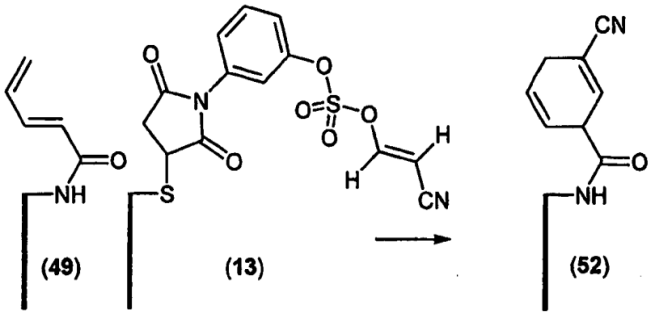
El tipo de éteres enólicos (**13**) puede someterse a cicloadición con o sin catálisis. Similarmente, los éteres dienólicos pueden prepararse y usarse, por ejemplo, haciendo reaccionar (**8**) con el enolato o enolato de trialquilsililo (en presencia de fluoruro) de una cetona o aldehído α,β-insaturado para generar (**47**), que puede cargarse sobre un oligonucleótido que lleva SH dando el bloque constructivo monomérico (**48**).

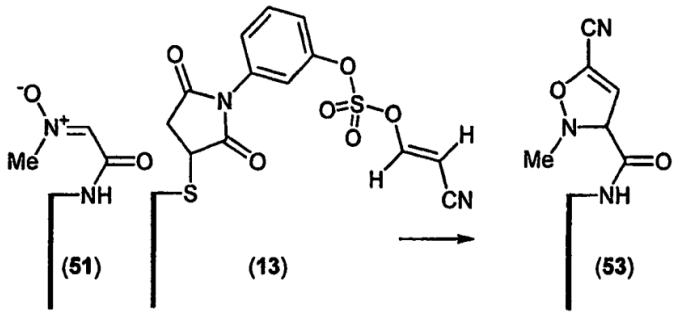


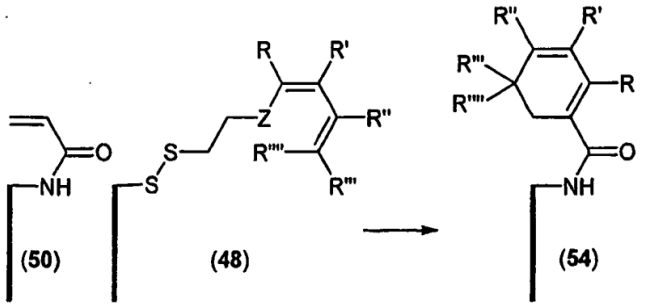
El dieno (**49**), el eno (**50**) y el 1,3-dipol (**51**) pueden formarse por simple reacción entre un oligonucleótido que lleva amino y el éster de NHS del compuesto orgánico correspondiente. La reacción de (**13**) o alternativamente (**31**, R"=vinilo) con dienos como, por ejemplo, (**49**) dando (**52**) o, por ejemplo, 1,3-dipoles (**51**) dando (**53**) y reacción de (**48**) o (**31**, R"=dienilo) con enos como, por ejemplo, (**50**) dando (**54**), puede realizarse del siguiente modo:

El bloque constructivo (**13**) o (**48**) (1 nmol) se mezcla con el identificador (**49**) o (**50**) o (**51**) (1 nmol) en tampón MOPS 50 mM, fosfato o HEPES y disolución de NaCl 2,8 M, pH=7,5-8,5 y preferentemente pH=7,5. La mezcla de reacción se deja a 35-65ºC, preferentemente a 58ºC, durante la noche o alternativamente a una temperatura fluctuante (10ºC durante 1 segundo, luego 35ºC durante 1 segundo) dando el molde unido (**52**), (**53**) o (**54**), respectivamente.



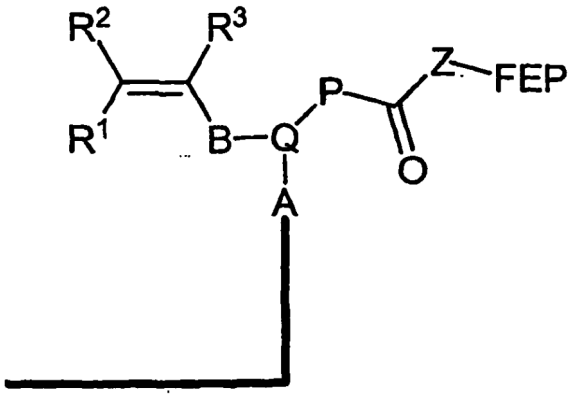






Bloques constructivos de escisión por reticulación

Puede ser ventajoso dividir la transferencia de una entidad química a un grupo reactivo receptor en dos etapas separadas, concretamente una etapa de reticulación y una etapa de escisión debido a que cada etapa puede optimizarse. Un bloque constructivo adecuado para este procedimiento de dos etapas se ilustra a continuación:



Inicialmente, un grupo reactivo que aparece en el precursor de la entidad funcional (abreviado FEP) reacciona con un grupo reactivo receptor, por ejemplo, un grupo reactivo que aparece en un andamiaje, formándose así una reticulación. Posteriormente se realiza una escisión, normalmente añadiendo un agente oxidante acuoso tal como I_2, Br_2, Cl_2, H^+, o un ácido de Lewis. La escisión produce una transferencia del grupo HZ-FEP al resto receptor, tal como un andamiaje.

En la fórmula anterior

Z es O, S, NR^4
Q es N, CR^1
P es un enlace de valencia, O, S, NR^4, o un grupo arileno C_{5-7}, alquileno C_{1-6}, O-alquileno C_{1-6}, S-alquileno C_{1-6}, NR^1-alquileno, O-alquileno C_{1-6}, S-alquileno C_{1-6}, estando opcionalmente dicho grupo sustituido con 0-3 R^4, 0-3 R^5 y 0-3 R^9 o alquilen C_1-C_3-NR^4_2, alquilen C_1-C_3-$NR^4C(O)R^8$, alquilen C_1-C_3-$NR^4C(O)OR^8$, alquilen C_1-C_2-O-NR^4_2, alquilen C_1-C_2-O-$NR^4C(O)R^8$, alquilen C_1-C_2-O-$NR^4C(O)OR^8$ sustituido con 0-3 R^9,
B es un grupo que comprende D-E-F en la que
D es un enlace de valencia o un grupo alquileno C_{1-6}, alquenileno C_{1-6}, alquinileno C_{1-6}, arileno C_{5-7} o heteroarileno C_{5-7}, estando dicho grupo opcionalmente sustituido con 1 a 4 grupos R^{11},
E es, si está presente, un enlace de valencia, O, S, NR^4, o un grupo alquileno C_{1-6}, alquenileno C_{1-6}, alquinileno C_{1-6}, arileno C5-7 o heteroarileno C_{5-7}, estando dicho grupo opcionalmente sustituido con 1 a 4 grupos R^{11},
F es, si está presente, un enlace de valencia, O, S, o NR^4,
A es un grupo espaciador que distancia la estructura química del elemento complementario que puede ser un ácido nucleico,
R^1, R^2 y R^3 se seleccionan independientemente entre sí del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_6, alquenilo C_2-C_6, alquinilo C_2-C_6, alcadienilo C_4-C_8, cicloalquilo C_3-C_7, cicloheteroalquilo C_3-C_7, arilo y heteroarilo, estando dicho grupo sustituido con 0-3 R^4, 0-3 R^5 y 0-3 R^9 o alquilen C_1-C_3-NR^4_2, alquilen C_1-C_3-$NR^4C(O)R^8$, alquilen C_1-C_3-$NR^4C(O)OR^8$, alquilen C_1-C_2-O-NR^4_2, alquilen C_1-C_2-O-$NR^4C(O)R^8$, alquilen C_1-C_2-O-$NR^4C(O)OR^8$ sustituido con 0-3 R^9,
FEP es un grupo seleccionado del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_6, alquenilo C_2-C_6, alquinilo C_2-C_6, alcadienilo C_4-C_8, cicloalquilo C_3-C_7, cicloheteroalquilo C_3-C_7, arilo y heteroarilo, estando dicho grupo sustituido con 0-3 R^4, 0-3 R^5 y 0-3 R^9 o alquilen C_1-C_3-NR^4_2, alquilen C_1-C_3-$NR^4C(O)R^8$, alquilen C_1-C_3-$NR^4C(O)OR^8$, alquilen C_1-C_2-O-NR^4_2, alquilen C_1-C_2-O-$NR^4C(O)R^8$, alquilen C_1-C_2-O-$NR^4C(O)OR^8$ sustituido con 0-3 R^9,
en las que R^4 es H o se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C_1-C_6, alquenilo C_2-C_6, alquinilo C_2-C_6, cicloalquilo C_3-C_7, cicloheteroalquilo C_3-C_7, arilo, heteroarilo, estando dicho grupo sustituido con 0-3 R^9 y
R^5 se selecciona independientemente de $-N_3$, -CNO, $-C(NOH)NH_2$, -NHOH, $-NHNHR^6$, $-C(O)R^8$, $-SnR^6_3$, $-B(OR^6)_2$, $-P(O)(OR^6)_2$ o el grupo que consiste en alquenilo C_2-C_6, alquinilo C_2-C_6, alcadienilo C_4-C_8, estando dicho grupo sustituido con 0-2 R^7,
en las que R^e se selecciona independientemente de H, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_7, arilo o alquilen C_1-C_6-arilo sustituido con 0-5 átomos de halógeno seleccionados de -F, -Cl, -Br y - I; y R^7 se selecciona independientemente de $-NO_2$, $-COOR^6$, $-COR^6$, -CN, $-OSiR^6_3$, $-OR^6$ y $-NR^6_2$.

R^8 es H, alquilo C_1-C_6, alquenilo C_2-C_6, alquinilo C_2-C_6, cicloalquilo C_3-C_7, aril o alquilen C_1-C_6-arilo sustituido con 0-3 sustituyentes independientemente seleccionados de -F, -Cl, $-NO_2$, $-R^3$, $-OR^3$, $-SiR^3{}_3$
R^9 es =O, -F, -Cl, -Br, -I, -CN, $-NO_2$, $-OR^6$, $-NR^6{}_2$, $-NR^6$-$C(O)R^8$, $-NR^6$-$C(O)OR^8$, $-SR^6$, $-S(O)R^6$, $-S(O)_2R^6$, $-COOR^6$, $-C(O)NR^6{}_2$ y $-S(O)_2NR^6{}_2$.

En una realización preferida, Z es O o S, P es un enlace de valencia, Q es CH, B es CH_2, y R^1, R^2 y R^3 es H. El enlace entre el grupo carbonilo y Z es escindible con I_2 acuoso.

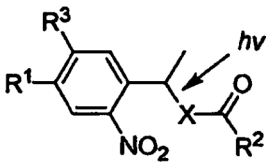
Ligadores escindibles

Un ligador escindible puede posicionarse entre la diana y un soporte sólido o entre el posible candidato a fármaco y la región identificadora o cualquier otra posición que pueda garantizar una separación de la secuencia de ácidos nucleicos que comprende los codones de complejos satisfactorios de los complejos de unión no específica. El ligador escindible puede ser selectivamente escindible, es decir, pueden seleccionarse condiciones que sólo escinden ese ligador particular.

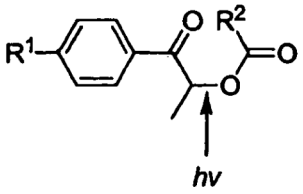
Los ligadores escindibles pueden seleccionarse de una gran plétora de estructura químicas. Ejemplos de ligadores incluyen, pero no se limitan a, ligadores que tienen un sitio de escisión enzimática, ligadores que comprenden un componente degradable químico, ligadores escindibles por radiación electromagnética.

Ejemplos de ligadores escindibles por radiación electromagnética (luz)

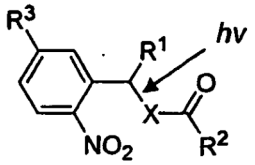
o-nitrobencilo



p-alcoxi

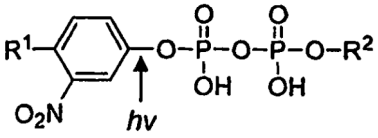


o-nitrobencilo en la posición exo



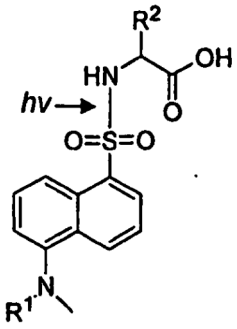
Para más detalles véase Holmes CP. J. Org. Chem. 1997, 62, 2370-2380

3-nitrofeniloxi



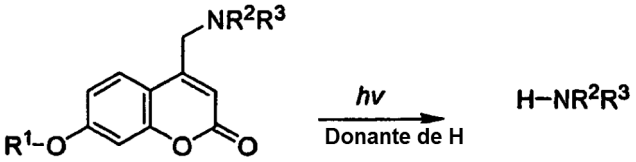
Para más detalles véase Rajasekharan Pillai, V. N. Synthesis. 1980, 1-26

Derivados de dansilo:



Para más detalles véase Rajasekharan Pillai, V. N. Synthesis. 1980, 1-26

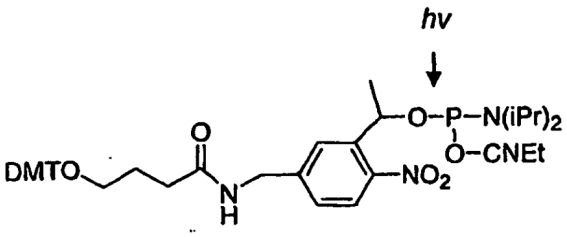
Derivados de cumarina



Para más detalles véase R. O. Schoenleber, B. Giese. Synlett 2003, 501-504

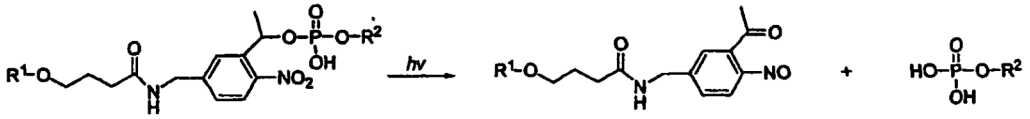
R^1 y R^2 pueden ser tanto del posible candidato a fármaco como del identificador, respectivamente. Alternativamente, R^1 y R^2 puede ser tanto de la diana como de un soporte sólido, respectivamente.
R^3 = H o OCH_3
Si X es O, entonces el producto será un ácido carboxílico
Si X es NH, el producto será una carboxamida

Un ejemplo específico es PC Spacer Phosphoramidite (nº de catálogo de Glen Research 10-4913-90) que puede introducirse en un oligonucleótido durante la síntesis y escindirse sometiendo la muestra en agua a luz UV (~ 300-350 nm) durante 30 segundos a 1 minuto.



DMT = 4,4'-Dimetoxitritilo
iPr = Isopropilo
CNEt = Cianoetilo

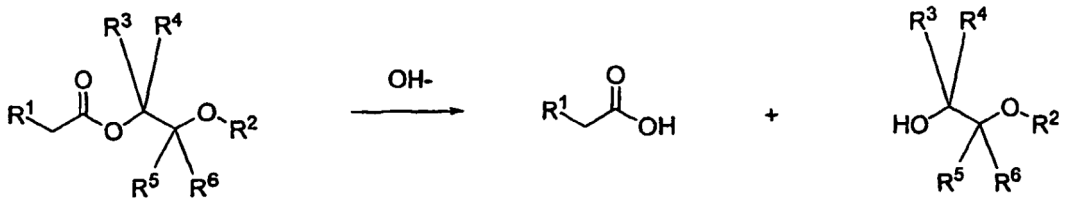
El PC Spacer Phosphoramidite anterior se incorpora de forma adecuada en una biblioteca de complejos en una posición entre el identificador y el posible candidato a fármaco. El espaciador puede escindirse según la siguiente reacción.



R^1 y R^2 pueden ser tanto de la molécula codificada como de la molécula identificadora, respectivamente. En un aspecto preferido, R^2 es un oligonucleótido identificador y R^1 es el posible candidato a fármaco. Cuando el ligador se escinde se genera un grupo fosfato que permite más reacciones biológicas. Como un ejemplo, el grupo fosfato puede posicionarse en el extremo 5' de un oligonucleótido que permite que tenga lugar un procedimiento de ligación enzimática.

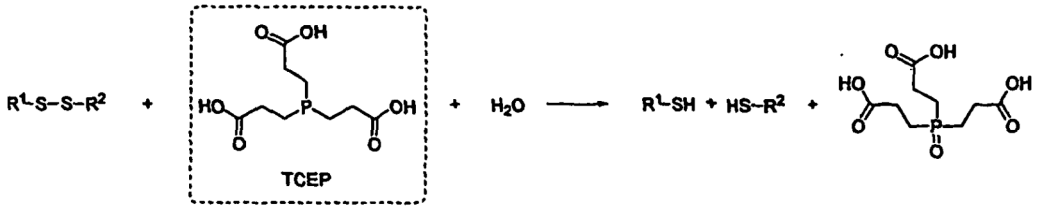
Ejemplos de ligadores escindibles por agentes químicos:

Los ligadores de éster pueden escindirse por ataque nucleófilo usando, por ejemplo, iones hidróxido. En la práctica, esto puede llevarse a cabo sometiendo el complejo diana-ligando a una base durante un corto periodo.



R^1 y R^2 pueden ser tanto del posible candidato a fármaco como del identificador, respectivamente. R^{4-6} pueden ser cualquiera de los siguientes: H, CN, F, NO_2, SO_2NR_2.

Los ligadores de disulfuro pueden escindirse / reducirse eficientemente por Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP). La TCEP reduce selectiva y completamente incluso los disulfuros de alquilo solubles en agua más estables a lo largo de un amplio intervalo de pH. Estas reducciones requieren frecuentemente menos de 5 minutos a temperatura ambiente. La TCEP es un reductor no volátil e inodoro y, a diferencia de la mayoría de los otros agentes reductores, es resistente a la oxidación del aire. Las trialquilfosfinas tales como TCEP son estables en disolución acuosa, reducen selectivamente enlaces disulfuro y son esencialmente no reactivas hacia otros grupos funcionales comúnmente encontrados en proteínas.



Más detalles sobre la reducción de enlaces disulfuro pueden encontrarse en Kirley, T.L.(1989), Reduction and fluorescent labeling of cyst(e)ine-containing proteins for subsequent structural analysis, Anal. Biochem. 180, 231 y Levison, M.E., y col. (1969), Reduction of biological substances by water-soluble phosphines: Gamma-globulin. Experentia 25, 126-127.

Ligadores escindibles por enzimas

El ligador que conecta el posible candidato a fármaco con el identificador o el soporte sólido y la diana puede incluir una región de péptido que permite una escisión específica usando una proteasa. Ésta es una estrategia muy conocida en biología molecular. Las proteasas específicas de sitio y sus secuencias de aminoácidos diana relacionadas se usan frecuentemente para eliminar las marcas de la proteína de fusión que facilitan la expresión, solubilidad, secreción o purificación potenciada de la proteína de fusión.

Pueden usarse diversas proteasas para realizar una escisión específica. La especificidad es especialmente importante cuando el sitio de escisión se presenta junto con otras secuencias tales como, por ejemplo, las proteínas de fusión. Se han optimizado diversas condiciones con el fin de potenciar la eficiencia de escisión y controlar la especificidad. Estas condiciones están disponibles y se conocen en la materia.

La enterocinasa es un ejemplo de una enzima (serina proteasa) que corta una secuencia de aminoácidos específica. El sitio de reconocimiento de enterocinasa es Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (DDDDK), y escinde el extremo Cly de Lys. La enterocinasa recombinante purificada está comercialmente disponible y es altamente activa con respecto a amplios intervalos de pH (pH 4,5-9,5) y temperatura (4-45ºC).

La proteasa de inclusión nuclear del virus del mosaico del tabaco (TEV) es otra proteasa comercialmente disponible y bien caracterizada que puede usarse para cortar en una secuencia de aminoácidos específica. La proteasa de TEV escinde la secuencia Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly/Ser (ENLYFQG/S) entre Gln-Gly o Gln-Ser con alta especificidad.

Otra proteasa muy conocida es la trombina que escinde específicamente la secuencia Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser (LVPAGS) entre Arg-Gly. La trombina también se ha usado para la escisión de proteínas de fusión recombinantes. También pueden usarse otras secuencias para la escisión de trombina; estas secuencias son más o menos específicas y se escinden más o menos eficientemente por trombina. La trombina es una proteasa altamente activa y el público conoce diversas condiciones de reacción.

El factor de coagulación activado FX (FXa) también es conocido por ser una proteasa específica y útil. Esta enzima escinde el extremo C de Arg en la secuencia Ile-Glu-Gly-Arg (IEGR). FXa se usa frecuentemente para cortar entre las proteínas de fusión cuando se producen proteínas con tecnología recombinante. También puede usarse otras secuencias de reconocimiento para FXa.

También pueden usarse otros tipos de enzimas proteolíticas que reconocen secuencias de aminoácidos específicas. Además, las enzimas proteolíticas que escinden secuencias de aminoácidos en un modo inespecífico también puede usarse si sólo el ligador contiene una secuencia de aminoácidos en la molécula del complejo.

También pueden usarse otros tipos de moléculas tales como ribozimas, anticuerpos catalíticamente activos o lipasas. El único requisito previo es que la molécula catalíticamente activa puede escindir la estructura específica usada como ligador, o como parte del ligador, que conecta la región codificante y la molécula presentada o, provisionalmente el soporte sólido y la diana.

Está disponible una variedad de endonucleasas que reconocen y escinden ácido nucleico bicatenario que tiene una secuencia específica de nucleótidos. La endonucleasa Eco RI es un ejemplo de una nucleasa que corta eficientemente un ligador de secuencias de nucleótidos que comprende la secuencia GAATTC, también cuando esta secuencia está próxima a la longitud de la secuencia de nucleótidos. La Eco RI recombinante purificada está comercialmente disponible y es altamente activa en una gama de condiciones de tampón. Como ejemplo, la Eco RI está funcionando en diversos protocolos como se indica a continuación (NETBuffer está disponible de New England Biolabs):

NETBuffer 1: [Bis Tris Propano-HCl 10 mM, $MgCl_2$10 mM, ditiotreitol 1 mM (pH 7,0 a 25ºC)],
NETBuffer 2: [NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, 10 mM $MgCl_2$, ditiotreitol 1 mM (pH 7,9 a 25ºC)],
NETBuffer 3: [NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, 10 mM $MgCl_2$, ditiotreitol 1 mM (pH 7,9 a 25ºC)],
NETBuffer 4: [acetato de potasio 50 mM, Tris-acetato 20 mM, acetato de magnesio 10 mM, ditiotreitol 1 mM (pH 7,9 a 25ºC)].
Tampón de extensión: KCl mM, Tris-HCl 20 mM (pH 8,8 a 25ºC), $(NH_4)_2SO_4$ 10 mM, $MgSO_4$ 2 mM y 0,1% de Triton X-100 y dNTP 200 µM.

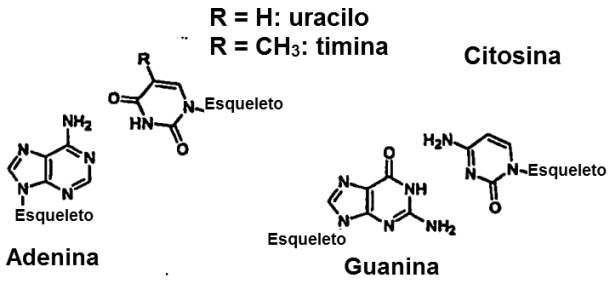
Nucleótidos

Los nucleótidos usados en la presente invención pueden ligarse juntos en una secuencia de nucleótidos, es decir, un oligonucleótido. Cada monómero de nucleótidos está normalmente compuesto por dos partes, concretamente un resto de nucleobase y un esqueleto. El esqueleto puede estar subdividido en algunos casos en un resto de azúcar y un ligador internucleosídico.

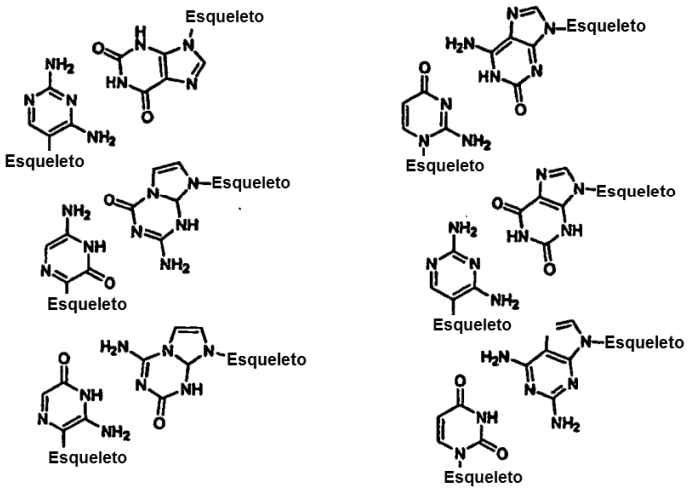
El resto de nucleobase puede seleccionarse de nucleobases que se producen naturalmente, además de nucleobases que no se producen naturalmente. Por tanto, “nucleobase” incluye no sólo los heterociclos de purina y pirimidina conocidos, sino también análogos heterocíclicos y tautómeros de los mismos. Ejemplos ilustrativos de nucleobases son adenina, guanina, timina, citosina, uracilo, purina, xantina, diaminopurina, 8-oxo-N^6-metiladenina, 7-deazaxantina, 7-deazaguanina, N^4,N^4-etanocitosina, N^6,N^6-etano-2,6-diaminopurina, 5-metilcitosina, 5-(C^3-C^6)-alquinilcitosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, pseudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y las nucleobases “que no se producen naturalmente” descritas en Benner y col., patente de EE.UU. nº 5.432.272. El término “nucleobase” pretende cubrir estos ejemplos, además de análogos y tautómeros de los mismos. Nucleobases especialmente interesantes son adenina, guanina, timina, citosina, 5-metilcitosina y uracilo, que se consideran las nucleobases que se producen naturalmente.

A continuación se muestran ejemplos de pares específicas adecuadas de nucleobases:

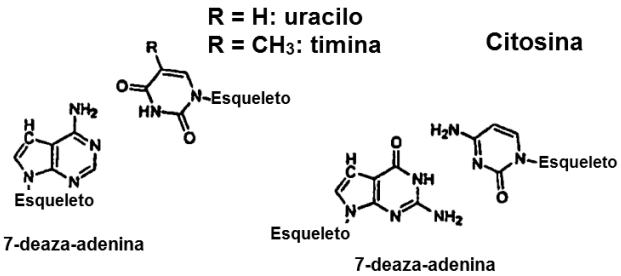
Pares de bases naturales



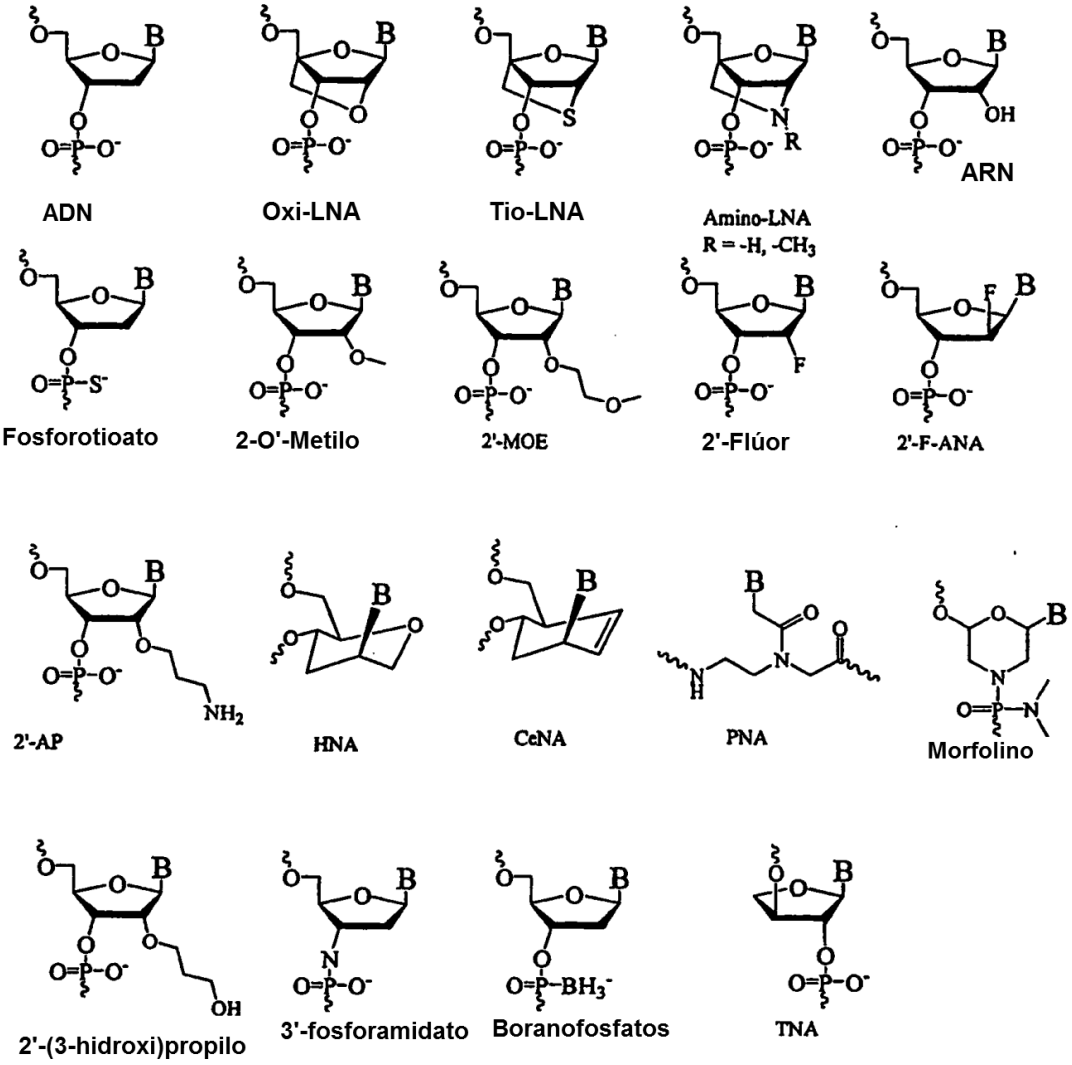
Pares de bases sintéticas



Apareamiento de bases de purina sintéticas con pirimidinas naturales



A continuación se muestran ejemplos adecuados de unidades de esqueleto (B denota una nucleobase):



El resto de azúcar del esqueleto es adecuadamente una pentosa, pero puede ser la parte apropiada de un PNA o un anillo de seis miembros. Ejemplos adecuados de posibles pentosas incluyen ribosa, 2'-desoxirribosa, 2'-O-metil-ribosa, 2'-fluoro-ribosa y 2'-4'-O-metilen-ribosa (LNA). Adecuadamente, la nucleobase está unida a la posición 1' de la entidad de pentosa.

Un ligador internucleosídico conecta el extremo 3' del monómero precedente con un extremo 5' de un monómero subsiguiente cuando el resto de azúcar del esqueleto es una pentosa, como ribosa o 2-desoxirribosa. El enlace internucleosídico puede ser el enlace fosfodiéster que se produce naturalmente o un derivado del mismo. Ejemplos de tales derivados incluyen fosforotioato, fosfonato de metilo, fosforamidato, fosfotriéster y fosfoditioato. Además, el ligador internucleosídico puede ser distinto de ligadores que contienen no fósforo conocidos en la técnica.

Monómeros de ácido nucleico preferidos incluyen nucleósidos que se producen naturalmente que forman parte del ADN, además de la familia de ARN conectada mediante enlaces fosfodiéster. Los miembros de la familia del ADN incluyen desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina y desoxicitidina. Los miembros de la familia del ARN incluyen adenosina, guanosina, uridina, citidina e inosina.

Selección

Una vez se ha formado la biblioteca según los procedimientos desvelados en este documento, la biblioteca debe cribarse para compuestos químicos que tienen características deseables predeterminadas. Las características deseables predeterminadas pueden incluir unión a una diana, cambiar catalíticamente la diana, hacer reaccionar químicamente con una diana de un modo que altere/modifique la diana o la actividad funcional de la diana, y unir covalentemente a la diana como en un inhibidor suicida. Además de las bibliotecas producidas como se desvela en este documento anteriormente, las bibliotecas preparadas según el procedimiento A y B más adelante pueden cribarse según la presente invención.

A. Las moléculas de presentación pueden ser compuestos individuales en su “estado” final que se marcan individualmente y por separado, por ejemplo, los compuestos individuales pueden unirse individualmente a una marca única. Cada marca única contiene información sobre ese compuesto específico tal como, por ejemplo, estructura, masa molecular, etc.

B. Una molécula de presentación puede ser una mezcla de compuestos que puede considerarse que está en su “estado” final. Estas moléculas de presentación se marcan normalmente individualmente y por separado, es decir, cada compuesto individual en una mezcla de compuestos puede unirse a la misma marca. Puede usarse otra marca para otra mezcla de compuestos. Cada marca única contiene información sobre esa mezcla específica tal como, por ejemplo, posición espacial en una placa.

La diana puede ser cualquier compuesto de interés. La diana puede ser una proteína, péptido, hidrato de carbono, polisacárido, glicoproteína, hormona, receptor, antígeno, anticuerpo, virus, sustrato, metabolito, análogo del estado de transición, cofactor, inhibidor, fármaco, colorante, nutriente, factor de crecimiento, célula, tejido, etc., sin limitación. Dianas particularmente preferidas incluyen, pero no se limitan a, enzima conversora de angiotensina, renina, ciclooxigenasa, 5-lipoxigenasa, enzima conversora de IIL-10, receptores de citocinas, receptor de PDGF, inosina monofosfato deshidrogenasa de tipo II, β-lactamasas y citocromo fúngico P-450. Las dianas pueden incluir, pero no se limitan a, bradiquinina, elastasa neutrófila, las proteínas del VIH, que incluyen *tat, rev, gag, int,* RT, nucleocápside, etc., VEGF, bFGF, TGFβ, KGF, PDGF, trombina, teofilina, cafeína, sustancia P, IgE, sPLA2, glóbulos rojos, glioblastomas, coágulos de fibrina, PBMC, hCG, lectinas, selectinas, citocinas, ICP4, proteínas del complemento, etc.

El límite superior para la intensidad de las condiciones de rigurosidad es la desintegración del complejo que comprende la molécula presentada y la región codificante. Las condiciones de cribado son conocidas para un experto en la materia.

Los complejos que tienen características deseables predeterminadas pueden separarse del resto de la biblioteca mientras que todavía estén unidos a una marca identificadora de ácidos nucleicos por diversos procedimientos conocidos para un experto en la materia. En una realización de la invención, los productos deseables se separaron de la biblioteca entera sin degradación química del ácido nucleico unido de forma que los ácidos nucleicos del identificador fueran amplificables. La parte del identificador que comprende los codones puede entonces amplificarse, tanto todavía unida al compuesto químico deseable como después de la separación del compuesto químico deseable.

En una cierta realización, la molécula de presentación deseable actúa sobre la diana sin ninguna interacción entre las secuencias codificantes unidas al compuesto de muestra deseable y la diana. En una realización, los compuestos químicos deseables se unen a la diana seguido de una separación del complejo de productos sin unir por varios procedimientos. Los procedimientos incluyen unión a plástico, unión a filtro de nitrocelulosa, cromatografía en columna, filtración, cromatografía de afinidad, centrifugación, y otros procedimientos muy conocidos para inmovilizar dianas.

Brevemente, la biblioteca se somete a la etapa de separación que puede incluir contacto entre la biblioteca y una columna sobre la que diana está unida. Todas las secuencias identificadoras que no codifican un producto de reacción que tiene una actividad hacia la diana pasarán a través de la columna. Entidades químicas no deseables adicionales (por ejemplo, entidades que reaccionan de forma cruzada con otras dianas) pueden eliminarse por procedimientos de contraselección. Los complejos deseables están unidos a la columna y pueden eluirse cambiando las condiciones de la columna (por ejemplo, sal, etc.) o la secuencia identificadora asociada al compuesto químico deseable puede separarse por escisión y eluirse directamente.

En una cierta realización, las etapas básicas implican mezclar la biblioteca de complejos con la diana de interés inmovilizada. La diana puede unirse a una matriz de columna o pocillos de microtítulo con inmovilización directa o por medio de unión a anticuerpos u otras interacciones de alta afinidad. En otra realización, la diana y las moléculas presentadas interactúan sin inmovilización de la diana. Las moléculas presentadas que se unen a la diana serán retenidas sobre este superficie, mientras que las moléculas presentadas de no unión se eliminarán durante una única o una serie de etapas de lavado. Los identificadores de complejos unidos a la diana pueden entonces separarse por escisión de la conexión física a la molécula sintética. Puede considerarse ventajoso realizar una etapa de cromatografía después o en lugar de la etapa de lavado. Después de la escisión del enlace físico entre la molécula sintética y el identificador, el identificador puede recuperarse de los medios y amplificarse opcionalmente antes de la etapa de descodificación.

En protocolos de elución tradicionales, los positivos falsos debidos a condiciones de unión y lavado inferiores a las óptimas son difíciles de salvar y pueden requerir elaborar ajustes de condiciones experimentales. Sin embargo, raramente se obtiene un enriquecimiento de más de 100 a 1000. El procedimiento de selección usado en el Ejemplo 7 en este documento alivia el problema de obtener positivos falsos debido a que los complejos de unión no específica permanecen hasta un cierto grado en la cámara de reacción. Los experimentos informados en este documento sugieren que puede obtenerse un enriquecimiento superior a 107.

Adicionalmente, compuestos químicos que reaccionan con una diana pueden separarse de aquellos productos que no reaccionan con la diana. En un ejemplo, un compuesto químico que se une covalentemente con la diana (tal como un inhibidor suicida) puede lavarse bajo condiciones muy rigurosas. El complejo resultante puede entonces tratarse con proteinasa, ADNsa u otros reactivos adecuados para escindir un ligador y liberar los ácidos nucleicos que están asociados al compuesto químico deseable. Los ácidos nucleicos liberados pueden amplificarse.

En otro ejemplo, la característica deseable predeterminada del producto deseable es la capacidad del producto para transferir un grupo químico (tal como la transferencia de acilo) a la diana y así inactivar la diana. Podría tenerse una biblioteca de productos en la que todos los productos tuvieran un grupo químico tioéster, o grupo químico activado similar. Tras el contacto con la diana, los productos deseables transferirán el grupo químico a la diana cambiando concomitantemente el producto deseable de un tioéster a un tiol. Por tanto, un procedimiento de separación que identificaría productos que son ahora tioles (en vez de tioésteres) permitirá la selección de los productos deseables y la amplificación del ácido nucleico asociado a los mismos.

Hay otros procedimientos de separación y cribado que son compatibles con la presente invención que son conocidos para un experto en la materia. En una realización, los productos pueden fraccionarse por varios procedimientos comunes y luego cada fracción se ensaya luego para actividad. Los procedimientos de fraccionamiento pueden incluir tamaño, pH, hidrofobia, etc.

Inherente al presente procedimiento es la selección de entidades químicas basándose en una función deseada; esto puede extenderse a la selección de moléculas pequeñas con una función y especificidad deseada. La especificidad puede requerirse durante el procedimiento de selección extrayendo primero secuencias identificadoras de compuestos químicos que puedan interactuar con una “diana” no deseada (selección negativa, o contraselección), seguido de selección positiva con la diana deseada. Como ejemplo, los inhibidores de citocromo fúngico P-450 son conocidos por reaccionar de forma cruzada hasta cierto grado con citocromo de mamífero P-450 (produciendo graves efectos secundarios). Los inhibidores altamente específicos del citocromo fúngico podrían seleccionarse de una biblioteca eliminando primero aquellos productos que pudieran interactuar con el citocromo de mamífero, seguido de retención de los productos restantes que pueden interactuar con el citocromo fúngico.

Enriquecimiento

La presente invención también se refiere a un procedimiento para determinar la identidad de una entidad química que tiene una propiedad preseleccionada, que comprende las etapas de:

i) generar una biblioteca marcada de entidades químicas agregando marcas identificadoras únicas a entidades químicas,
ii) someter la biblioteca a una condición, en la que una entidad química o un subconjunto de entidades químicas que tienen una propiedad predeterminada se separa del resto de la biblioteca,
iii) recuperar una anti-marca de la biblioteca separada, pudiendo dicha anti-marca interactuar con la única marca identificadora de un modo específico, e
iv) identificar la(s) entidad(es) química(s) que tiene(n) una función preseleccionada descodificando la anti-marca.

La marca se agrega a la entidad química por un procedimiento adecuado. Notablemente, cada entidad química se agrega a una marca por una reacción que implica una reacción química entre un grupo reactivo de la entidad química y un grupo reactivo de la marca, tal como el procedimiento A y B de la sección de selección. La unión de la entidad química puede ser directamente o mediante una parte de molécula de puente. La parte de molécula puede ser cualquier estructura química adecuada que pueda conectar la entidad química con la marca.

La anti-marca tiene la capacidad de interactuar con la única marca identificadora de un modo específico. La estructura química de la anti-marca depende hasta un gran grado de la elección de la única marca. Como ejemplo, si la única marca se elige como anticuerpo, la anti-marca se selecciona como el epítope que puede asociarse con el anticuerpo. En general se prefiere usar una anti-marca que comprenda una secuencia de nucleótidos complementaria a una única marca identificadora.

El procedimiento puede realizarse sin amplificación en ciertas realizaciones. Sin embargo, si están previstas bibliotecas grandes, en general se prefiere usar una anti-marca que sea amplificable. Las anti-marcas que comprenden una secuencia de nucleótidos pueden amplificarse usando técnicas convencionales como PCR. En el caso de que la anti-marca sea una proteína, la proteína puede amplificarse uniendo el ARNm que ha codificado la síntesis del mismo, generando el ADNc a partir del ARNm y sometiendo dicho ARNm a un sistema de traducción. Tal sistema se describe en el documento WO 98/31700. Un procedimiento alternativo para amplificar una marca de proteína es usar proteínas de expresión en fago.

En el caso de que la marca, además de la anti-marca, sea una secuencia de ácidos nucleicos, puede formarse un híbrido marca:anti-marca antes de someter la biblioteca a condiciones de separación o posterior a la etapa de

separación. En algunas realizaciones de la invención se prefiere formar el híbrido marca:anti-marca antes de la etapa de separación con el fin de inertizar la secuencia de nucleótidos agregada con respecto al sistema ya que es muy conocido que ciertas secuencias de nucleótidos pueden unirse a una diana o catalizar una reacción química.

El oligonucleótido anti-marca puede formarse en una variedad de formas. En una realización de la invención, la anti-marca se forma como una reacción de extensión enzimática. La extensión comprende la hibridación inicial de un cebador con la única marca identificadora y la posterior extensión del cebador usando una polimerasa y dNTP. También pueden contemplarse otros tipos de reacciones de extensión. Como ejemplo, las ligasas pueden usarse para crear el cebador a partir de sustratos de di- o trinucleótidos y la extensión puede realizarse usando una polimerasa adecuada.

Puede desearse recuperar la anti-marca en diversas etapas durante el procedimiento. Para este fin se prefiere en algunos aspectos de la invención proporcionar el cebador provisto de un asa que pueda unirse a un componente de afinidad adecuado. Están disponibles un arsenal de asas y componentes de afinidad diferentes para el experto en la materia. El asa más ampliamente usada es biotina, que en general también se prefiere según la presente invención. La biotina se une al componente de afinidad estreptavidina o avidina. Una técnica convencional en el laboratorio es recuperar una entidad bioquímica que tiene unida una biotina usando una fase sólida cubierta con estreptavidina. Adecuadamente, la fase sólida es una perla que puede separarse del líquido después de la acción de unión por rotación o un campo magnético en el caso de que la perla sólida comprenda partículas magnéticas.

En otros aspectos de la presente invención, la anti-marca se proporciona como un oligonucleótido separado. El oligonucleótido separado puede producirse usando estrategias de síntesis con amidito convencionales o puede proporcionarse usando otros procedimientos útiles. En general se prefiere proporcionar el oligonucleótido por síntesis, al menos en parte, debido a que el amidito de biotina se incorpora fácilmente en una cadena de oligonucleótidos naciente. Tras la adición de un oligonucleótido anti-marca a un líquido que comprende entidades químicas marcadas con marcas de oligonucleótidos complementarias se forma una biblioteca bicatenaria como producto de hibridación entre la única marca identificadora y el oligonucleótido anti-marca.

Como se ha mencionado anteriormente, el oligonucleótido anti-marca puede proveerse de un asa, tal como biotina, que puede unirse a un componente de afinidad, tal como estreptavidina o avidina.

Tras la adición de los oligonucleótidos anti-marca a las entidades químicas marcadas, algunos de los oligonucleótidos presentes en los medios pueden no encontrar un componente. En un aspecto de la invención se prefiere que los oligonucleótidos no hibridados con un único identificador relacionado y/o anti-marca se transformen en una doble hélice. En otros aspectos de la invención, los oligonucleótidos monocatenarios se degradan antes de la etapa ii) para evitar la interferencia no buscada.

El asa puede usarse para purificar la biblioteca antes de o posterior a la etapa de separación. En algunas realizaciones de la invención, la etapa de purificación se realiza antes de la etapa de separación para reducir el ruido del sistema. En otro aspecto, el asa se usa para purificar la biblioteca separada posteriormente a la etapa ii) con el fin de recuperar un producto bicatenario que puede amplificarse.

La biblioteca se somete a una condición con el fin de seleccionar entidades químicas que tengan una propiedad que es responsable de esta condición. La condición puede implicar la exposición de la biblioteca a una diana y la separación de las entidades químicas que tienen una afinidad hacia esta diana. Otra condición podría ser someter la biblioteca a un sustrato y separar las entidades químicas que tienen una actividad catalítica con respecto a este sustrato.

La anti-marca puede formarse posteriormente a la etapa de separación. En un aspecto de la invención, el nucleótido monocatenario que sirve de marca se hace bicatenario mientras que la entidad química está unida a la diana de una separación por afinidad. Opcionalmente, en un ciclo de temperatura repetido puede formarse una pluralidad de anti-marcas como productos de extensión usando la marca como molde. En otro aspecto de la invención, la entidad química que posee el oligonucleótido monocatenario se separa de la diana y posteriormente se prepara una anti-marca complementaria.

En el caso de que la anti-marca comprenda un asa, esta asa puede usarse para purificar la biblioteca separada. La recuperación de la anti-marca se realiza entonces por separación por fusión de dicha anti-marca de una biblioteca bicatenaria separada. Opcionalmente, la cantidad de anti-marcas puede multiplicarse por técnicas de amplificación convencionales tales como PCR.

El procedimiento según la invención puede realizarse usando una única etapa de separación. Sin embargo, normalmente se prefiere usar más de una etapa de separación con el fin de seleccionar el candidato que tiene las propiedades deseadas de una biblioteca mayor. Por tanto, las anti-marcas recuperadas pueden mezclarse con la biblioteca inicial o un subconjunto de la misma y las etapas de separación (etapa ii)) y recuperación (etapa iii)) pueden repetirse un número deseado de veces. Opcionalmente, los restos monocatenarios en la mezcla pueden degradarse o eliminarse o inertizarse como se ha descrito anteriormente.

Generalmente, la biblioteca separada obtenida en la etapa ii) se somete a una o más etapas adicionales de puesta en contacto usando condiciones de rigurosidad creciente. Las condiciones de rigurosidad pueden aumentarse aumentando la temperatura, concentración de sales, acidez, alcalinidad, etc.

En una realización de la invención, la biblioteca separada no se somete a etapas de procedimiento intermedias antes de una etapa de puesta en contacto repetida. Especialmente, la biblioteca separada no se somete a amplificación intermedia de la anti-marca. Esta realización puede ser ventajosa cuando se usen bibliotecas relativamente pequeñas.

El procedimiento de la invención termina con una etapa de descodificación, que es una etapa en que la identidad de la entidad química o entidades es descifrada por un análisis de la anti-marca. Si la anti-marca es un oligonucleótido, la etapa de descodificación iv) puede realizarse por secuenciación de un nucleótido anti-marca. Diversos procedimientos para la secuenciación son evidentes para el experto, que incluyen el uso de clonación y exposición a una micromatriz. Las marcas contienen grupos de reconocimiento tales como, por ejemplo, secuencia(s) de nucleótidos, epítope(s), entre otros. Las marcas llevan información de la entidad a la que está unida tal como, por ejemplo, estructura de la entidad, masa, posición espacial (información de la placa), etc. Las marcas pueden estar compuestas por anticuerpos monoclonales, péptidos, proteínas, oligonucleótidos, ADN, ARN, LNA, PNA, péptidos naturales, péptidos no naturales, ácidos hidrazinoaril y alquilcarboxílicos poliméricos u oligoméricos, ácidos aminoxiaril y alquilcarboxílicos poliméricos u oligoméricos, peptoides, otros polímeros u oligómeros naturales, polímeros no naturales (peso molecular > 1000 Da) u oligómeros (peso molecular < 1000 Da), moléculas no poliméricas pequeñas (peso molecular < 1000 Da) o moléculas no poliméricas grandes (peso molecular > 1000 Da).

En una realización preferida, las entidades consisten en moléculas no poliméricas pequeñas (peso molecular < 1000 Da). Las moléculas pequeñas son generalmente los compuestos de interés en la búsqueda de candidatos orales a fármacos. Especialmente, moléculas pequeñas que no se producen en la naturaleza son de interés en el procedimiento de descubrimiento de fármacos y en un aspecto de la presente invención el procedimiento se diseña para seleccionar un candidato a fármaco oral. En el mercado está disponible una variedad de bibliotecas de candidatos a fármaco. Los candidatos a fármaco de la biblioteca comprenden normalmente un grupo reactivo o un grupo que puede alterarse en un grupo reactivo. En un aspecto preferido de la presente invención, cada uno de los miembros de la biblioteca de candidatos a fármaco se agrega a una marca de ácido nucleico mediante dicho grupo reactivo del miembro de biblioteca y un grupo reactivo en el ácido nucleico. Preferentemente, el ácido nucleico es un oligonucleótido.

En otro aspecto de la invención, entidades consisten en moléculas no poliméricas grandes (peso molecular > 1000 Da). En todavía otra realización, las entidades consisten en moléculas poliméricas.

Las marcas y las anti-marcas pueden estar compuestas por ARN ligado a anticuerpos monoclonales, proteínas, LNA, PNA, polipéptidos naturales, polipéptidos no naturales, ácidos hidrazinoaril o alquilcarboxílicos poliméricos u oligoméricos, ácidos aminoxiaril o alquilcarboxílicos poliméricos u oligoméricos, otros polímeros u oligómeros naturales, polímeros no naturales (peso molecular > 1000 Da) u oligómeros (peso molecular < 1000 Da), moléculas no poliméricas pequeñas (peso molecular < 1000 Da) o moléculas no poliméricas grandes (peso molecular > 1000 Da).

Alternativamente, las anti-marcas pueden estar compuestas por ADN ligado a anticuerpos monoclonales, proteínas, LNA, PNA, polipéptidos naturales, polipéptidos no naturales, ácidos hidrazinoaril o alquilcarboxílicos poliméricos u oligoméricos, ácidos aminoxiaril o alquilcarboxílicos poliméricos u oligoméricos, otros polímeros u oligómeros naturales, polímeros no naturales (peso molecular > 1000 Da) u oligómeros (peso molecular < 1000 Da), moléculas no poliméricas pequeñas (peso molecular < 1000 Da) o moléculas no poliméricas grandes (peso molecular > 1000 Da). Alternativamente, las anti-marcas están precisamente compuestas por oligonucleótidos, ADN o ARN. En una realización preferida, las anti-marcas están compuestas por ADN. En otra realización preferida, las anti-marcas están compuestas por ARN.

Las anti-marcas que están ligadas a ADN o ARN también están codificadas por el ADN/ARN ligado a ellas, por ejemplo, anticuerpos expresados en fago o expresados en polisoma, péptidos o proteínas, y mediante síntesis con molde de ADN de anti-marcas, en las que el ADN codifica la síntesis de la anti-marca, que está ligada a su ADN durante su síntesis.

Cada compuesto químico o grupo de compuestos puede asociarse a una marca mediante formación de un enlace covalente o no covalente. Para la formación de enlaces covalentes, el marcaje puede implicar, pero no se limita a, la formación de un producto de cicloadición, un producto de alquilación, un producto de arilación, un producto de acilación, un enlace amida, un enlace éster carboxílico, un enlace sulfonamida, un enlace disulfuro, un enlace S-alquilo, un enlace NR-alquilo, un enlace O-alquilo, un enlace arilo-vinilo, un enlace alquino-vinilo, un enlace oxima, un enlace imina, un producto bicíclico, un trizol, un hexeno, un derivado de 7-oxa-biciclo[2.2.1]hept-2-eno, un derivado de 7-aza-biciclo[2.2.1]hept-2-eno o un 7-metil-7-aza-biciclo[2.2.1]hept-2-eno. Los enlaces no covalentes pueden implicar, pero no se limitan a, unión mediante, por ejemplo, enlace de hidrógeno, interacciones de van der

Waals, apilamiento pi o mediante hibridación. La hibridación puede ser entre cadenas complementarias de ADN, ARN, PNA o LNA o mezclas de las mismas. En un caso tal, tanto la marca como el compuesto químico llevan una cadena tal complementaria entre sí. La entidad marcada, compuesto o mezcla de compuestos puede transformarse en una nueva entidad marcada, por ejemplo, por transformación de la entidad o por transformación de la marca. La transformación puede producirse por transformaciones tanto químicas como físicas tales como, por ejemplo, adición de reactivos (por ejemplo, agentes oxidantes o reductores, ajuste de pH, entre otros) o sometimiento a irradiación UV o calor.

El complejo entre marcas y anti-marcas puede formarse en entidades individualmente marcadas inmediatamente después del marcaje. Alternativamente, después de mezclar entidades individualmente marcadas, tanto antes de como después de usar opcionalmente la purificación de bibliotecas, o tanto antes de como después del enriquecimiento de bibliotecas para propiedades específicas.

Si las marcas y las anti-marcas están compuestas por nucleótidos, el complejo consiste en nucleótido bicatenario, por ejemplo, ADN dúplex o híbridos ADN/ARN.

El asa de purificación (denotada "@") puede conectarse a la anti-marca. El asa de purificación contiene grupo(s) de reconocimiento tal(es) como, por ejemplo, secuencia(s) de nucleótidos, epítopes, grupos reactivos, ligandos de alta afinidad, entre otros. Las asas de purificación pueden estar compuestas por anticuerpos monoclonales, péptidos, proteínas, ADN, ARN, LNA, PNA, péptidos naturales, péptidos no naturales, ácidos hidrazinoaril o alquilcarboxílicos poliméricos u oligoméricos, ácidos aminoxiaril o alquilcarboxílicos poliméricos u oligoméricos, otros polímeros u oligómeros naturales, polímeros no naturales (peso molecular > 1000 Da) u oligómeros (peso molecular < 1000 Da), moléculas no poliméricas pequeñas (peso molecular < 1000 Da) o moléculas no poliméricas grandes (peso molecular > 1000 Da). Las asas de purificación pueden ser, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos, biotina, estreptavidina, avidina, "marcas de His", grupos mercapto o grupos disulfuro/disulfuro activado. El asa de purificación puede ser parte de la anti-marca, por ejemplo, en el caso de que la anti-marca se base en nucleótidos o, por ejemplo, anticuerpos en los que parte del anticuerpo puede servir de epítope para otro anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo inmovilizado que sirve de filtro de purificación).

Los filtros de purificación contienen componentes que se asocian, interactúan o reaccionan con asas de purificación por lo que se forma un complejo. Este complejo permite la separación de entidades marcadas no complejadas y entidades marcadas complejadas. El filtro de purificación contiene grupo(s) de reconocimiento tal(es) como, por ejemplo, secuencia(s) de nucleótidos, epítopes, grupos reactivos, ligandos de alta afinidad, entre otros. El filtro de purificación puede estar compuesto por anticuerpos monoclonales, péptidos, proteínas, ADN, ARN, LNA, PNA, péptidos naturales, péptidos no naturales, ácidos hidrazinoaril o alquilcarboxílicos poliméricos u oligoméricos, ácidos aminoxiaril o alquilcarboxílicos poliméricos u oligoméricos, otros polímeros u oligómeros naturales, polímeros no naturales (peso molecular > 1000 Da) u oligómeros (peso molecular < 1000 Da), moléculas no poliméricas pequeñas (peso molecular < 1000 Da) o moléculas no poliméricas grandes (peso molecular > 1000 Da). Los filtros de purificación pueden ser, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos, biotina, estreptavidina, avidina, "marcas de His", grupos mercapto o grupos disulfuro/disulfuro activado.

La biblioteca se sonda y se enriquece para propiedades. Las propiedades pueden ser afinidad, actividad catalítica o capacidad de penetración de membranas, entre otras.

La amplificación puede usar técnicas de PCR o RT-PCR. Las anti-marcas son amplificables en algunos aspectos de la invención. Las anti-marcas pueden separarse de las marcas usando medios físicos o químicos tales como, por ejemplo, irradiación UV, calor, ajuste de pH, uso de disoluciones de sal, entre otras.

Las entidades marcadas aisladas pueden identificarse tanto mediante su marca como anti-marca. La identificación puede llevarse a cabo clonando anti-marcas y secuenciando su ADN/ARN o mediante análisis de masa de tanto entidades marcadas como anti-marcas o complejos de anti-marcas/entidades marcadas.

La biblioteca de entidades marcadas puede implicar $10\text{-}10^{20}$ ó $10\text{-}10^{14}$ ó $10\text{-}10^{2}$ ó $10\text{-}10^{3}$ ó $10^{2}\text{-}10^{3}$ ó $10^{2}\text{-}10^{4}$ ó $10^{3}\text{-}10^{8}$ ó $10^{3}\text{-}10^{8}$ ó $10^{3}\text{-}10^{10}$ ó $10^{3}\text{-}10^{14}$ ó $10^{5}\text{-}10^{6}$ ó $10^{5}\text{-}10^{8}$ ó $10^{5}\text{-}10^{10}$ ó $10^{5}\text{-}10^{14}$ ó $10^{8}\text{-}10^{14}$ ó $10^{14}\text{-}10^{20}$ entidades.

Los complejos de bibliotecas de entidades marcadas y anti-marcas pueden enriquecerse para propiedades antes de la purificación usando el asa de purificación y el filtro de purificación o después de la purificación. El término único, cuando se usa junto con secuencias de nucleótidos, implica que al menos una de las nucleobases y/o entidades de esqueleto de la secuencia no aparecen junto con diferentes entidades químicas. Preferentemente, una secuencia específica es única debido al hecho de que ninguna otra entidad química está asociada a la misma secuencia de nucleobases.

Una vez se ha formado la biblioteca debe cribarse la biblioteca para compuestos químicos que tienen características deseables predeterminadas. Las características deseables predeterminadas pueden incluir unión a una diana, cambiar catalíticamente la diana, hacer reaccionar químicamente con una diana de un modo que altere/modifique la diana o la actividad funcional de la diana, y unir covalentemente a la diana como en un inhibidor suicida.

La diana puede ser cualquier compuesto de interés. La diana puede ser una proteína, péptido, hidrato de carbono, polisacárido, glicoproteína, hormona, receptor, antígeno, anticuerpo, virus, sustrato, metabolito, análogo del estado de transición, cofactor, inhibidor, fármaco, colorante, nutriente, factor de crecimiento, célula, tejido, etc., sin limitación. Dianas particularmente preferidas incluyen, pero no se limitan a, enzima conversora de angiotensina, renina, ciclooxigenasa, 5-lipoxigenasa, enzima conversora de IIL-10, receptores de citocinas, receptor de PDGF, inosina monofosfato deshidrogenasa de tipo II, β-lactamasas y citocromo fúngico P-450. Las dianas pueden incluir, pero no se limitan a, bradiquinina, elastasa neutrófila, las proteínas del VIH, que incluyen *tat, rev, gag, inf,* RT, nucleocápside, etc., VEGF, bFGF, TGFβ, KGF, PDGF, trombina, teofilina, cafeína, sustancia P, IgE, sPLA2, glóbulos rojos, glioblastomas, coágulos de fibrina, PBMC, hCG, lectinas, selectinas, citocinas, ICP4, proteínas del complemento, etc.

Las condiciones de rigurosidad bajo las que se criba la biblioteca están normalmente limitadas a una condición tal que se mantenga la hibridación entre la marca identificadora y la anti-marca. Sin embargo, pueden aplicarse condiciones de alta rigurosidad, seguidas de una síntesis renovada o unión de la anti-marca. Las condiciones de cribado son conocidas para un experto en la materia.

Los compuestos químicos que tienen características deseables predeterminadas pueden separarse del resto de la biblioteca mientras que todavía estén unidos a una marca identificadora de ácidos nucleicos por diversos procedimientos conocidos para un experto en la materia. En una realización de la invención, los productos deseables se separaron de la biblioteca entera sin degradación química del ácido nucleico unido de forma que los ácidos nucleicos del identificador fueran amplificables. La marca identificadora puede entonces amplificarse, tanto todavía unida al compuesto químico deseable como después de la separación del compuesto químico deseable.

En la realización más preferida, el compuesto químico deseable actúa sobre la diana sin ninguna interacción entre la marca unida al compuesto químico deseable y la diana. En una realización, los compuestos químicos deseables se unen a la diana y el complejo marca unida-compuesto químico deseable-diana puede separarse de los productos sin unir por varios procedimientos. Los procedimientos incluyen unión a filtro de nitrocelulosa, cromatografía en columna, filtración, cromatografía de afinidad, centrifugación, y otros procedimientos muy conocidos.

Brevemente, la biblioteca se somete a la etapa de separación, que puede incluir contacto entre la biblioteca y una columna sobre la que está unida la diana. Todas las marcas que no han formado productos de hibridación con un agregado de entidad química-marca o aquellas marcas asociadas a entidades químicas no deseables pasarán por la columna. Las entidades químicas no deseables adicionales (por ejemplo, entidades que reaccionan de forma cruzada con otras dianas) pueden eliminarse por procedimientos de contraselección. Los complejos deseables están unidos a la columna y pueden eluirse cambiando las condiciones de la columna (por ejemplo, sal, etc.), o la marca asociada al compuesto químico deseable puede separase por escisión y eluirse directamente.

Adicionalmente, los compuestos químicos que reaccionan con una diana pueden separarse de aquellos productos que no reaccionan con la diana. En un ejemplo, un compuesto químico que se une covalentemente con la diana (tal como un inhibidor suicida) puede lavarse bajo condiciones muy rigurosas. El complejo resultante puede entonces tratarse con proteinasa, ADNsa u otros reactivos adecuados para escindir un ligador y liberar los ácidos nucleicos que están asociados al compuesto químico deseable. Los ácidos nucleicos liberados pueden amplificarse.

En otro ejemplo, la característica deseable predeterminada del producto deseable es la capacidad del producto para transferir un grupo químico (tal como la transferencia de acilo) a la diana y así inactivar la diana. Podría tenerse una biblioteca de productos en la que todos los productos tuvieran un grupo químico tioéster. Tras el contacto con la diana, los productos deseables transferirán el grupo químico a la diana cambiando concomitantemente el producto deseable de un tioéster a un tiol. Por tanto, un procedimiento de separación que identificaría productos que son ahora tioles (en vez de tioésteres) permitirá la selección de los productos deseables y la amplificación del ácido nucleico asociado a los mismos.

Hay otros procedimientos de separación y cribado que son compatibles con la presente invención que son conocidos para un experto en la materia. En una realización, los productos pueden fraccionarse por varios procedimientos comunes y luego cada fracción se ensaya luego para actividad. Los procedimientos de fraccionamiento pueden incluir tamaño, pH, hidrofobia, etc.

Inherente al presente procedimiento es la selección de entidades químicas basándose en una función deseada; esto puede extenderse a la selección de moléculas pequeñas con una función y especificidad deseada. La especificidad puede requerirse durante el procedimiento de selección extrayendo primero secuencias identificadoras de compuestos químicos que puedan interactuar con una “diana” no deseada (selección negativa, o contraselección), seguido de selección positiva con la diana deseada. Como ejemplo, los inhibidores de citocromo fúngico P-450 son conocidos por reaccionar de forma cruzada hasta cierto grado con citocromo de mamífero P-450 (produciendo graves efectos secundarios). Los inhibidores altamente específicos del citocromo fúngico podrían seleccionarse de una biblioteca eliminando primero aquellos productos que pudieran interactuar con el citocromo de mamífero, seguido de retención de los productos restantes que pueden interactuar con el citocromo fúngico.

Tras el procedimiento de selección, las anti-marcas se recuperan. La recuperación puede realizarse sometiendo los complejos seleccionados a condiciones de rigurosidad que desprenderán las secuencias de anti-marca de la marca identificadora. En el caso de que la marca y la anti-marca sean ácidos nucleicos, las condiciones de rigurosidad pueden aumentarse aumentando la temperatura gradualmente hasta que las dos cadenas de la doble hélice se separen por fusión. Pueden proporcionarse otras copias de secuencias de anti-marca por extensión de las secuencias identificadoras usando un cebador adecuado y una polimerasa. Provisionalmente, la secuencia de anti-marca recuperada y/o la secuencia de la marca identificadora pueden someterse a PCR para formar un producto bicatenario. Las cadenas que comprenden la secuencia que complementa al menos una parte de una única secuencia identificadora se aíslan posteriormente.

La entidad química seleccionada puede unirse a la diana durante la extensión o amplificación o puede desprenderse de la diana. En un aspecto de la invención se prefiere que la diana se inmovilice y que el compuesto químico permanezca unido a la diana durante la extensión o amplificación para permitir la fácil recuperación del producto de extensión o amplificación por simple elución. En otro aspecto, las entidades químicas seleccionadas se separan de la únicas secuencias identificadoras, antes de, simultáneamente con o posterior a la recuperación de las secuencias de enriquecimiento.

Con el fin de recuperar las secuencias de anti-marca deseadas puede ser apropiado proporcionar las secuencias de anti-marca nativas, además de las amplificadas, si están presentes, con una parte de un par de afinidad molecular. La parte de un par de afinidad molecular también se denomina en este documento asa. Las anti-marcas pueden entonces recuperarse usando la otra parte del par de afinidad molecular unido a una fase sólida, que es posible aislar. La propiedad esencial del par de afinidad molecular es que las dos partes pueden interactuar con el fin de ensamblar el par de afinidad molecular. En el campo biotecnológico se conoce una variedad de partes moleculares interactuantes que pueden usarse como par de afinidad molecular. Ejemplos incluyen, pero no limitan a, interacciones proteína-proteína, interacciones proteína-polisacárido, interacciones ARN-proteína, interacciones ADN-ADN, interacciones ADN-ARN, interacciones ARN-ARN, interacciones biotina-estreptavidina, interacciones enzima-ligando, interacción anticuerpo-ligando, interacción proteína-ligando, etc.

Un par de afinidad molecular adecuado es biotina-estreptavidina. Las secuencias de anti-marca pueden proporcionarse con biotina, por ejemplo, usando un cebador unido a un resto de biotina en la etapa de amplificación o extensión y poniendo en contacto la secuencia de anti-marca marcada con biotina con perlas recubiertas con estreptavidina.

Después de la recuperación de la secuencias de anti-marca, éstas se ponen en contacto con la biblioteca inicial o una fracción de la misma y se permite que se forme una biblioteca enriquecida por la hibridación de la secuencias de anti-marca con la secuencia relacionada de la única marca identificadora.

El procedimiento según la invención puede repetirse una o más veces. En una segunda ronda del procedimiento, la parte de la biblioteca monocatenaria no reconocida por una secuencia de anti-marca puede aclararse de los medios de reacción o la parte restante de la biblioteca monocatenaria puede permanecer en la mezcla con la biblioteca enriquecida. En general, no es necesario separar la parte restante de la biblioteca monocatenaria de los medios antes de que la biblioteca bicatenaria enriquecida se someta a un segundo contacto con la diana debido a que las condiciones para la función preseleccionada son normalmente más rigurosas que la primera ronda, por lo que los miembros de la biblioteca monocatenaria supuestamente no se unirán a la diana. Sin embargo, para reducir el ruido del sistema, en algunos casos puede ser útil retirar de los medios los miembros de la biblioteca inicial monocatenaria no apareados con una secuencia de anti-marca. Si las secuencias de anti-marca se proporcionan con una parte de un par de afinidad molecular, como biotina, los compuestos químicos de interés pueden extraerse de los medios mediante tratamiento con estreptavidina inmovilizada, por ejemplo, perlas recubiertas con estreptavidina.

Como se ha mencionado anteriormente, las condiciones para realizar la segunda etapa de selección u otra son generalmente más rigurosas que en la primera etapa o precedente. El aumento de las condiciones de rigurosidad en rondas de selección secuenciales proporciona la formación de una sub-biblioteca de compuestos químicos que es limitada con respecto al número, pero enriquecida con respecto a la propiedad deseada.

En la presente descripción con reivindicaciones, los términos ácido nucleico, oligonucleótido y nucleótidos se usan frecuentemente. Los términos nucleótido, monómero de nucleótido o mononucleótidos se usan para denotar un compuesto normalmente compuesto por dos partes, concretamente un resto de nucleobase y un esqueleto. El esqueleto puede subdividirse en algunos casos en un resto de azúcar y un ligador internucleosídico. Los mononucleótidos pueden ligarse entre sí para formar un oligonucleótido. Normalmente, los mononucleótidos están ligados mediante un enlace internucleosídico. El término ácido nucleico cubre mononucleótidos, además de oligonucleótidos. Normalmente, sin embargo, el término denota un oligonucleótido que tiene de 2 a 30 mononucleótidos ligados juntos mediante ligadores internucleosídicos.

Determinación de la parte codificante del complejo bifuncional

La parte codificante de la secuencia identificadora presente en las moléculas bifuncionales aisladas o de los oligonucleótidos identificadores separados se determina para identificar las entidades químicas que participaron en la formación de la molécula de presentación. El procedimiento de síntesis de la molécula de presentación puede establecer si la información sobre las entidades funcionales, además del momento de tiempo en el que se han incorporado en la molécula de presentación, puede deducirse del oligonucleótido identificador. Puede ser suficiente conseguir información sobre la estructura química de las diversas entidades químicas que han participado en la molécula de presentación para deducir la molécula completa debido a limitaciones estructurales durante la formación. Como ejemplo, el uso de diferentes tipos de químicas de unión puede garantizan que una entidad química en un bloque constructivo pueda sólo transferirse a una única posición en un andamiaje. Pueden estar presentes otro tipo de limitaciones químicas debido al impedimento estérico en la molécula de andamiaje o la entidad funcional que va a transferirse. Sin embargo, en general, se prefiere que la información pueda deducirse de la secuencia identificadora que permite la identificación de cada una de las entidades químicas que han participado en la formación de la molécula codificada junto con el momento en el tiempo en la historia de síntesis en el que se han incorporado las entidades químicas en la molécula de presentación (naciente).

Aunque los procedimientos de secuenciación de ADN convencionales están fácilmente disponibles y son útiles para esta determinación, la cantidad y la calidad de la molécula bifuncional aislada puede requerir manipulaciones adicionales antes de una reacción de secuenciación.

Si la cantidad es baja, se prefiere aumentar la cantidad de la secuencia identificadora por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores de PCR dirigidos a sitios de unión a cebadores presentes en la secuencia identificadora.

Además, la calidad de la molécula bifuncional aislada puede ser de forma que múltiples especies de moléculas bifuncionales se coaíslen en virtud de capacidades similares para unirse a la diana. En los casos en los que se aísla más de una especie de molécula bifuncional, las diferentes especies aisladas deben separarse antes de la secuenciación del oligonucleótido identificador.

Por tanto, en una realización, las secuencias identificadoras diferentes de los complejos bifuncionales aislados se clonan en vectores de secuenciación separados antes de determinar su secuencia por procedimientos de secuenciación de ADN. Esto se realiza normalmente amplificando todas las secuencias identificadoras diferentes por PCR como se describe en este documento, y luego usando un único sitio de endonucleasa de restricción en el producto amplificado para clonar direccionalmente los fragmentos amplificados en vectores de secuenciación. Entonces, la clonación y la secuenciación de los fragmentos amplificados es un procedimiento rutinario que puede llevarse a cabo por distintos procedimientos de biología molecular conocidos en la técnica.

Alternativamente, el complejo bifuncional o la secuencia identificadora amplificada por PCR pueden analizarse en una micromatriz. La matriz puede diseñarse para analizar la presencia de un único codón o múltiples codones en una secuencia identificadora.

Síntesis de ácidos nucleicos

Los oligonucleótidos pueden sintetizarse mediante una variedad de químicas como es muy conocido. Para la síntesis de un oligonucleótido en un sustrato en la dirección de 3' a 5' se requiere un extremo hidroxi libre que pueda bloquearse y desbloquearse convenientemente según se necesite. Un grupo de bloqueo del extremo hidroxi preferido es un éter de dimetoxitritilo (DMT). Los extremos bloqueados con DMT se desbloquean primero, tal como mediante tratamiento con 3% de ácido dicloroacético en diclorometano (DCM) como es muy conocido para la síntesis de oligonucleótidos, para formar un extremo hidroxi libre.

Los nucleótidos en forma de precursor para la adición a un extremo hidroxi libre en la dirección de 3' a 5' requieren un resto de fosforamidato que tenga una cadena lateral de aminodiisopropilo en el extremo 3' de un nucleótido. Además, el hidroxi libre del fosforamidato se bloquea con un éster cianoetílico (OCNET) y el extremo 5' se bloquea con un éter de DMT. La adición de un nucleótido de fosforamidato bloqueado con DMT en 5', OCNET en 3' a un hidroxilo libre requiere tetrazol en acetonitrilo seguido de oxidación con yodo y tapado de hidroxilos sin reaccionar con anhídrido acético, como es muy conocido para la síntesis de oligonucleótidos. El producto resultante contiene un residuo de nucleótido añadido con un extremo 5' bloqueado con DMT, listo para el desbloqueo y la adición de un nucleótido bloqueado posterior como antes.

Para la síntesis de un oligonucleótido en la dirección de 5' a 3' se requiere un extremo hidroxi libre en el ligador como antes. Sin embargo, el nucleótido bloqueado que va a añadirse tiene las químicas de bloqueo invertidas en sus extremos 5' y 3' para facilitar la adición en la orientación opuesta. Un nucleótido con un hidroxilo en 3' libre y éter de DMT en 5' se bloquea primero en el extremo hidroxi 3' mediante reacción con TBS-CI en imidazol para formar un éster de TBS en el extremo 3'. Entonces, el extremo 5' bloqueado con DMT se desbloquea con DCA en DCM como antes para formar un extremo hidroxi 5' libre. El reactivo cloruro de (N,N-diisopropilamino)(cianoetil)fosfonamídico que tiene un grupo aminodiisopropilo y un éster de OCNET se hace reaccionar en tetrahidrofurano (THF) con el nucleótido desbloqueado de 5' para formar el grupo fosfonamidato bloqueado con aminodiisopropilo, OCNET en el

extremo 5'. Después, el éster de TBS de 3' se elimina con fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) en DCM para formar un nucleótido con el extremo 5' bloqueado en fosfonamidato y un extremo hidroxi 3' libre. La reacción en base con DMT-Cl añade un grupo de bloqueo de éter de DMT al extremo hidroxi 3'.

Entonces, la adición del nucleótido fosfonamidado bloqueado con DMT en 3', OCNET en 5', a un sustrato de ligador que tiene un extremo hidroxi libre sigue usando la reacción de tetrazol previa como es muy conocido para la polimerización de oligonucleótidos. El producto resultante contiene un residuo de nucleótido añadido con un extremo 3' bloqueado con DMT listo para desbloquear con DCA en DCM y la adición de un nucleótido bloqueado posterior como antes.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra los componentes del identificador y el bloque constructivo
La Fig. 2 muestra el principio de codificación por extensión
La Fig. 3 muestra la región de extensión del bloque constructivo
La Fig. 4 muestra los componentes del identificador y el bloque constructivo con codones internos
La Fig. 5 muestra el principio de codificación por extensión con hibridación específica
La Fig. 6 muestra la codificación de moléculas con andamiaje y poliméricas
La Fig. 7 muestra la codificación por extensión usando el principio de ensamblaje de tres cadenas
La Fig. 8 muestra la codificación por extensión usando el principio de ensamblaje de tres cadenas con hibridación específica
La Fig. 9 muestra la síntesis de moléculas presentadas a identificador de tres cadenas usando un enfoque de fase sólida.
La Fig. 10 muestra la reacción/extensión secuencial usando ensamblaje de plataformas.
La Fig. 11 desvela un esquema general para alternar la síntesis en paralelo de una biblioteca combinatoria.
La Fig. 12 desvela un procedimiento de codificación usando codificación por ligación y un reactivo libre.
La Fig. 13 desvela un procedimiento de generación de bibliotecas en el que una reacción va seguida de una etapa de codificación.
La Fig. 14 desvela un procedimiento de generación de bibliotecas usando codificación por polimerasa.
La Fig. 15 desvela diversas realizaciones para procedimientos de codificación única.
La Fig. 16 desvela un procedimiento de codificación doble.
La Fig. 17 desvela diversos procedimientos de codificación doble.
La Fig. 18 desvela la codificación usando un bloque constructivo de bucle.
La Fig. 19 desvela un procedimiento en el que un ligador flexible se usa en el bloque constructivo.
La Fig. 20 desvela un gel que muestra el resultado de un experimento según el Ejemplo 6.
La Fig. 21 desvela un procedimiento de codificación triple.
La Fig. 22 muestra el sistema usado en el Ejemplo 9.
La Fig. 23 muestra la estructura de división y mezcla usada en el Ejemplo 9.
La Fig. 24 desvela una realización de enriquecimiento, amplificación e identificación de bibliotecas.
La Fig. 25 muestra una realización en la que secuencias de anti-marca no hibridadas con una secuencia identificadora se hacen bicatenarias y, por tanto, inertes.
La Fig. 26 muestra una realización en la que una etapa de enriquecimiento es antes de la etapa de purificación.
La Fig. 27 muestra un principio general de enriquecimiento, amplificación e identificación de bibliotecas.
La Fig. 28 muestra un principio general de enriquecimiento, amplificación e identificación de bibliotecas que omiten la etapa de amplificación intermedia entre los procedimientos de enriquecimiento posteriores.
La Fig. 29 muestra un principio general de enriquecimiento, amplificación e identificación de bibliotecas en el que la biblioteca monocatenaria inicial se hace bicatenaria antes del enriquecimiento.
La Fig. 30 muestra un principio general para el enriquecimiento de bibliotecas, en el que la anti-marca no se forma hasta después del uno y más procedimientos de enriquecimiento.
La Fig. 31 muestra dos geles informados en el Ejemplo 13.
La Fig. 32 muestra el resultado del experimento informado en el Ejemplo 14.
La Fig. 33 muestra el resultado del experimento informado en el Ejemplo 14.

Descripción detallada de las figuras

La Fig. 1 desvela en el panel A un producto de hibridación entre un complejo bifuncional naciente y un bloque constructivo. El complejo bifuncional naciente, para abreviar el identificador, comprende una entidad de unión conectada a una región identificadora de oligonucleótidos por un resto de ligador. La entidad de unión puede ser un único grupo reactivo receptor que se ha adaptado para recibir una entidad funcional o puede ser una estructura de andamiaje que comprende uno o más grupos reactivos receptores. En el panel A, la entidad de unión se indica como un andamiaje que tiene cuatro grupos reactivos que pueden recibir entidades funcionales.

El bloque constructivo comprende una entidad funcional unida a un oligonucleótido que es suficientemente complementario a la región identificadora para permitir que se forme un producto de hibridación. La entidad funcional puede transferirse a la entidad de unión mediante una reacción química. La región identificadora complementaria comprende además un único codón en el extremo 3' ó 5' de la misma. El único codón identifica la entidad funcional

de una forma inequívoca.

Tras la formación del producto de hibridación entre el identificador y el bloque constructivo, la entidad funcional y el anti-codón único se transfieren al identificador. En un aspecto de la invención, el ligador que conecta la entidad funcional y la región identificadora complementaria se escinde simultáneamente con la reacción con la entidad de unión produciendo una transferencia de la entidad funcional a la entidad de unión. La transcripción del codón se produce antes de, simultáneamente con o posterior a la transferencia. La transcripción se realiza por una enzima que puede polimerizar u oligomerizar oligonucleótidos usando un oligonucleótido molde para formar una cadena complementaria. Normalmente una polimerasa, tal como la polimerasa Pfu, se usa junto con dNTP adecuados, es decir, una mezcla de ATP, CTP, GTP y TTP, para formar el único codón como extensión de la cadena del identificador usando el anti-codón único del bloque constructivo como molde.

La Fig. 1, panel B, ilustra un sistema típico para una segunda transferencia de entidad funcional. El identificador se ha provisto de una primera entidad funcional y se ha extendido por un codón. Además, el codón también comprende una región de unión como extensión del codón. La región de unión es normalmente una región constante transferida al identificador en el primer ciclo de transferencia por el primer bloque constructivo. El identificador forma un producto de hibridación con un segundo bloque constructivo. El segundo bloque constructivo comprende una segunda entidad funcional conectada a un oligonucleótido suficiente complementario a la región identificadora del identificador para permitir una hibridación. Una parte de la región identificadora complementaria comprende una región no codificante y una región que complementa la región de unión. La región no codificante se opone al codón transferido en el primer ciclo y la región de unión complementaria es complementaria a la región de unión para permitir una hibridación que es suficientemente fuerte para que una enzima se una a la hélice. Un segundo anti-codón único está unido a la región de unión complementaria e identifica la segunda entidad funcional. El segundo codón se transfiere al identificador usando el segundo anti-codón como molde del mismo modo como se ha descrito anteriormente para el primer codón.

La Fig. 2 ilustra cuatro ciclos de transferencia de la entidad funcional y el codón. En el primer ciclo se forma un producto de hibridación entre el identificador y el bloque constructivo. El producto de hibridación garantiza que la entidad funcional y el andamiaje se pongan en estrecha proximidad espacial, aumentando así la probabilidad de que tenga lugar una reacción. La formación de un dúplex entre los dos oligonucleótidos también proporciona una región de unión para una polimerasa. En presencia de una polimerasa, una mezcla de dNTP y un tampón adecuado tal como una disolución acuosa que contiene HEPES-KOH 20 mM, KCl 40 mM y $MgCl_2$ 8 mM y un pH ajustado a 7,4, el anti-codón único (UA_1) se transfiere al identificador como un codón.

Después de la transferencia de la entidad funcional y el codón, respectivamente, el bloque constructivo gastado se separa del identificador aumentando la rigurosidad. Normalmente, la rigurosidad se aumenta por un aumento de la temperatura, cambio del pH o aumentando la fuerza iónica. Después de la rotura de la estructura de doble hélice, el identificador se recupera. En un aspecto de la invención, el identificador se inmoviliza para facilitar la separación del bloque constructivo gastado. En otro aspecto, el bloque constructivo gastado se degrada químicamente o enzimáticamente. Tras la recuperación del identificador puede iniciarse un nuevo ciclo poniendo en contacto el identificador con otro bloque constructivo.

El producto final después de cuatro ciclos de transferencia es un complejo bifuncional que comprende un producto de reacción en un extremo y una región codificante en el otro. El producto de reacción comprende constituyentes de las entidades funcionales transferidas y el andamiaje inicial. La región codificante comprende un código genético sobre qué entidades se han transferido en qué orden. Por tanto, la historia sintética puede descodificarse de la región codificante.

La Fig. 3 muestra ejemplos del diseño del área codificante. El panel A representa una vista detallada de un ejemplo de un diseño según la Fig. 1, panel B. Al único codón transferido en un primer ciclo se opone una región de desapareamiento parcial. Para compensar la disminución en la afinidad, una región de unión sigue al codón. A la región de unión se opone una región de unión complementaria de apareamiento del bloque constructivo.

En la Fig. 3, panel B, al único codón incorporado en un primer ciclo se opone un segundo bloque constructivo que tiene incorporado en la región identificadora complementaria una región de unión neutra. La región de unión neutra no puede discriminar entre variedades de codones únicos, pero puede mostrar algún tipo de afinidad hacia cada uno de los codones. Normalmente, la región de unión neutra comprende una o más bases universales y más preferido la región de unión neutra comprende una secuencia de bases universales que se oponen a al menos una parte de la región de codón en el identificador.

La Fig. 4 muestra un producto de hibridación entre un identificador y un bloque constructivo en el que el identificador tiene codones internos y el bloque constructivo tiene anti-codones correspondientes. La región identificadora y la región identificadora complementaria también pueden contener codones únicos específicos y anti-codones, respectivamente.

El uso de codones internos es de particular importancia cuando se esperan varias rondas de selección,

especialmente cuando la molécula codificada se forme a partir de un producto de PCR de una ronda previa. Los anti-codones internos en el bloque constructivo pueden aparearse completamente o parcialmente con la secuencia identificadora o pueden comprender una o más bases universales para proporcionar afinidad, pero no para especificidad. La función de los codones únicos internos es sólo guiar la hibridación entre la molécula identificadora y la molécula del bloque constructivo. La codificación correcta se ocupa de los únicos codones que son creados en el procedimiento de extensión. Estos únicos codones pasan a la siguiente generación de moléculas y se usan para descodificar la historia sintética de las moléculas presentadas. Este sistema no dependerá totalmente de una función codificante precisa por los únicos codones internos con el fin de pasar el genotipo correcto a la siguiente generación de moléculas identificadoras.

En el panel A, el producto de hibridación proporciona una proximidad espacial entre la entidad funcional y la entidad de unión, aumentando así la probabilidad de que se produzca una reacción. El único codón hace de molde para el codón en la secuencia identificadora por una reacción de extensión enzimática. En el panel B, una región de unión se introduce entre cada secuencia codificante única para proporcionar afinidad de las dos cadenas entre sí aún cuando aparezcan una o más bases de desapareamiento en el codón:dominio no codificante de un codón previamente usado.

La Fig. 5 muestra una realización útil cuando una etapa de amplificación participa entre selecciones. Inicialmente, una biblioteca de complejos se produce como se representa en la Fig. 2. La biblioteca de los complejos puede someterse a un procedimiento de selección. El procedimiento de selección puede implicar presentar la molécula de presentación en el complejo a una diana y posteriormente seleccionar las moléculas de presentación que muestran una interacción deseada con la diana. Puede ser ventajoso usar condiciones relativamente suaves durante el procedimiento de selección para obtener una sub-biblioteca. La sub-biblioteca puede descodificarse para obtener información sobre la historia sintética para toda la sub-biblioteca. Sin embargo, normalmente se prefiere reducir la sub-biblioteca antes de realizar una descodificación.

La sub-biblioteca puede reducirse sometiéndola de nuevo a la diana y usando condiciones más rigurosas. Sin embargo, para obtener un mayor número de cada uno de los miembros de la sub-biblioteca antes de una segunda selección, generalmente se prefiere amplificar el complejo. Por tanto, un cebador que se carga con un andamiaje se hibrida inicialmente con un sitio de cebador en un extremo de la región codificante. Posteriormente se forma un transcrito. Un cebador inverso se presenta preferentemente para obtener un producto de PCR bicatenario que tiene un andamiaje unido al mismo.

Esta PCR es la base para la generación de una amplificación de la sub-biblioteca. La secuencia identificadora es segregada en varios codones únicos internos, abreviados IUC en el dibujo. El número de IUC se corresponde con el número de entidades funcionales que participan en la formación de la molécula de presentación. La secuencia de los IUC expresa la identidad de las entidades funcionales individuales y el orden de los IUC indica el orden de reacción de las entidades funcionales. Preferentemente, una región de cebador se presenta adyacente a la secuencia de IUC para permitir una posterior amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos.

La sub-biblioteca se pone en contacto con una pluralidad de bloques constructivos que comprenden una entidad funcional transferible y un anti-codón único interno (IUA) complementario a al menos uno de los IUC. La región identificadora complementaria está provista de suficiente complementariedad para proporcionar una hibridación con la región identificadora de oligonucleótidos. En una realización preferida, los IUC que no identifican una entidad funcional que va a transferirse se oponen en la región identificadora complementaria con una región de unión neutra. Como se ha mencionado anteriormente, la región de unión neutra puede comprender bases universales, es decir, bases que tienen la capacidad de aparearse con dos o más de las nucleobases que se producen naturalmente. Adyacente a la región que comprende secuencias de apareamiento de bases específicas y secuencias de apareamiento de bases no específicas, es decir, la región identificadora complementaria, hay un anti-codón único (UA). El UA comprende la misma información que el IUA de la región identificadora complementaria, normalmente el UA y el IUA tienen la misma secuencia en los nucleótidos.

La etapa de transferencia y la etapa de reacción se realizan en varios ciclos como se ha descrito anteriormente para formar un complejo bifuncional. En la Fig. 5 se realizan cuatro ciclos, sin embargo, se apreciará que pueden realizarse menos ciclos, tales como 3 ó 2 ciclos, para producir un producto de reacción que comprende constituyentes de 3 ó 2 entidades funcionales, respectivamente. También pueden realizarse más de cuatro ciclos, tal como 5 a 20, para formar una biblioteca de moléculas de presentación más diversa. Los complejos resultantes de los ciclos son un producto de reacción entre las entidades funcionales y el andamiaje, y un oligonucleótido. El oligonucleótido puede dividirse en una región de guiado, es decir, la región que guía la hibridación de los bloques constructivos individuales, y una región codificante que comprende los únicos codones que se han transferido de los bloques constructivos al identificador.

El uso del procedimiento de codificación anterior permite la amplificación de cada vez más sub-bibliotecas para obtener una cantidad suficiente de material para permitir la descodificación.

El procedimiento de descodificación mostrado en la Fig. 6 puede crear tanto moléculas codificadas monoméricas

como poliméricas. Panel A: Pueden crearse productos de reacción complejos usando una entidad de unión que ha reaccionado con múltiples entidades funcionales. Panel B: Pueden crearse polímeros usando una entidad de unión con un grupo reactivo que permite la unión con una entidad funcional que tiene al menos dos grupos reactivos.

La Fig. 7 ilustra un procedimiento de ensamblaje de tres cadenas para la codificación por el principio de extensión. A: El identificador y el bloque constructivo pueden ensamblarse en una plataforma de ensamblaje. Esta plataforma de ensamblaje contiene una región del anti-codón único y un anti-codón único en la que estos dos elementos están directamente ligados mediante sus secuencias. Puede haber una región de conexión que liga la región del anti-codón único junto con la región identificadora complementaria. B: Describe todos los componentes del identificador, bloque constructivo y la plataforma de ensamblaje usados en la reacción consecutiva en la que el identificador también contiene un único codón y una región de unión y la plataforma de ensamblaje también contiene una región no codificante y una región de unión complementaria.

En la Fig. 8 se muestra que también pueden usarse codones internos para el principio de ensamblaje de tres cadenas. Esto será útil cuando la selección se realice en múltiples rondas con etapas de amplificación intermedias.

La Fig. 9 muestra una síntesis de moléculas presentadas de tres cadenas en fase sólida. La molécula de plataforma de ensamblaje está unida a un soporte sólido para permitir la unión secuencial de bloques constructivos a la entidad de unión. En cada etapa pueden usarse diferentes bibliotecas de moléculas de plataforma de ensamblaje, que se extiende con regiones no codificantes adecuadas y regiones de unión complementarias, en viales separados. Esto permitirá el uso de moléculas de bloque constructivo e identificadoras idénticas en cada etapa.

La Fig. 10 muestra la transferencia/extensión secuencial usando el principio de la plataforma de ensamblaje. Cada pocillo contiene una biblioteca de moléculas de plataforma. La molécula de plataforma se extiende con un anti-codón único en los pocillos posteriores. Una biblioteca de molécula identificadora y de bloque constructivo se añade al primer pocillo que permite la hibridación específica y la transferencia de entidades funcionales. La mezcla de reacción es la transferida a los siguientes pocillos que finalmente genera la biblioteca presentada a identificador.

La Fig. 11 desvela un esquema general para alternar síntesis paralela de bibliotecas combinatorias. En una primera etapa se proporciona una molécula bifuncional naciente. La molécula bifuncional naciente comprende como parte de la molécula un grupo reactivo que puede aparecer en un andamiaje químico, y algunas veces se denomina en este documento sitio reactivo químico. Otra parte de la molécula bifuncional comprende un sitio de cebado para la adición de una marca. El sitio de cebado puede ser un grupo 3'-OH o un grupo 5'-fosfato de un nucleótido en el caso de que la marca sea un nucleótido. El sitio reactivo químico y el sitio de cebado pueden espaciarse opcionalmente por un grupo de enlace. En el supuesto caso de que el grupo de enlace esté presente, puede ser un nucleótido o una secuencia de nucleótidos. La entidad del espaciador puede comprender adicionalmente un ligador hidrófilo, tal como un polietileno o polipropileno, para distanciar el sitio reactivo químico del nucleótido. En el resto de enlace también puede estar comprendido un ligador escindible selectivo que permite que el investigador separe la molécula de presentación de la parte codificante.

La molécula bifuncional naciente se divide en una pluralidad de compartimentos, normalmente pocillos de una placa de microtitulación o equipo similar que permite la fácil manipulación de múltiples recipientes espacialmente separados. Cada uno de los compartimentos se hace reaccionar con un fragmento de molécula pequeña específico, también denominado en este documento reactivo. Por tanto, en un primer compartimento, la molécula bifuncional naciente se hace reaccionar con un primer fragmento de molécula pequeña (F_1); en un segundo compartimento, la molécula bifuncional naciente se hace reaccionar con un segundo fragmento de molécula pequeña (F_2), etc. El número de compartimentos puede ser en principio infinito; sin embargo, por motivos prácticos, el número está normalmente entre 5 y 5000, tal como 10 y 500. En cada uno de los compartimentos, los fragmentos de moléculas pequeñas pueden ser idénticos o diferentes según lo requiera el caso. En cada compartimento, uno, dos o más reactivos puede participar en la reacción. Después de producirse la reacción entre el fragmento de fármaco y la molécula bifuncional naciente en cada compartimento se añade una marca, identificando dicha marca el fragmento de molécula pequeña. En ciertos aspectos de la invención, la marca es un ácido nucleico. Por tanto, en el primer compartimento, una primera marca de ácido nucleico (T_1) se añade al sitio de cebado del producto de reacción, en el segundo compartimento, una segunda marca de ácido nucleico (T_2) se añade al sitio de cebado del segundo producto de reacción, etc. Se contemplan diversos procedimientos para la codificación enzimática y se tratan en este documento. Tras la adición enzimática de las marcas a cada uno de los compartimentos, el contenido de los compartimentos se reúne.

En una segunda ronda, la mezcla de moléculas bifuncionales se divide de nuevo en compartimentos. El número de compartimentos de la segunda ronda no necesita ser el mismo que el número de compartimentos en la primera ronda. En cada compartimento, los productos de la ronda previa sirven de molécula bifuncional naciente. Por tanto, un grupo reactivo que aparece en el producto de reacción entre el andamiaje y el fragmento de molécula pequeña de la primera ronda se hace reaccionar con uno o más fragmentos de moléculas pequeñas de la segunda ronda. Por tanto, en un primer compartimento, los productos de reacción mixtos de la primera ronda se hacen reaccionar con un primer fragmento de molécula pequeña (F_1), en un segundo compartimento, los productos de reacción mixtos de la primera ronda se hacen reaccionar con un segundo fragmento de molécula pequeña (F_2), etc. Los fragmentos de

moléculas pequeñas F_1, F_2, ... F_x de la segunda ronda puede ser idénticos o diferentes de los fragmentos de moléculas pequeñas usados en la primera ronda.

Después de permitir que se produzcan las reacciones se añade una marca que especifica el fragmento de molécula pequeña. La marca añadida en la primera ronda comprende normalmente un sitio de cebado que puede usarse para la adición de la marca en la segunda ronda de manera que se produzca un identificador lineal que comprende las marcas. En el primer compartimento, el producto reaccionado se añade a una primera marca que identifica el reactivo de la segunda ronda que ha reaccionado con el sitio de reacción reactivo de la molécula bifuncional naciente; en un segundo compartimento, el producto reaccionado con el segundo fragmento de molécula pequeña de la segunda ronda se añade a la marca que identifica dicho reactivo, etc. Tras la adición de las marcas a cada compartimento, el contenido de los compartimentos se mezcla en un conjunto común. El ciclo de división-reacción-combinación puede repetirse un número de veces apropiado para obtener una biblioteca de moléculas bifuncionales que comprende una parte de molécula de presentación y una parte codificante. La biblioteca puede usarse en un procedimiento de selección desvelado en cualquier parte en este documento.

Anteriormente se ha desvelado el principio general para la división y la mezcla en el que la reacción del fragmento de molécula pequeña y el sitio de reacción química se produce antes de la etapa de codificación. Obviamente, los acontecimientos pueden producirse en el orden inverso o simultáneamente.

La Fig. 12 muestra esquemáticamente una placa de microtitulación de 96 pocillos a la izquierda. El procedimiento se produce a la derecha en cada pocillo o en un número de pocillos seleccionados. Inicialmente se proporciona una molécula bifuncional. La molécula bifuncional comprende un sitio de reacción química (óvalo) unido a un codón (rectángulo) mediante un ligador (línea). A la izquierda del codón se proporciona una región de unión. A continuación se añaden un oligonucleótido de codón y un oligonucleótido de puente. El oligonucleótido de codón está provisto de un codón y regiones flanqueantes de unión. El puente se diseña con secuencias que complementan la región de unión de la molécula bifuncional naciente y una región de unión del oligonucleótido de codón tal que los extremos sean contiguos entre sí bajo condiciones de hibridación. El complejo bifuncional naciente, el puente y el oligonucleótido de codón forman un producto de hibridación bajo condiciones apropiadas. Se añade una ligasa para acoplar el oligonucleótido del codón al complejo bifuncional naciente. En una segunda etapa, un fragmento de fármaco, es decir, un reactivo, se añade y se establecen las condiciones que proporcionan una reacción con el sitio de reacción química.

Entonces, el contenido de cada pocillo se combina y, opcionalmente, se divide de nuevo en una gama de pocillos para una segunda ronda de reacción y codificación. En la etapa final, los contenidos combinados de los pocillos se usan en una etapa de selección o división, como se desvela en este documento.

La Fig. 13 explica resumidamente una realización con la etapa de codificación y de reacción invertidas en comparación con la realización mostrada en la Fig. 12. En una variedad de pocillos se dispensa un complejo bifuncional naciente que tiene un grupo reactivo (Rx) unido a un oligonucleótido (línea horizontal). En una primera etapa, el grupo reactivo en cada compartimento se hace reaccionar con un reactivo, en una segunda etapa un oligonucleótido de codón y un puente se añaden junto con una ligasa para ligar covalentemente el oligonucleótido de codón al complejo bifuncional naciente reaccionado, y en una tercera etapa se recupera el producto de ligación. El contenido de los pocillos puede combinarse posteriormente y usarse como una biblioteca de complejos bifuncionales o recircularse para otra ronda de reacción y adición de marca.

La Fig. 14 desvela el uso de la biblioteca producida según la Fig. 13, o cualquier otra biblioteca que tenga una parte codificante y parte de molécula de presentación, en otra ronda. Inicialmente, los contenidos combinados de los pocillos de la realización de la Fig. 13 se dispensan en pocillos separados. Entonces, un oligonucleótido anti-codón que tiene una región de unión que es complementaria a la región de unión de la molécula bifuncional naciente se añade bajo condiciones de hibridación, es decir, condiciones que favorecen el ensamblaje del producto de hibridación entre el complejo bifuncional naciente y el oligonucleótido anti-codón. Posteriormente, o simultáneamente con la adición del oligonucleótido anti-codón, una polimerasa, una colección de dNTP (normalmente, dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y sales apropiadas y tampón se añaden para hacer que se produzca una extensión. La extensión (flecha de puntos) transcribe el anti-codón al identificador, uniéndose así una marca que codifica la identidad del reactivo posteriormente reaccionado en el sitio de reacción química. El oligonucleótido anti-codón está conectado a una biotina (B) para permitir la eliminación del oligonucleótido.

La Fig. 15 desvela un esquema de diversos procedimientos de codificación combinados con un grupo de reactivos. Todas las combinaciones son según la invención.

Codificación de reactivo libre / *polimerasa:* Un complejo bifuncional naciente comprende un andamiaje (=sitio de reacción química) que comprende un grupo reactivo y una parte de oligonucleótido que comprende un codón que identifica el andamiaje. El codón está asociado a una región de unión a oligonucleótido que puede formar un producto de hibridación con una región de unión complementaria de un oligonucleótido anti-codón. El producto de hibridación se somete a una reacción de extensión, en la que el oligonucleótido de andamiaje se extiende por el anti-codón, proporcionando así el oligonucleótido de andamiaje con un codón.

Posteriormente, simultáneamente con o antes de la reacción de extensión, un reactivo libre codificado por el anti-codón se hace reaccionar con el andamiaje.

Bloque constructivo de cremallera / p*olimerasa:* Un complejo bifuncional naciente comprende un andamiaje (=sitio de reacción química) que comprende un grupo reactivo y una parte de oligonucleótido que comprende un codón que identifica el andamiaje. El codón está asociado a dos regiones de unión a oligonucleótido que pueden formar un producto de hibridación con una región de unión complementaria de un oligonucleótido anti-codón y una región de unión complementaria del reactivo. El producto de hibridación se somete a una reacción de extensión, en la que el oligonucleótido de andamiaje se extiende por el anti-codón, proporcionando así el oligonucleótido de andamiaje con un codón. Posteriormente, simultáneamente con o antes de la reacción de extensión, una entidad funcional codificada por el anti-codón se hace reaccionar con el andamiaje. La selección de polimerasa puede determinar el orden de reacción y codificación ya que alguna polimerasa, tal como la secuenasa, desplaza la región de unión unida a la entidad funcional, mientras que otras polimerasas, como la Taq polimerasa, no realizan el desplazamiento de la región de unión. Si se usa un bloque constructivo de cremallera se obtiene una estrecha proximidad entre el andamiaje y la entidad funcional, promoviéndose así que tenga lugar una reacción.

Bloque constructivo E2 / *codificación por polimerasa:* Un complejo bifuncional naciente comprende un andamiaje químico y una parte de oligonucleótido que comprende el codón que identifica el andamiaje. La parte de oligonucleótido comprende dos regiones de unión en cada lado del codón. Un bloque constructivo E2 se hibrida con el oligonucleótido de andamiaje de forma que la entidad funcional se aproxime estrechamente al andamiaje y se forme una doble hélice justo antes del anti-codón, permitiéndose así que una polimerasa reconozca la doble hélice como área de unión. La aplicación de condiciones y sustratos apropiados permite la extensión del oligonucleótido identificador sobre el anti-codón, transcribiéndose así la información genética de la entidad de función al identificador. La oposición del codón del andamiaje es un estiramiento de nucleótidos de unión universales tales como inosina. El uso de un bloque constructivo E2 permite la síntesis de una sola etapa de una biblioteca.

Bloque constructivo de bucle / *codificación por polimerasa:* Un complejo bifuncional naciente comprende un andamiaje químico y una parte de oligonucleótido que comprende el codón que identifica el andamiaje. La parte de oligonucleótido comprende dos regiones de unión en cada lado del codón. Un bloque constructivo de bucle se hibrida con el oligonucleótido de andamiaje de forma que la entidad funcional se aproxime estrechamente al andamiaje y se forme una doble hélice justo antes del anti-codón, permitiéndose así que una polimerasa reconozca la doble hélice como área de unión. La aplicación de condiciones y sustratos apropiados permite la extensión del oligonucleótido identificador sobre el anti-codón, transcribiéndose así la información genética de la entidad de función al identificador. Como ninguna secuencia en el bloque constructivo complementa la secuencia del codón del andamiaje, esta secuencia del codón forma un bucle. El uso de un bloque constructivo de bucle permite la síntesis de una sola etapa de una biblioteca.

Bloque constructivo N / *codificación por polimerasa:* Un complejo bifuncional naciente comprende un andamiaje químico unido a un codón del andamiaje mediante un ligador. En uno o ambos lados del codón está presente una región de unión. Un bloque constructivo N comprende una región de unión que es complementaria a la región de unión del andamiaje y un anti-codón. Una entidad funcional está unida al codón o una región de unión. Bajo condiciones de hibridación, las regiones de unión complementarias se hibridan y una polimerasa se extiende en ambas direcciones, transfiriéndose así la información genética del anti-codón al oligonucleótido covalentemente conectado al andamiaje. La reacción entre la entidad funcional y el andamiaje puede tener lugar antes, después de o simultáneamente con la reacción de extensión. Normalmente, la entidad funcional está unida al oligonucleótido anti-codón mediante un ligador escindible de manera que se permite la transferencia de la entidad funcional a la estructura de andamiaje.

Reactivo libre / ligasa: Una entidad de andamiaje está unida a un oligonucleótido que comprende un codón. El oligonucleótido de andamiaje comprende además un sitio de cebado al que está ligado un oligonucleótido de codón. La ligación se realiza por una ligasa. La ligación puede tener lugar en una forma monocatenaria o bicatenaria. En la forma monocatenaria, un 3'-OH (o 5'-fosfato) del oligonucleótido de andamiaje se liga al 5'-fosfato (o 3'-OH) del oligonucleótido de codón. En la forma bicatenaria se usa un oligonucleótido que complementa los extremos del andamiaje y los oligonucleótidos de codón, respectivamente, y se diseña de forma que los extremos sean contiguos entre sí. Opcionalmente, la ligación se produce entre dos oligonucleótidos bicatenarios, es decir, el oligonucleótido de andamiaje bicatenario con un nucleótido protuberante (“extremo cohesivo”) se liga al oligonucleótido de codón bicatenario provisto de un nucleótido protuberante complementario. El tipo de ligación depende de la enzima seleccionada. Normalmente se prefiere la ligación bicatenaria debido a que la reacción es más rápida debido al efecto de guiado del oligonucleótido que complementa los extremos. El oligonucleótido complementario también se denomina en este documento oligonucleótido de puente. A continuación, precediendo a o simultáneamente con la ligación del oligonucleótido de codón con el oligonucleótido de andamiaje, tiene lugar una reacción entre el reactivo libre y el andamiaje.

Bloque constructivo de cremallera / ligasa: Un entidad de andamiaje está unida a un oligonucleótido que comprende un codón y una región de unión entre el andamiaje y el codón. El oligonucleótido de andamiaje comprende además un sitio de cebado al que está ligado un oligonucleótido de codón. La ligación se realiza por una ligasa. La ligación puede tener lugar en una forma monocatenaria o bicatenaria. En la forma monocatenaria, un 3'-OH (o 5'-fosfato) del oligonucleótido de andamiaje se liga al 5'-fosfato (o 3'-OH) del oligonucleótido de codón. En la forma bicatenaria se usa un oligonucleótido que complementa los extremos del andamiaje y los oligonucleótidos de codón, respectivamente, y se diseña de forma que los extremos sean contiguos entre sí. Opcionalmente, la ligación se produce entre dos oligonucleótidos bicatenarios, es decir, el oligonucleótido de andamiaje bicatenario con un nucleótido protuberante ("extremo cohesivo") se liga al oligonucleótido de codón bicatenario provisto de un nucleótido protuberante complementario. El tipo de ligación depende de la enzima seleccionada. Normalmente se prefiere la ligación bicatenaria debido a que la reacción es más rápida debido al efecto de guiado del oligonucleótido que complementa los extremos. El oligonucleótido complementario también se denomina en este documento oligonucleótido de puente. Un bloque constructivo de cremallera es una entidad funcional unida a un oligonucleótido de unión. El oligonucleótido de unión está complementando la región de unión del oligonucleótido de andamiaje, formando así un producto de hibridación bajo condiciones de hibridación. A continuación, precediendo a o simultáneamente con la ligación del oligonucleótido de codón con el oligonucleótido de andamiaje, tiene lugar una reacción entre la entidad funcional y el andamiaje. El uso de la región de unión en el reactivo garantiza una estrecha proximidad entre la entidad funcional y el andamiaje.

Bloque constructivo E2 / *codificación por ligación:* Inicialmente se proporciona un complejo bifuncional naciente que comprende un andamiaje unido a un oligonucleótido, comprendiendo dicho oligonucleótido un codón y una región de unión entre el codón del andamiaje y el codón del andamiaje. El oligonucleótido de andamiaje también comprende un sitio de cebado al que puede ligarse un oligonucleótido de codón. El oligonucleótido de andamiaje se hibrida con un bloque constructivo E2 que lleva la parte bicatenaria. El oligonucleótido que complementa el anti-codón se liga al oligonucleótido de andamiaje usando el bloque constructivo E2 como molde. Antes, después de o simultáneamente con la ligación tiene lugar una reacción entre la entidad funcional y el andamiaje.

Bloque constructivo de bucle / *codificación por ligación:* Se proporciona un complejo bifuncional que comprende un andamiaje unido a un oligonucleótido en el que el oligonucleótido de andamiaje comprende un codón flanqueado por dos regiones de unión. Se proporciona un bloque constructivo de bucle que tiene regiones de unión que complementan las regiones de unión del oligonucleótido de andamiaje. Tras la hibridación, la parte de codón del oligonucleótido de andamiaje forma un bucle. El bloque constructivo de bucle también comprende parte de codón bicatenaria. El oligonucleótido que complementa la parte de anti-codón del bloque constructivo de bucle se liga a la región de unión libre del oligonucleótido de andamiaje. Antes, después de o simultáneamente con la ligación tiene lugar una reacción entre la entidad funcional y el andamiaje.

Bloque constructivo N / *codificación por ligación:* Inicialmente se proporciona un complejo bifuncional naciente en el que un andamiaje mediante un ligador adecuado está unido al codón que identifica dicho andamiaje o unido a una región de unión conectada al codón. Un bloque constructivo que tiene una entidad funcional conectada a un codón se liga al oligonucleótido de andamiaje para conectar el oligonucleótido de andamiaje con el oligonucleótido de entidad funcional. La ligación puede realizarse en un estado monocatenario o bicatenario, dependiendo de la enzima particular seleccionada para la ligación. Posteriormente, la entidad funcional se hace reaccionar con el andamiaje. Provisionalmente, la entidad funcional y el andamiaje se hacen reaccionar antes de la ligación de los oligonucleótidos respectivos.

Cuando una ronda, es decir, una reacción con y un marcaje del complejo bifuncional naciente, se ha completado según cualquiera de los procedimientos de codificación anteriores, puede iniciarse una nueva ronda según cualquiera de los procedimientos de reacción/codificación anteriores. Por tanto, la codificación y la reacción en una primera ronda pueden ser iguales o diferentes en una segunda ronda posterior o adicional. Puede generarse un único complejo bifuncional o una biblioteca de complejos. Si se contempla una biblioteca, la síntesis de una sola etapa puede realizarse con los bloques constructivos en los que se usa un enlace covalente entre la entidad funcional y el codón/anti-codón, es decir, las columnas del bloque constructivo E2, bloque constructivo de bucle y bloque constructivo N. La síntesis por división y mezcla puede realizarse cuando no esté presente ningún enlace covalente entre la entidad funcional/reactivo y el codón/anti-codón, es decir, en las columnas que indican el reactivo libre y el bloque constructivo de cremallera.

La Fig. 16 muestra un procedimiento de codificación doble, es decir, un procedimiento para codificar dos o más reactivos en una pasada. En ciertas realizaciones, los procedimientos de codificación múltiple permiten múltiples reacciones entre reactivos y el andamiaje. Inicialmente, un andamiaje conectado a un oligonucleótido que comprende una región de hibridación, un codón del andamiaje y una región de unión se hibrida con un bloque constructivo E2. Posteriormente se realiza una extensión en la que el anti-codón del bloque constructivo se transfiere al identificador. Varias polimerasas forman un nucleótido protuberante de uno o más nucleótidos monocatenarios. Este nucleótido protuberante se usa en la presente invención para unir un oligonucleótido anti-codón y permitir que

la polimerasa extienda adicionalmente el oligonucleótido identificador sobre la región anti-codón del oligonucleótido anti-codón. La transferencia de la información del oligonucleótido anti-codón permite codificar un tercer reactivo libre C. La hibridación entre el oligonucleótido que lleva A y el oligonucleótido que lleva B proporciona un estrecha proximidad entre A y B y, por tanto, una alta concentración local. Por tanto, cuando el reactivo libre C se añade se favorece una reacción entre los tres componentes. Una ventaja de la codificación doble es que es posible cambiar el disolvente, de forma que la reacción no debe tener lugar necesariamente en el mismo disolvente que se produce la extensión.

A la derecha se ilustra un ejemplo en el que el procedimiento anterior se aplica a 100 oligonucleótidos de andamiaje diferentes y a 100 bloques constructivos. El producto de hibridación entre los oligonucleótidos de andamiaje y los oligonucleótidos del bloque constructivo se divide en 100 pocillos diferentes. En cada uno de los pocillos se permite la extensión, la adición de oligonucleótido anti-codón y la reacción con reactivo libre específico. En total se generan 10^6 moléculas bifuncionales diferentes.

La Fig. 17 desvela diversos procedimientos para realizar la codificación doble. En todos los ejemplos se muestra que la codificación se produce antes de la reacción, pero estará dentro del ámbito del experto realizar la reacción primero y luego la codificación. Si se contempla una biblioteca es posible realizar la reacción en un único recipiente (síntesis de una sola etapa) usando los bloques constructivos N en combinación con cualquiera de los procedimientos de codificación. Para los reactivos restantes es necesario realizar una o más etapas de división y mezcla. En la combinación del bloque constructivo de cremallera, el bloque constructivo E2 y el bloque constructivo de bucle con cualquiera de los procedimientos de codificación es necesaria una única etapa de división y mezcla, mientras que son necesarias dos etapas de división y mezcla para el reactivo libre en combinación con cualquier procedimiento de codificación. El esquema hace posible que el experto seleccione una reacción/procedimiento de codificación que es útil para una reacción específica. Si se contempla una codificación triple, cuádruple o múltiple es posible realizar tal codificación usando una realización del esquema de codificación doble en combinación con una realización del esquema de codificación individual de la Fig. 15 una o más veces para llegar a un procedimiento de codificación/de reacción que se adapte a la necesidad de una reacción química específica.

La Fig. 21 desvela un procedimiento de codificación triple. Inicialmente se proporciona un andamiaje unido a un oligonucleótido de andamiaje. El andamiaje está unido a una región de unión del oligonucleótido de andamiaje, y el oligonucleótido de andamiaje está provisto adicionalmente de un codón. Los dos bloques constructivos de tipo E2 se hibridan con el oligonucleótido de andamiaje, aproximando así estrechamente las entidades funcionales BB1 y BB2 al andamiaje. Simultáneamente, antes de o posterior a la adición de los bloques constructivos se proporciona un oligonucleótido de codón que codifica un tercer reactivo (BB3) que comprende una parte que complementa una secuencia de nucleótidos del primer bloque constructivo. Se permite que los componentes del sistema se hibriden entre sí y se proporciona una polimerasa y una ligasa. La polimerasa realiza una extensión cuando sea posible y la ligasa se acopla junto con los oligonucleótidos extendidos de manera que se forme un producto bicatenario. Tras el procedimiento de codificación, el tercer reactivo se añade y se proporcionan condiciones que promueven una reacción entre el andamiaje y los reactivos. Finalmente se usa una selección para seleccionar productos de reacción que realizan una cierta función hacia una diana. Los oligonucleótidos de identificación de los complejos bifuncionales seleccionados se amplifican por PCR y se identifican.

A la derecha se indica una realización particular para llevar a cabo la presente invención. Por consiguiente, cada codón tiene 5 nucleótidos de longitud y las regiones de unión que flanquean el andamiaje tienen 20 nucleótidos cada una. Los bloques constructivos diseñados para hibridarse con las regiones de unión del andamiaje comprenden una secuencia complementaria de 20 nucleótidos, además de un codón de 5 nucleótidos.

Una realización del procedimiento de enriquecimiento de la presente invención se muestra en la Fig. 24. Inicialmente, cada entidad química (denotada por las letras A, B, C, ..) en una biblioteca está unida a una única marca identificadora (denotada a, b, c, ..). La marca identificadora comprende información sobre ese compuesto particular o grupo de compuestos con respecto a, por ejemplo, estructura, masa, composición, posición espacial, etc. En una segunda etapa, los compuestos químicos marcados se combinan con un conjunto de secuencias de anti-marca (denotadas a', b', c', ..). Cada secuencia de anti-marca lleva un asa, como biotina, para fines de purificación. Las secuencias de anti-marca comprenden un segmento que es complementario a una secuencia de la secuencia identificadora. Se permite que la combinación de secuencias de anti-marca y secuencias identificadoras formen productos de hibridación. Opcionalmente puede haber entidades marcadas químicas presentes que no han sido reconocidas por una anti-marca. En una tercera etapa, las secuencias que llevan un asa se eliminan, es decir, los compuestos químicos marcados se dejan en los medios mientras que la materia que comprende un asa se transfiere a un segundo medio. En el caso de que el asa sea biotina puede transferirse a un segundo medio usando estreptavidina inmovilizada.

La materia purificada puede comprender secuencias de anti-marca no hibridadas con una secuencia relacionada. Como estas secuencias de anti-marca no se acoplan a un compuesto químico para seleccionarse, las secuencias de enriquecimiento pueden seguir en los medios. Sin embargo, en algunas aplicaciones puede ser preferible hacer bicatenarias el exceso de secuencias de anti-marca, como se ilustra en la Fig. 25, debido a que la doble hélice normalmente es inerte con respecto al procedimiento de selección. El exceso de secuencias de anti-marca puede

transformarse en el estado de doble hélice usando un cebador junto con una polimerasa adecuada y nucleótidos trifosfatos.

La fracción purificada en la etapa 4 se somete a un procedimiento de selección. La selección comprende sondar un conjunto de propiedades, por ejemplo, pero no se limitan a, afinidad por una proteína específica. En un caso tal se eliminarán las entidades que no se unan a la proteína específica. Las anti-marcas complejadas con entidades que se unen a la proteína específica pueden recuperarse/aislarse mediante, por ejemplo, el uso de su asa de purificación.

En la etapa 5, las anti-marcas aisladas se amplifican opcionalmente mediante el uso de PCR o RT-PCR.

En la etapa 6, la biblioteca inicial de entidades marcadas producida en la etapa 1 puede someterse a más rondas de complejación y cribado, es decir, las anti-marcas de la etapa 5 pueden añadirse a la biblioteca de entidades marcadas de la etapa 1 y luego someterse a la etapa 3, etapa 4 y etapa 5. La etapa 6 puede repetirse.

En la etapa 7, las anti-marcas aisladas de la etapa 5 pueden clonarse y revelarse su identidad, por ejemplo, en el caso de ADN, puede aplicarse secuenciación por la cual se revelará la identidad de entidades específicas con propiedades seleccionadas en la biblioteca de entidades marcadas.

La realización mostrada en la Fig. 26 se asemeja a la de la Fig. 24, excepto que los componentes no complejados se convierten en inertes, por ejemplo, si las marcas y/o anti-marcas están compuestas por ADN o ARN monocatenario, pueden transformarse en ADN bicatenario, ARN o un híbrido de los mismos. Esto puede llevarse a cabo usando un cebador, nucleótidos trifosfatos y una polimerasa o transcriptasa. Además, la secuencia de purificación (usando el asa de purificación en anti-marcas) y el sondaje de propiedades cambia en comparación con el procedimiento de la Fig. 24.

En la Fig. 27, etapa 1, varias entidades (denotadas por las letras A,B,C...), que son mezclas o compuestos individuales, están unidas a una única marca, más específicamente una secuencia de ADN o ARN o un derivado de los mismos, que contiene información sobre ese compuesto o mezcla tal como, por ejemplo, estructura, masa, composición, información espacial, etc.

En la etapa 2, todas las marcas de entidades marcadas se hacen bicatenarias usando un cebador (que opcionalmente lleva un asa @ tal como, por ejemplo, biotina), nucleótidos trifosfatos y una polimerasa o transcriptasa. El resto del ADN o ARN monocatenario puede digerirse opcionalmente usando nucleasas.

La mezcla se sonda para un conjunto de propiedades en la etapa 3, por ejemplo, pero no se limita a, afinidad por una proteína específica. En un caso tal se eliminarán las entidades que no se unan a la proteína específica. Las anti-marcas complejadas con entidades que se unen a la proteína específica pueden recuperarse/aislarse mediante, por ejemplo, el uso de su asa @.

Las anti-marcas aisladas pueden amplificarse opcionalmente en la etapa 4 mediante el uso de PCR o RT-PCR.

En la etapa 5, la biblioteca de entidades marcadas de la etapa 1 puede someterse a complejación con las anti-marcas aisladas y opcionalmente amplificadas de la etapa 3 y 4.

Los componentes monocatenarios están siendo digeridos en la etapa 6 por uso de, por ejemplo, nucleasas. El subconjunto bicatenario restante de la biblioteca se somete opcionalmente a un enriquecimiento renovado de la biblioteca según la etapa 3-6. Las etapas 3-6 pueden repetirse un número de veces suficiente para obtener una entidad química apropiada que tenga la propiedad deseada.

En la etapa 7, las anti-marcas aisladas de la etapa 4 pueden clonarse y revelarse su identidad, por ejemplo, en el caso de ADN, puede aplicarse secuenciación, por lo que se revela la identidad de entidades específicas en la biblioteca de entidades marcadas.

La Fig. 28 se refiere a un procedimiento que implica una digestión de oligonucleótidos monocatenarios. En una primera etapa, varias entidades (denotadas por las letras A,B,C...), que son mezclas o compuestos individuales, están unidas a una única marca, que contiene información sobre ese compuesto o mezcla tal como, por ejemplo, estructura, masa, composición, información espacial, etc.

En la etapa 2, las mezclas de entidades marcadas se combinan con un conjunto de anti-marcas complementarias. Las anti-marcas pueden ser, pero no se limitan a, derivados de nucleótidos. Las anti-marcas pueden llevar opcionalmente un asa @. Se permite que la marca y las anti-marcas formen un complejo. La complejación puede ser, pero no se limita a, hibridación. Algunas anti-marcas no formarán un complejo con una entidad marcada y algunas entidades marcadas no formarán un complejo con una anti-marca.

Los componentes no complejados se digieren en la etapa 3 usando, por ejemplo, nucleasas cuando las marcas y/o anti-marcas están compuestas por ADN o ARN o híbridos de los mismos.

La mezcla de la etapa 3 se sonda para un conjunto de propiedades en la etapa 4, por ejemplo, pero no se limitan a, afinidad por una proteína específica. En un caso tal se eliminarán las entidades que no se unan a la proteína específica. Las anti-marcas complejadas con entidades que se unen a la proteína específica pueden recuperarse/aislarse mediante, por ejemplo, el uso de su asa @. La etapa 4 puede repetirse una o más veces.

Las anti-marcas aisladas pueden amplificarse opcionalmente mediante el uso de PCR o RT-PCR como se ilustra en la etapa 5. Entonces, las anti-marcas también pueden usarse como se describe en las Figuras 24-27.

Las anti-marcas aisladas pueden clonarse y revelarse su identidad en la etapa 6, por ejemplo, en el caso de ADN puede aplicarse secuenciación, por lo que se revelará la identidad de entidades específicas en la biblioteca de entidades marcadas.

Según la Fig. 29, etapa 1, varias entidades (denotadas por las letras A,B,C...), que son mezclas o compuestos individuales, están unidas a una única marca, más específicamente una secuencia de ADN o ARN o un derivado de los mismos, que contiene información sobre ese compuesto o mezcla tal como, por ejemplo, estructura, masa, composición, información espacial, etc.

Todas las marcas de entidades marcadas se hacen bicatenarias en la etapa 2 usando un cebador (que opcionalmente lleva un asa @ tal como, por ejemplo, biotina), nucleótidos trifosfatos y una polimerasa o transcriptasa. El ADN o ARN monocatenario restante puede digerirse opcionalmente usando, por ejemplo, nucleasas.

En la etapa 3, la mezcla se sonda para un conjunto de propiedades, por ejemplo, pero no se limitan a, afinidad por una proteína específica. En un caso tal se eliminarán entidades que no se unan a la proteína específica. Las anti-marcas complejadas con marcas que tienen adjuntas entidades que se unen a la proteína específica pueden recuperarse/aislarse mediante, por ejemplo, el uso de su asa @. La etapa 3 puede repetirse una o más veces.

Según la etapa 4, las anti-marcas aisladas pueden amplificarse opcionalmente mediante el uso de PCR o RT-PCR. Entonces, las anti-marcas también pueden usarse como se describe en las Figs. 24-27.

Las anti-marcas aisladas pueden clonarse en la etapa 5 y revelarse su identidad, por ejemplo, en el caso de ADN, puede aplicarse secuenciación, por lo que se revelará la identidad de entidades específicas en la biblioteca de entidades marcadas.

La Fig. 30, etapa 1, produce varias entidades (denotadas por las letras A,B,C...), que son mezclas o compuestos individuales que están unidas a una única marca, más específicamente una secuencia de ADN o ARN o un derivado de los mismos, que contiene información sobre ese compuesto o mezcla tal como, por ejemplo, estructura, masa, composición, información espacial, etc.

En la etapa 2, la mezcla se sonda para un conjunto de propiedades, por ejemplo, pero no se limitan a, afinidad por una proteína específica. En un caso tal se eliminarán entidades que no se unan a la proteína específica. La etapa 2 puede repetirse.

Todas las marcas de entidades marcadas se hacen bicatenarias en la etapa 3 usando un cebador (que opcionalmente lleva un asa @ tal como, por ejemplo, biotina), nucleótidos trifosfatos y una polimerasa o transcriptasa. El ADN o ARN monocatenario restante puede digerirse opcionalmente usando, por ejemplo, nucleasas.

Las anti-marcas complejadas con marcas de entidades que se unen a la proteína específica pueden recuperarse/aislarse en la etapa 4 mediante, por ejemplo, el uso de su asa @. Las anti-marcas pueden amplificarse opcionalmente mediante el uso de PCR o RT-PCR. Entonces, las anti-marcas también pueden usarse como se describe en las Figs. 24-27.

Las anti-marcas aisladas pueden clonarse en la etapa 5 y revelarse su identidad, por ejemplo, en el caso de ADN, puede aplicarse secuenciación, por lo que se revelará la identidad de entidades específicas en la biblioteca de entidades marcadas.

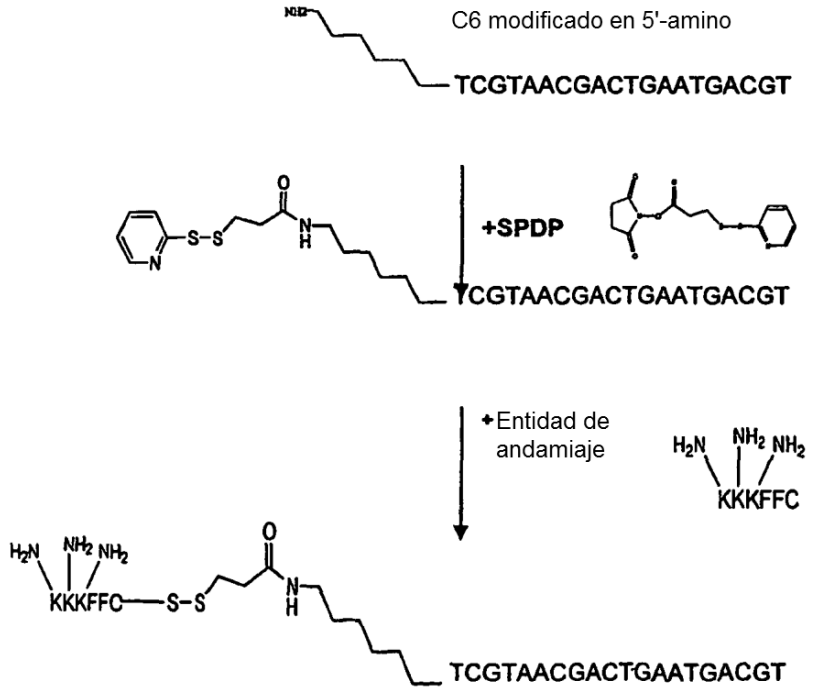
EJEMPLOS

Ejemplo 1: Carga de un andamiaje sobre moléculas identificadoras

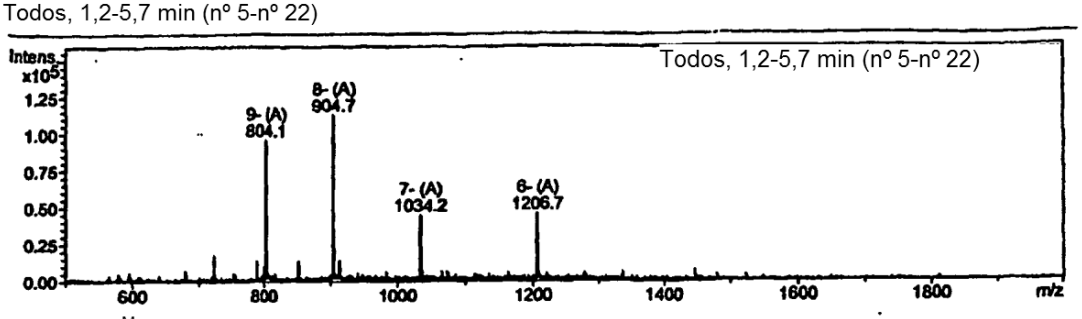
Un oligonucleótido identificador marcado en 5' del amino-modificador C6 (5'-X-TCGTAACGACTGAATGACGT-3' en la que X puede obtenerse de Glen Research, nº de cat. 10-1039-90) se cargó con un andamiaje de péptido (Cys-Phe-Phe-Lys-Lys-Lys, CFFKKK) usando activación con SPDP (véase más adelante). La activación con SPDP del amino-oligonucleótido se realizó usando 160 µl de 10 nmoles de oligonucleótido en HEPES-KOH 100 mM, pH=7,5, y

40 µl de SPDP 20 mM e incubación durante 2 h a 30ºC. El amino-oligonucleótido activado se extrajo 3 veces con 500 µl de EtOAc, se secó durante 10 min en un Speed-vac y se purificó usando una columna Micro Bio-Spin equilibrada con HEPES-KOH 100 mM. La carga del andamiaje se realizó luego añadiendo 10 µl de entidad de unión 100 mM e incubando durante la noche a 30ºC.

El oligonucleótido identificador cargado se precipitó con NH_4OAc 2 M y 2 volúmenes de etanol al 96% durante 15 min a 80ºC y luego se centrifugó durante 15 min a 4ºC y 15.000 g. El sedimento se resuspendió en agua y se repitió la precipitación. El lavado del sedimento de oligonucleótidos se hizo añadiendo 100 µl de etanol al 70% y luego se centrifugó brevemente. El oligonucleótido se redisolvió en 50 µl de H_2O y se analizó por EM. El análisis de EM se realizó después de tratarse 100 pmoles de oligonucleótido en 10 µl de agua con 10 µl de resina de intercambio iónico y se incubó como mínimo 2 h a 25ºC en un agitador. Después de la incubación, la resina se eliminó por centrifugación y 15 µl del sobrenadante se mezclaron con 7 µl de agua, 2 µl de piperidina e imidazol (cada uno 625 mM) y 24 µl de acetonitrilo. La muestra se analizó usando un instrumento de espectroscopía de masas (Bruker Daltonics, Esquire 3000plus). La masa observada, como puede apreciarse más adelante, fue 7244,93 Da, que se corresponde bien con la masa calculada, 7244,00 Da. Estos datos experimentales ejemplifican la posibilidad de cargar andamiajes sobre oligonucleótidos identificadores. Esta molécula identificadora cargada puede usarse para recibir entidades funcionales de bloques constructivos. Este andamiaje particular aloja tres grupos reactivos idénticos, es decir, el grupo amina de la cadena lateral de licina y, por tanto, puede transferirse a una, dos o tres entidades funcionales, que pueden hacerse reaccionar con los grupos amina.



Todos, 1,2-5,7 min (nº 5-nº 22)

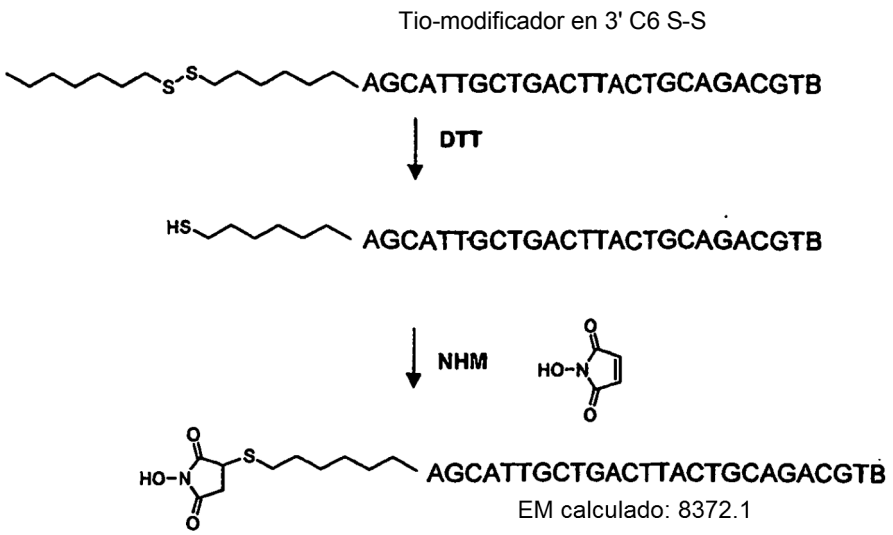


Componente	Masa desconvolucionada	Molécula	Abundancia absoluta	Abundancia relativa
A	7244.93	[M - H]-	296744	99.25

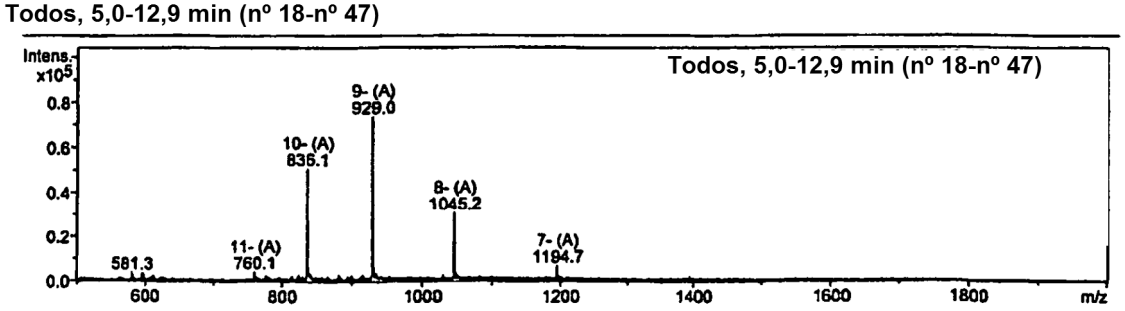
Ejemplo 2: Carga de entidades funcionales sobre bloques constructivos

La carga de entidades funcionales sobre moléculas del bloque constructivo puede hacerse usando un oligonucleótido de tiol (véase más adelante). Un oligonucleótido del bloque constructivo marcado en 3' (5'-BTGCAGACGTCATTCAGTCGTTACGA-3') del tio-modificador marcado en 5' con biotina C6 S-S (obtenible de Glen Research, nº de cat. 10-1936-90) se convirtió en un NHS-oligonucleótido usando NHM.

Se secaron 10 nmol del oligonucleótido en Speed-Vac, se redisolvieron en 50 µl de DTT 100 mM, fosfato de sodio 100 mM a pH 8,0 y se incubaron a 37ºC durante 1 hora. Entonces, el oligonucleótido de tiol se purificó usando la columna Micro Bio-Spin equilibrada con HEPES-KOH 100 mM, pH 7,5. El oligonucleótido de tiol se convirtió en NHS-oligonucleótido añadiendo NHM 100 mM en HEPES-KOH 100 mM a pH 7,5. La muestra se incubó a 25ºC durante la noche. Entonces, el NHS-oligonucleótido se purificó usando la columna Bio-Spin equilibrada con H_2O para calidad EM.



El análisis de EM se realizó después de tratarse 100 pmoles de oligonucleótido en 10 µl de agua con 10 µl de resina de intercambio iónico e incubarse como mínimo 2 h a 25ºC en un agitador. Después de la incubación, la resina se eliminó por centrifugación y 15 µl del sobrenadante se mezclaron con 7 µl de agua, 2 µl de piperidina e imidazol (cada uno 625 mM) y 24 µl de acetonitrilo. La muestra se analizó usando un instrumento de espectroscopía de masas (Bruker Daltonics, Esquire 3000plus). La masa observada como puede apreciarse más adelante fue 8369,32, que se corresponde bien con la masa calculada, 8372,1. Los datos experimentales ejemplifican la posibilidad de convertir la entidad de unión en oligonucleótidos del bloque constructivo. Este producto puede usarse después para unir entidades funcionales transferibles.

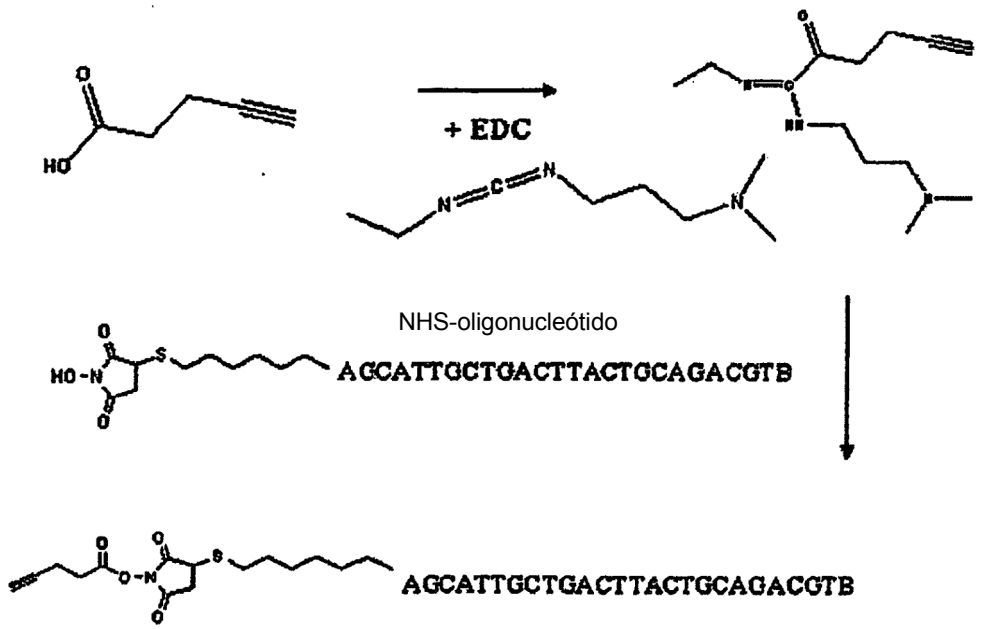


Todos, 5,0-12,9 min (nº 18-nº 47)

Componente	Masa desconvolucionada	Molécula	Abundancia absoluta	Abundancia relativa
A	8369.32	(M - H)-	160905	96.87

Entonces, el NHS-oligonucleótido se usó para cargar entidades funcionales. La activación por EDC de la entidad funcional (ácido 4-pentinoico) se realizó mezclando 50 µl de entidad funcional 200 mM en DMF con 50 µl de EDC 200 mM en DMF y se incubó durante 30 min a 25ºC en un agitador. Entonces, la carga se realizó usando 1 nmol de NHS-oligonucleótido liofilizado en un Speed-Vac y 10 µl del bloque constructivo activado (véase más adelante). Éste se incubó a 25ºC durante 5 min y luego se mezcló con 30 µl de MES 100 mM a pH 6,0. El NHS-oligonucleótido

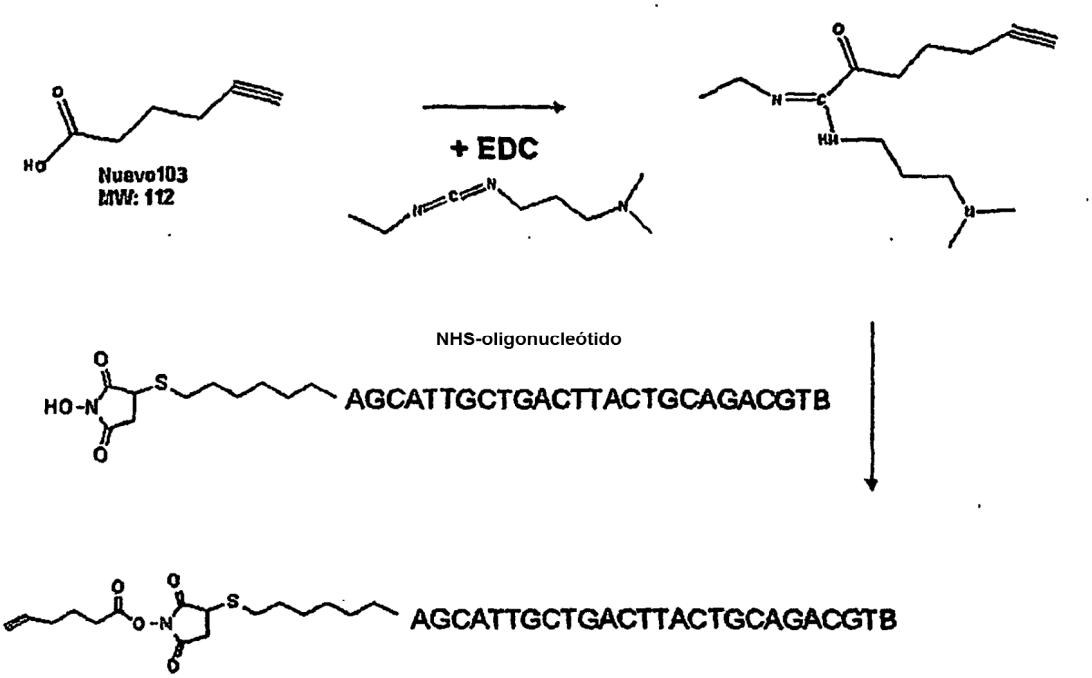
cargado se purificó usando la columna Bio-Spin equilibrada con MES 100 mM a pH 6,0. El oligonucleótido del bloque constructivo cargado se usa entonces inmediatamente para la reacción de transferencia sin ningún análisis de EM. Esto es debido a la estructura inestable de la entidad funcional durante las condiciones usadas para las mediciones de EM.



Este experimento ejemplifica una carga completa de una entidad funcional sobre una molécula del bloque constructivo lista para la transferencia a un grupo reactivo receptor cuando se hibrida con la molécula identificadora complementaria.

Otro ejemplo de una entidad funcional que puede cargarse como se ha descrito anteriormente sobre un bloque constructivo es un ácido 5-hexinoico como se muestra más adelante. De nuevo, no se realizó análisis de EM en este compuesto debido a la estructura inestable de la entidad funcional en las condiciones usadas en las mediciones de EM.

Grupo R1 constructivo



Ejemplo 3: Transferencia de entidades funcionales del bloque constructivo a la molécula identificadora

La entidad de unión (AE) en los siguientes experimentos es tanto un andamiaje, por ejemplo, el péptido, CFFKKK, cargado sobre un identificador como se prepara en el Ejemplo 1 como un grupo reactivo receptor ejemplificado por un oligonucleótido modificado con amino usado como material de partida en el Ejemplo 1. Estas entidades de unión permiten la transferencia de tres o una entidad funcional, respectivamente.

El identificador usado en este experimento es un oligonucleótido identificador cargado con CFFKKK como se describe en Ejemplo 1. La entidad funcional (FE) en este experimento es el ácido 4-pentinoico, cuya carga se describió en el Ejemplo 2. La molécula identificadora cargada con el andamiaje se hibrida con la molécula del bloque constructivo cargada para aproximar estrechamente la entidad de unión y la entidad funcional. La hibridación está dirigida por la región identificadora en la molécula identificadora y la secuencia complementaria en la molécula del bloque constructivo.

AE-TCGTAACGACTGAATGACGT

\+

FE-AGCATTGCTGACTTACTGCAGACGTB

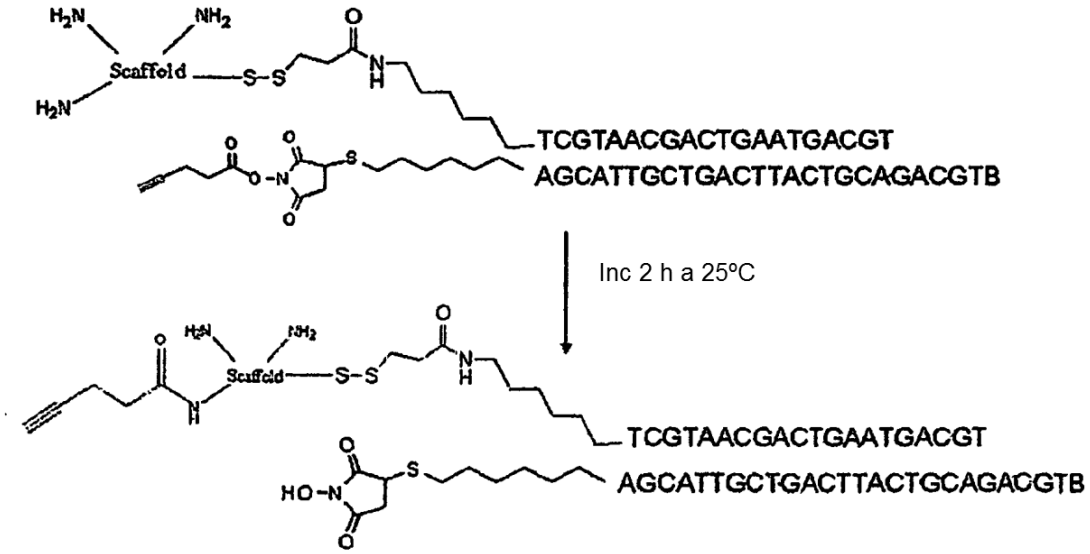
↓

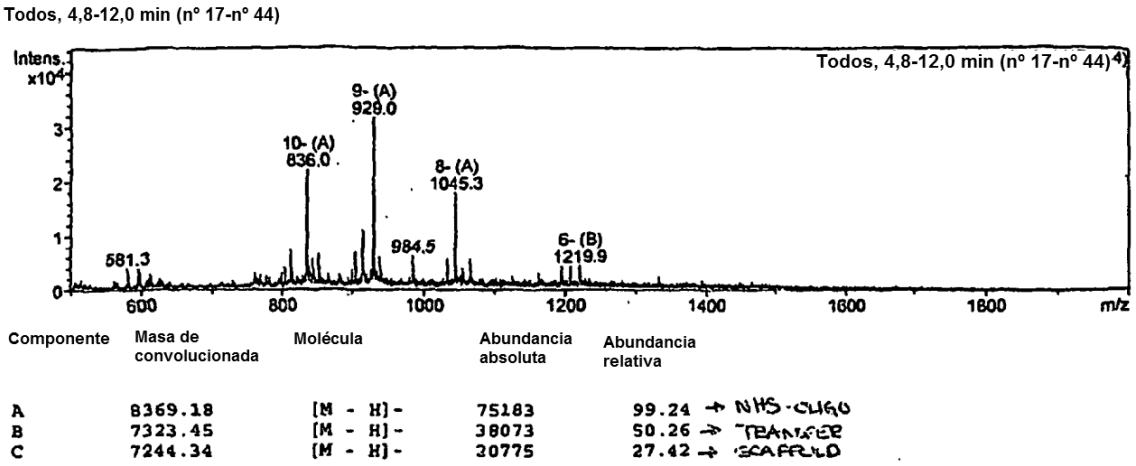
AE-TCGTAACGACTGAATGACGT

FE-AGCATTGCTGACTTACTGCAGACGTB

Después de la etapa de hibridación entre el identificador y las moléculas del bloque constructivo, la reacción de transferencia tiene lugar cuando la entidad funcional se transfiere a la molécula identificadora.

La hibridación se realizó usando 600 pmoles de bloque constructivo y 400 pmoles de moléculas identificadoras en tampón MES 0,1 M a 25ºC en un agitador durante 2 horas. La parte reactiva (entidad funcional) del bloque constructivo se transfirió al grupo amino en la entidad de unión en la molécula identificadora durante la hibridación (véase más adelante). Después de la hibridación, la muestra se purificó por filtración en gel en Micro-Spin y se analizó por EM. La muestra se preparó para análisis de EM usando cantidad igual de muestra (aproximadamente 100 pmoles) y resina de intercambio iónico y se incubó como mínimo 2 h a 25ºC en un agitador. Después de la incubación, la resina se centrifugó y a 15 µl del sobrenadante se añadieron 7 µl de agua, 2 µl de piperidina e imidazol (cada uno 625 mM) y 24 ul de acetonitrilo. La muestra se analizó en un instrumento de espectroscopía de masas (Bruker Daltonics, Esquire 3000plus). La masa observada (véase más adelante) fue 7323,45 Da, que se corresponde bien con la masa calculada, 7324,00 Da. Por tanto, el espectro de EM de la molécula identificadora después de la reacción de transferencia muestra una masa correspondiente a la entidad funcional transferida en la molécula identificadora.

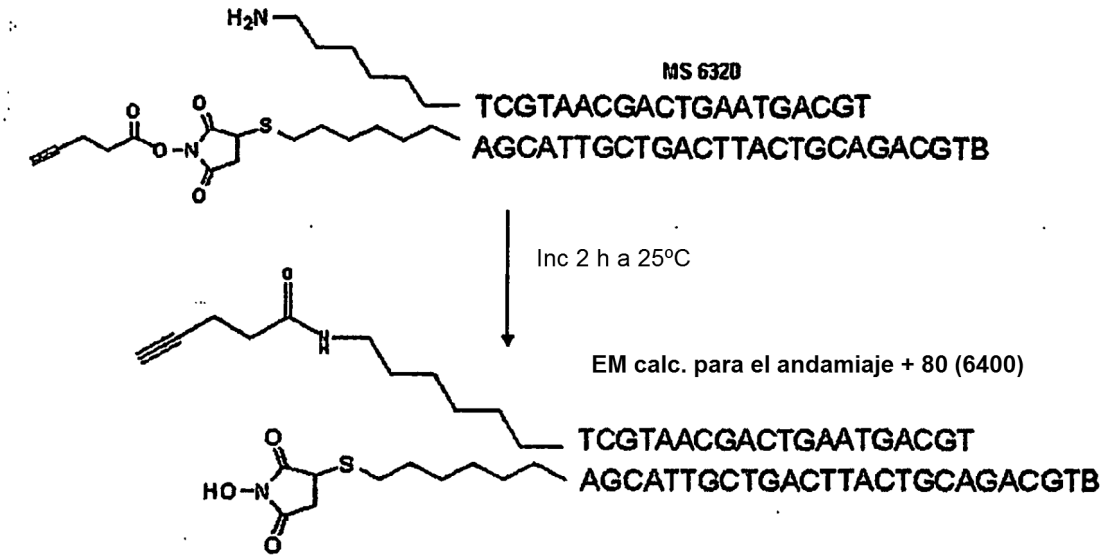




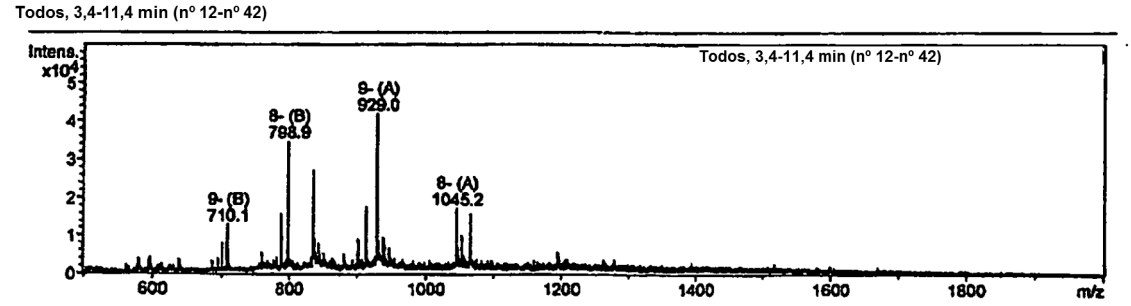
Componente	Masa de convolucionada	Molécula	Abundancia absoluta	Abundancia relativa
A	8369.18	[M - H]-	75183	99.24 → NHS-CHAO
B	7323.45	[M - H]-	38073	50.26 → TRANSFER
C	7244.34	[M - H]-	30775	27.42 → SCAFFOLD

Otro ejemplo de transferencia de entidad funcional se muestra más adelante usando el amino-oligonucleótido directamente como AE en la molécula identificadora. La entidad funcional en la molécula del bloque constructivo usada en este experimento fue ácido 4-pentinoico, como se desvela en el Ejemplo 2.

La hibridación se realizó usando 500 pmoles del bloque constructivo y las moléculas identificadoras en tampón MES 0,1 M e incubando la mezcla a 25ºC en un agitador durante 2 horas. La parte reactiva (entidad funcional) del bloque constructivo se transfirió al grupo amino en la molécula identificadora durante la hibridación (véase más adelante). Después de la hibridación y transferencia, la muestra se purificó por filtración en gel en Micro-Spin y se analizó por EM. La muestra se preparó para análisis de EM usando cantidad igual de muestra (aproximadamente 100 pmoles) y resina de intercambio iónico y se incubó como mínimo 2 h a 25ºC en un agitador. Después de la incubación, la resina se eliminó por centrifugación y a 15 µl del sobrenadante se añadieron 7 µl de agua, 2 µl de piperidina e imidazol (cada uno 625 mM) y 24 ul de acetonitrilo.



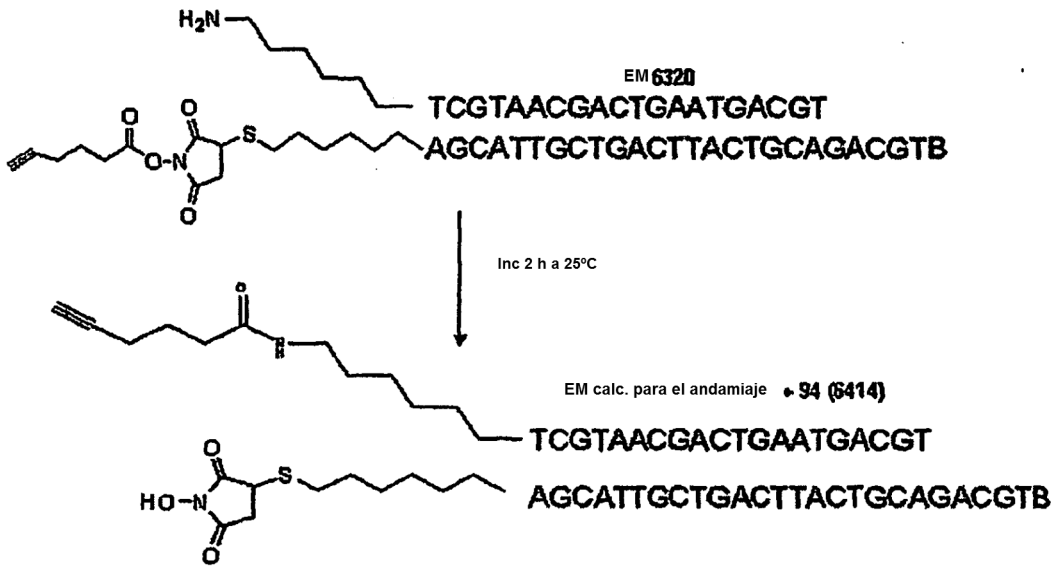
La muestra se analizó en un instrumento de espectroscopía de masas (Bruker Daltonics, Esquire 3000plus). La masa observada fue 6398,04 Da, que se corresponde bien con la masa calculada, 6400,00 Da. Por tanto, los espectros de EM de la molécula identificadora después de transferencia de la entidad funcional muestran una masa que se corresponde con la entidad funcional transferida en la molécula identificadora. Este ejemplo muestra que entidades funcionales pueden transferirse usando este sistema de una molécula del bloque constructivo y una molécula identificadora.



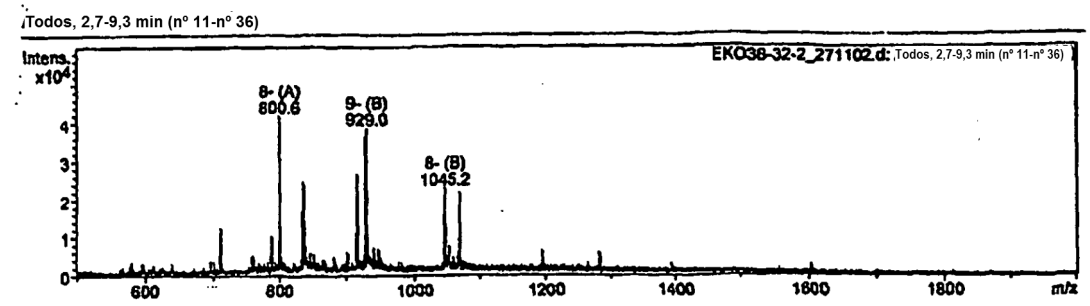
Componente	Masa de convolucionada	Molécula	Abundancia absoluta	Abundancia relativa
A	8368.93	[M - H]-	85789	99.30
B	6398.04	[M - H]-	77957	90.23

Otro ejemplo de transferencia de la entidad funcional se muestra más adelante usando el amino-oligonucleótido directamente como molécula identificadora. La entidad funcional usada en este experimento fue ácido 5-hexinoico, preparado como se muestra en el Ejemplo 2.

La hibridación se realizó usando 500 pmoles del bloque constructivo y 500 pmoles de las moléculas identificadoras en tampón MES 0,1 M incubado a 25ºC en un agitador durante 2 horas. La parte reactiva (entidad funcional) del bloque constructivo se transfirió al grupo amino en la molécula identificadora (véase más adelante). Después de la hibridación y transferencia, la muestra se purificó por filtración en gel en Micro-Spin y se analizó por EM. La muestra se preparó para análisis de EM usando cantidad igual de muestra (aproximadamente 100 pmoles) y resina de intercambio iónico y se incubó como mínimo 2 h a 25ºC en un agitador. Después de la incubación, la resina se eliminó por centrifugación y a 15 µl del sobrenadante se añadieron 7 µl de agua, 2 µl de piperidina e imidazol (cada uno 625 mM) y 24 ul de acetonitrilo.



La muestra se analizó en un instrumento de espectroscopía de masas (Bruker Daltonics, Esquire 3000plus). La masa observada fue 6411,96 Da, que se corresponde bien con la masa calculada, 6414 Da. Por tanto, los espectros de EM de la molécula identificadora después de la transferencia de la entidad funcional muestran una masa que se corresponde con la entidad funcional transferida sobre la molécula identificadora. Este ejemplo muestra que las entidades funcionales pueden transferirse usando este sistema de una molécula del bloque constructivo y una molécula identificadora.



Componente	Masa desconvolucionada	Molécula	Abundancia absoluta	Abundancia relativa
A	6411.96	[M - H]-	88999	98.85
B	8368.87	[M - H]-	84433	93.78

Ejemplo 4: Extensión de la molécula identificadora para transferir codones únicos

Después de la transferencia de la entidad funcional (FE) a la entidad de unión (EU) en la molécula identificadora, la molécula identificadora se extiende con el fin de transferir el único codón, que identifica la entidad funcional transferida, a la molécula identificadora. Esto se lleva a cabo añadiendo una polimerasa adecuada y un tampón de polimerasa que contiene los nucleótidos naturales (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). Esto extenderá la molécula identificadora en el extremo 3' hacia el extremo del extremo 5' de la molécula del bloque constructivo.

La extensión de la molécula identificadora para transferir el (los) codón (codones) único(s) se realiza preferentemente después de la transferencia de la FE como se muestra más adelante.

FE-AE-TCGTAACGACTGAATGACGT

-AGCATTGCTGACTTACTGCAGACGTB

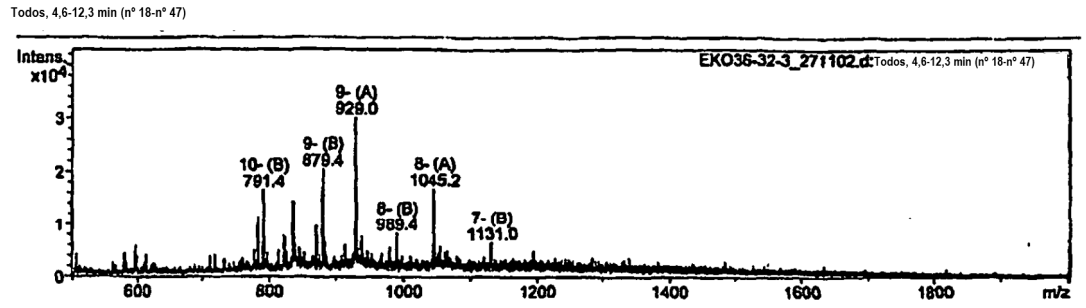
↓

FE-AE-TCGTAACGACTGAATGACGTCTGCT

-AGCATTGCTGACTTACTGCAGACGTB

La extensión se realizó usando 15 unidades de Taq polimerasa en un tampón que contenía 0,4 mM de cada nucleótido en un tampón de extensión (HEPES-KOH 20 mM, KCl 40 mM, $MgCl_2$ 8 mM, pH=7,4). Después de la reacción de extensión, la muestra se analizó usando EM. El análisis de EM se realizó usando aproximadamente 100 pmoles de mezcla de extensión purificada en la mitad de volumen de resina de intercambio iónico y se incubó como mínimo 2 h a 25ºC en un agitador. Después de la incubación, la resina se eliminó por centrifugación y 15 µl del sobrenadante se mezclaron con 7 µl de agua, 2 µl de piperidina e imidazol (cada uno 625 mM) y 24 µl de acetonitrilo. La muestra se analizó en un instrumento de espectroscopía de masas (Bruker Daltonics, Esquire 3000plus).

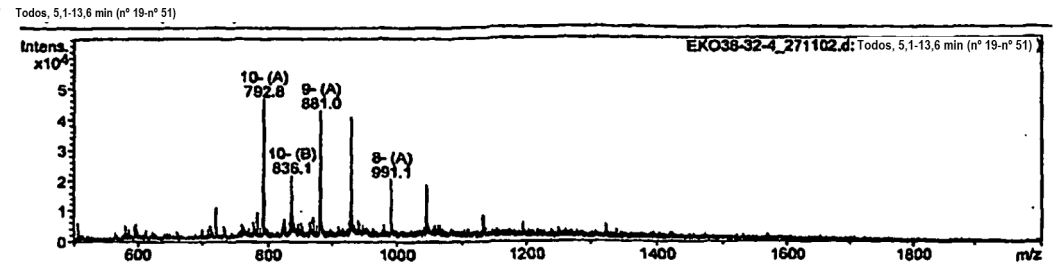
Los datos de EM para la extensión en la molécula identificadora con un ácido 4-pentinoico transferido se muestran a continuación.



Componente	Masa desconvolucionada	Molécula	Abundancia absoluta	Abundancia relativa
A	8368.79	[M - H]-	60417	98.68
B	7922.53	[M - H]-	51334	83.85

La masa observada fue 7922,53 Da, que se corresponde bien con la masa calculada, 7924,00 Da. Los espectros de EM de la molécula identificadora después de la reacción de transferencia de la entidad funcional y la reacción de extensión de la región codificante (el único codón) mostraron una masa que se correspondía con la entidad funcional transferida y la extensión en la molécula identificadora. Este ejemplo muestra que entidades funcionales pueden transferirse usando este sistema con una molécula del bloque constructivo más larga que la molécula identificadora y que la molécula identificadora puede extenderse usando una polimerasa después del procedimiento de transferencia. Esto muestra la posibilidad para transferir tanto la entidad funcional como el único codón del mismo bloque constructivo a una molécula identificadora.

Otro ejemplo que muestra la transferencia y la extensión es para el bloque constructivo con la entidad funcional ácido 5-hexinoico. Los datos de EM para la extensión en la molécula identificadora con un ácido 5-hexinoico transferido se muestran a continuación.



Componente	Masa desconvolucionada	Molécula	Abundancia absoluta	Abundancia relativa
A	7936.99	[M - H]-	107170	97.88
B	8369.04	[M - H]-	79840	72.92

La masa observada fue 7936,99 Da, que se corresponde bien con la masa calculada, 7938,00 Da. Los espectros de EM de la molécula identificadora después de la reacción de transferencia de la entidad funcional y la reacción de extensión de la región codificante (el único codón) mostraron una masa que se correspondía con la entidad funcional transferida y la extensión en la molécula identificadora. Este ejemplo también muestra que entidades funcionales pueden transferirse usando este sistema con una molécula del bloque constructivo más larga que la molécula identificadora y la molécula identificadora puede extenderse usando una polimerasa después del procedimiento de transferencia. Esto ejemplifica la posibilidad para transferir tanto la entidad funcional como el único codón de una molécula del bloque constructivo a una molécula identificadora.

Ejemplo 5: Diseño de bibliotecas

La molécula identificadora puede diseñarse para operar de forma óptima bajo diversas condiciones. Sin embargo, debe contener algunos elementos que son vitales para la función. La molécula identificadora debe comprender una secuencia que puede hibridarse con el bloque constructivo y una entidad de unión que puede acomodar diversas entidades funcionales. Más adelante hay un ejemplo sobre cómo una molécula identificadora puede diseñarse en la región de extensión. La región que se extiende durante cada etapa de transferencia y codificación puede diseñarse usando diversos enfoques. Y, lo que es más importante, debe haber un apareamiento de pares de bases entre el bloque constructivo y el identificador para permitir la eficiente extensión usando una polimerasa. Esto puede llevarse a cabo usando tanto una región que es constante, la región de unión como se describe en la Figura 3 (A), como una región que permite la unión a cualquier secuencia dada, también mostrada en la Figura 3 (B). También puede usarse una combinación de estos enfoques.

La primera etapa en el procedimiento de extensión no necesita región de unión especial debido al apareamiento del identificador y las moléculas del bloque constructivo (etapa 1 mostrada a continuación). Sin embargo, las etapas posteriores necesitan una región de unión suficiente complementaria a la molécula identificadora para permitir la hibridación debido a que la enzima, preferentemente una polimerasa, debe poder unirse con el dúplex y realizar una extensión. El ejemplo más adelante muestra cuatro etapas en el procedimiento de codificación. Este procedimiento de extensión puede continuar para obtener el número adecuado de transferencia de bloques constructivos. La región de unión en este ejemplo contiene 6 nucleótidos, pero esto puede variarse dependiendo del diseño de los bloques constructivos.

Una posibilidad de acomodar los posibles desapareamientos en el anti-codón previo es usar nucleobases universales, es decir, una nucleobase con la capacidad de aparear bases con más de una de las nucleobases naturales. Una base posible es inosina que puede formar pares de bases con citidina, timidina y adenosina (aunque el apareamiento inosina:adenosina supuestamente no se ajusta bastante correctamente en el ADN bicatenario, por lo que pueden pagarse las consecuencias energéticas cuando la hélice sobresale en este apareamiento purina:purina). En principio es posible usar cualquier diseño que permita la extensión de los únicos codones.

El identificador y bloques constructivos:

Identificador:
GCA CAC ATG CAT GAG CAC AC G

Biblioteca de bloques constructivos para la etapa 1:
CGT GTG TAC GTA CTC GTG TG **CGT GTG** NNNNNN **TGA CTA**
Biblioteca de bloques constructivos para la etapa 2:
CGT GTG TAC GTA CTC GTG TG **CGT GTG** IIIIII **TGA CTA** NNNNNN **TGC AAC**
Biblioteca de bloques constructivos para la etapa 3:
CGT GTG TAC GTA CTC GTG TG **CGT GTG** IIIIII **TGA CTA** IIIIII **TGC AAC** NNNNNN **ACT TTG**
Biblioteca de bloques constructivos para la etapa 4:

CGT GTG TAC GTA CTC GTG TG CGT GTG IIIIII TGA CTA IIIIII TGC AAC IIIIII ACT TTG NNNNNN GAATTC GGC AAT ACG CAT TAC CG
EcoRI

N: Una nucleobase seleccionada de A, G, T, C.
I: Inosina

Ejemplo de codificación y extensión de la región codificante por transferencia de los únicos codones en cada etapa:

1.

GCA CAC ATG CAT GAG CAC AC G
CGT GTG TAC GTA CTC GTG TG CGT GTG TCGATG TGA CTA

2.

GCA CAC ATG CAT GAG CAC AC GCA CAC AGCTAC ACT GAT
CGT GTG TAC GTA CTC GTG TG CGT GTG TCGATG TGA CTA

3.

GCA CAC ATG CAT GAG CAC AC GCA CAC AGCTAC ACT GAT
CGT GTG TAC GTA CTC GTG TG CGT GTG IIIIII TGA CTA CAATCG TGC AAC

4.

GCA CAC ATG CAT GAG CAC AC GCA CAC AGCTAC ACT GAT GTTAGC ACG TTG
CGT GTG TAC GTA CTC GTG TG CGT GTG IIIIII TGA CTA CAATCG TGC AAC

5.

GCA CAC ATG CAT GAG CAC AC GCA CAC AGCTAC ACT GAT GTTAGC ACG TTG
CGT GTG TAC GTA CTC GTG TG CGT GTG IIIIII TGA CTA IIIIII TGC AAC CTCTGT ACT TTG

6.

GCA CAC ATG CAT GAG CAC AC GCA CAC AGCTAC ACT GAT GTTAGC ACG TTG GAGACA TGA AAC
CGT GTG TAC GTA CTC GTG TG CGT GTG IIIIII TGA CTA IIIIII TGC AAC CTCTGT ACT TTG

7.

GCA CAC ATG CAT GAG CAC AC GCA CAC AGCTAC ACT GAT GTTAGC ACG TTG GAGACA TGA AAC
CGT GTG TAC GTA CTC GTG TG CGT GTG IIIIII TGA CTA IIIIII TGC AAC IIIIII ACT TTG TAAGCT [illegible] GGC AAT ACG CAT TAC CG
EcoRI

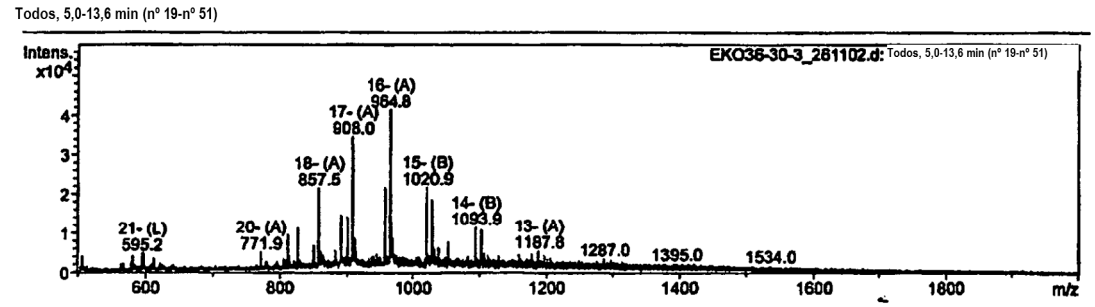
8.

GCA CAC ATG CAT GAG CAC AC GCA CAC AGCTAC ACT GAT GTTAGC ACG TTG GAGACA TGA AAC ATTCGA [illegible] CCG TTA TGC GTA ATG GC
CGT GTG TAC GTA CTC GTG TG CGT GTG IIIIII TGA CTA IIIIII TGC AAC IIIIII ACT TTG TAAGCT [illegible] GGC AAT ACG CAT TAC CG

La extensión se realizó usando 60 pmoles de cebador y molde en un tampón de extensión (HEPES-KOH 20 mM, KCl 40 mM, $MgCl_2$ 8 mM, pH=7,4) y DTT 10 mM. Para la extensión en este experimento se usaron 20 U de AMV-RT (Promega M510B).

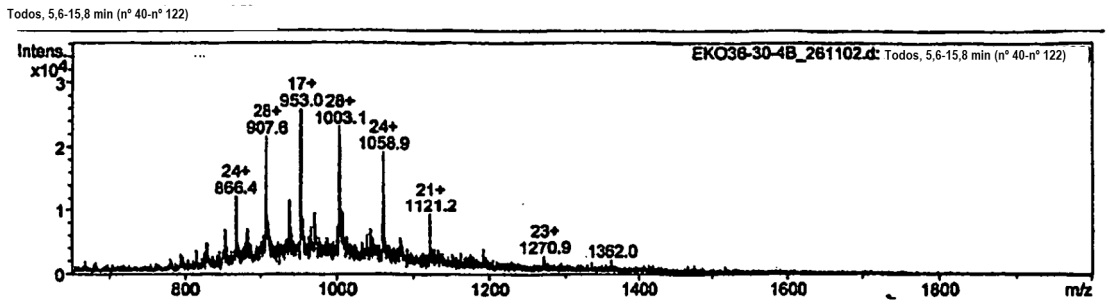
El análisis de EM se realizó usando aproximadamente 100 pmoles de reacciones de extensión en la mitad de volumen de resina de intercambio iónico y se incubó como mínimo 2 h a 25ºC en un agitador. Después de la incubación, la resina se eliminó por centrifugación y 15 µl del sobrenadante se mezclaron con 7 µl de agua, 2 µl de piperidina e imidazol (cada uno 625 mM) y 24 µl de acetonitrilo. La muestra se analizó usando un instrumento de espectroscopía de masas (Bruker Daltonics, Esquire 3000plus).

La extensión de la combinación de cebador/molde en la etapa 3 como se muestra en el ejemplo anterior se muestra en la gráfica de datos de EM más adelante. El análisis muestra tanto la masa del molde, 15452,14 Da (esperada 15453,86 Da) como el cebador extendido, 15328,92 (esperada 15331,90 Da). No se identificó masa para el cebador no extendido (o parcialmente extendido), indicando una extensión completa del cebador. Este experimento ejemplifica la posibilidad para transferir el codón a una molécula identificadora incluso cuando el anti-codón vaya precedido de otro anti-codón.



Componente	Masa desconvolucionada	Molécula	Abundancia absoluta	Abundancia relativa	
A	15452.14	[M - H]-	161269	100.00	- EKO46
B	15328.92	[M - H]-	89333	55.39	- EXT.

En un experimento separado se examinó la extensión de la combinación de cebador/molde en la etapa 7 como se ha descrito anteriormente. Los datos de EM se muestran en la gráfica más adelante. Los datos muestran la masa para el cebador extendido, 28058,14 Da (esperada 28052,30 Da). De nuevo, no se identificó masa para el cebador no extendido (o parcialmente extendido), indicando una extensión completa del cebador. Este experimento ejemplifica la posibilidad de transferir el codón a una molécula identificadora incluso cuando el anti-codón vaya precedido de múltiples anti-codones. Por tanto, es factible un procedimiento completo de hacer que la región codificante contenga los únicos codones para una biblioteca.



Componente	Masa desconvolucionada	Molécula	Abundancia absoluta	Abundancia relativa
A	16184.59	[M + H]+	48389	66.47
B	28058.14	[M + H]+	64120	88.08

+ EtI.

En conclusión, estos experimentos muestran que la polimerasa puede extender la secuencia del anti-codón único si se usa un único codón adyacente con una hélice que comprende inosinas. Esto permitirá la transferencia de los anti-codones únicos a la molécula identificadora en cada etapa de transferencia de las entidades funcionales. Este experimento muestra la posibilidad de usar una región de unión después de la región anti-codón que precede al anti-codón que va a extenderse en el procedimiento de codificación. El mismo enfoque puede usarse en las etapas consecutivas para permitir la codificación de una molécula con múltiples entidades funcionales unidas a la entidad de unión.

Después de generarse la biblioteca y realizarse la primera ronda de selección, las moléculas identificadoras seleccionadas pueden usarse como fuente para la siguiente ronda de bibliotecas. Las moléculas identificadoras seleccionadas pueden usarse en rondas de selección posteriores usando, por ejemplo, amplificación por PCR y digestión con enzima de restricción como se muestra más adelante.

Producto de PCR de una nueva molécula identificadora:

GCA CAC AGCTAC **ACT GAT** GTTAGC **ACG TTG** GAGACA **TGA AAC** ATTCGA
CAA TTC CCG TTA TGC GTA ATG GC

Corte con EcoRI para obtener la nueva molécula identificadora:

GCA CAC AGCTAC **ACT GAT** GTTAGC **ACG TTG** GAGACA **TGA AAC** ATTCGA C

Esta nueva molécula identificadora contendrá codones únicos que codifican moléculas presentadas seleccionadas en la ronda previa de selección. Esta molécula identificadora guiará el ensamblaje de la siguiente biblioteca para obtener una biblioteca que tiene entidades funcionales preferidas. Sin embargo, la codificación correcta todavía se determinará por el procedimiento de extensión.

Ejemplo 6. Ligador flexible y estructura de salida de bucle en la codificación por el procedimiento de extensión.

El procedimiento de codificación puede diseñarse para permitir la formación de una región de salida de bucle en la molécula identificadora. El procedimiento de codificación también puede realizarse usando un ligador flexible entre la región identificadora complementaria y la región de unión complementaria.

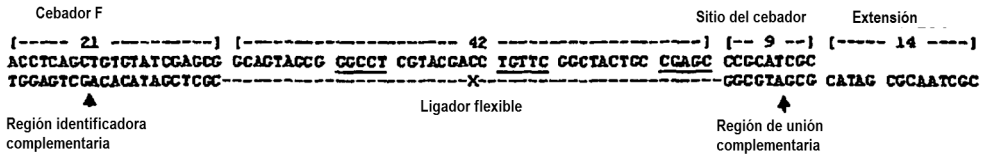
La estrategia de salida de bucle se muestra en la Fig. 18 en la que la región identificadora se hibrida con la región identificadora complementaria y la región de unión se hibrida con la región de unión complementaria. Esto formará un estiramiento de nucleótidos monocatenarios que no participa directamente en el procedimiento de hibridación. Esta hibridación permitirá la transferencia por extensión de la región anti-codón y preferentemente otra región de unión que puede usarse en la siguiente ronda de extensión. La región de unión debe ser suficientemente larga para garantizar la correcta hibridación y la extensión productiva. La extensión será incompleta si la región de unión es demasiado corta. Está dentro de las capacidades del experto determinar por simples experimentos de ensayo y error la longitud de la región de unión. Normalmente son suficientes 5 a 7 nucleótidos para la región de unión.

Otro ejemplo es usar un ligador flexible entre la región identificadora complementaria y la región de unión complementaria. Esto se muestra en la Fig. 19. La región identificadora garantizará la hibridación eficiente del bloque constructivo con el identificador. Entonces, el ligador flexible asegurará que la región de unión complementaria se hibride con la región de unión para permitir la extensión. El ligador puede ser cualquier tipo de estructura química que permita el espacio entre la región de unión complementaria y la región de unión

complementaria, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), poliaminas, polinucleótidos (por ejemplo ADN, ARN, LNA) y poli(hidratos de carbonos). La longitud del ligador puede variar, pero debe ser posible una hibridación simultánea de la región identificadora y la región de unión.

Se probó el sistema que usa un ligador flexible usando diferentes ligadores de PEG y diferente longitud de la región de unión complementaria. Los ligadores de PEG (Spacer Phosphoramidite 9 y 18) usados en este ejemplo se obtuvieron de Glen Research (nº de catálogo 10-1909 y 10-1918, respectivamente).

La secuencia de la molécula identificadora extendida se mostró más adelante. Hay una hibridación de 21 nucleótidos de longitud entre la región identificadora y la región identificadora complementaria. Entonces, hay una región de 42 nucleótidos que representa los codones extendidos en la ronda previa de codificación. La región de unión complementaria que promueve la extensión tuvo una región de 9 nucleótidos, también se probó una región de 5 y 14 nucleótidos para la extensión. Finalmente hay una región de 14 nucleótidos que permite la extensión.



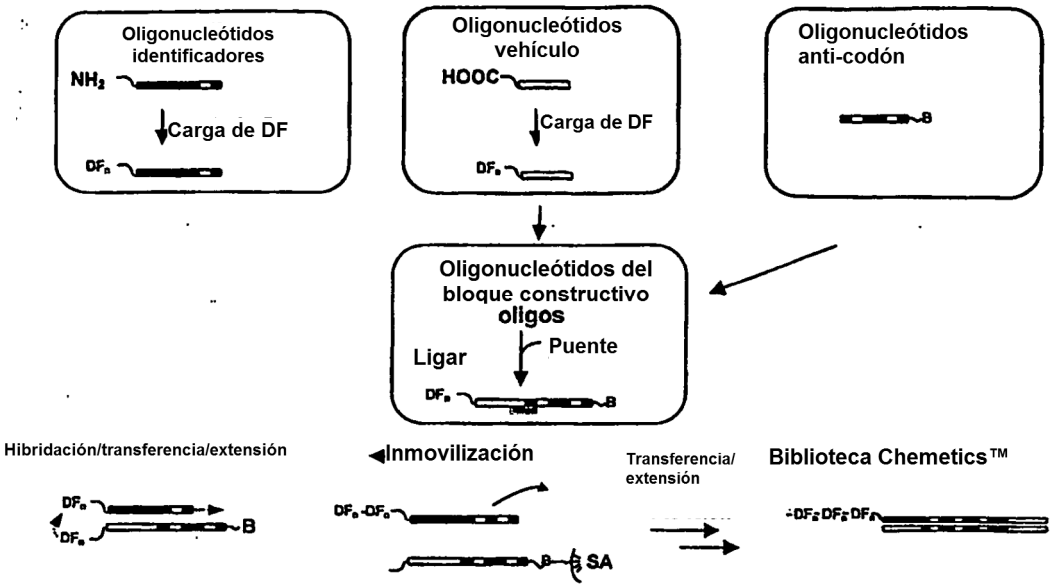
El oligonucleótido del bloque constructivo con un ligador flexible se marcó en 5' con ^{32}P usando T4 polinucleótido cinasa usando el protocolo convencional (Promega, nº de cat. 4103). Esta molécula identificadora se hibridó con el bloque constructivo en el tampón de extensión (HEPES 20 mM, KCl 40 mM, $MgCl_2$ 8 mM, pH 7,4, DTT 10 mM) mediante calentamiento a 80ºC durante 2 min y luego lentamente se enfrió a aproximadamente 20ºC. La extensión se realizó usando aproximadamente 20 unidades de secuenasa (USB) a 30ºC durante 1 hora. Los complejos de oligonucleótidos se purificaron entonces usando filtración en gel en Micro-Spin (BioRad). Se añadió colorante formamida a las muestras antes de cargarse sobre un gel de 10% de urea-poliacrilamida. El gel se reveló usando autorradiografía (Kodak, película BioMax). El resultado de este experimento se muestra en la Fig. 20.

El gel muestra: carril 1, una mezcla de los tres oligonucleótidos del bloque constructivo marcados en 5' (^{32}P) con 5, 9 ó 14 nucleótidos en la región de unión; carril 2, extensión usando un oligonucleótido del bloque constructivo con un ligador de espacio de 9 y una región de unión de 18 nucleótidos; carril 3, extensión usando un oligonucleótido del bloque constructivo con un ligador de espacio de 9 y una región de unión de 9 nucleótidos; carril 4, extensión usando un oligonucleótido del bloque constructivo sin ligador y una región de unión de 9 nucleótidos; carril 5, extensión usando un oligonucleótido del bloque constructivo con un ligador de espacio de 9 y una región de unión de 14 nucleótidos; carril 6, extensión usando un oligonucleótido del bloque constructivo con un ligador de espacio de 18 y una región de unión de 14 nucleótidos; carril 7, extensión usando un oligonucleótido del bloque constructivo sin ligador y una región de unión de 14 nucleótidos; carril 8, extensión usando un oligonucleótido del bloque constructivo sin ligador y una región de unión de 5 nucleótidos.

El resultado muestra que puede llevarse a cabo una extensión eficiente usando un ligador flexible junto con una región de unión. El resultado también muestra que la extensión es posible sin el ligador flexible y sólo una pequeña región de unión (5 nucleótidos). El último resultado es un ejemplo del sistema de salida de bucle descrito al principio de este ejemplo en el que la región de salida de bucle tiene los 42 nucleótidos descritos en la secuencia anteriormente.

Ejemplo 7: Selección de un ligando de la integrina αVβ3 de una biblioteca de moléculas pequeñas de 484 miembros codificada por Chemetics™.

Visión general del procedimiento



DF: Fragmento de fármaco / entidad funcional
B: Biotina
SA: Estreptavidina

El procedimiento para producir una biblioteca de complejos bifuncionales, en la que cada miembro de la biblioteca comprende una molécula sintética y un identificador que puede descodificarse para establecer la historia sintética de la molécula sintética, comprende varias etapas, ejemplificadas más adelante. En una primera etapa (procedimiento general 1), cuatro oligonucleótidos identificadores diferentes se cargan con una molécula de andamiaje o fragmento de fármaco. En este ejemplo, la carga se realiza usando un grupo amino en el oligonucleótido identificador como punto de unión para el fragmento de fármaco / molécula de andamiaje. Los identificadores pueden considerarse los complejos bifuncionales nacientes.

Para preparar los oligonucleótidos del bloque constructivo, oligonucleótidos vehículo idénticos se cargan inicialmente con once fragmentos de fármaco diferentes usando el procedimiento general 2. Los once oligonucleótidos vehículo cargados se ligan entonces a oligonucleótidos anti-codón de la primera y la segunda ronda usando el procedimiento general 3, obteniéndose 11 bloques constructivos para la primera ronda y once bloques constructivos para la segunda ronda.

La formación de bibliotecas se describe en detalle en el procedimiento general 4 e incluye el mezclado de los cuatro oligonucleótidos identificadores diferentes con los once bloques constructivos diferentes de la primera ronda. Para sesgar la biblioteca, uno de los identificadores y uno de los bloques constructivos de la primera ronda se añadieron en una cantidad 100 veces inferior a la cantidad de los otros componentes. En condiciones que proporcionan la hibridación entre los identificadores y los bloques constructivos se efectúa una reticulación entre las moléculas de andamiaje del oligonucleótido identificador y los fragmentos de fármaco. Los oligonucleótidos identificadores se extendieron entonces usando una polimerasa y usando el anti-codón del bloque constructivo como identificador. Después de la extensión, el fragmento de fármaco se libera del bloque constructivo por la escisión de un enlace entre el fragmento de fármaco y el oligonucleótido. El oligonucleótido del bloque constructivo gastado se extrae por perlas de estreptavidina.

La segunda ronda incluye la adición de bloques constructivos al complejo de identificador naciente-molécula sintética obtenido en la primera ronda. Para sesgar la biblioteca, uno de los once bloques constructivos de la segunda ronda se añadió en una cantidad 100 veces inferior a la cantidad usada para los otros 10 bloques constructivos. La segunda ronda sigue el mismo esquema que se representa anteriormente para la primera ronda. La biblioteca formada tiene 4*11*11 = 484 miembros. Uno de los miembros, que es un ligando desconocido para la diana, sólo aparece en una concentración de la biblioteca de uno de los $3 * 10^8$ complejos bifuncionales.

Entonces, la biblioteca se somete a un procedimiento de selección como se desvela en el procedimiento general 5. La selección implica la adición de la biblioteca a pocillos recubiertos con diana inmovilizada. Después de la incubación de la biblioteca con la diana, los miembros de no unión de la biblioteca se eliminan por lavado y se escinde un enlace entre la molécula sintética y el identificador. Los identificadores separados por escisión se recogieron y se amplificaron por PCR. Los identificadores amplificados se descodificaron usando el procedimiento general 6.

Procedimiento general 1: Carga de oligonucleótidos identificadores

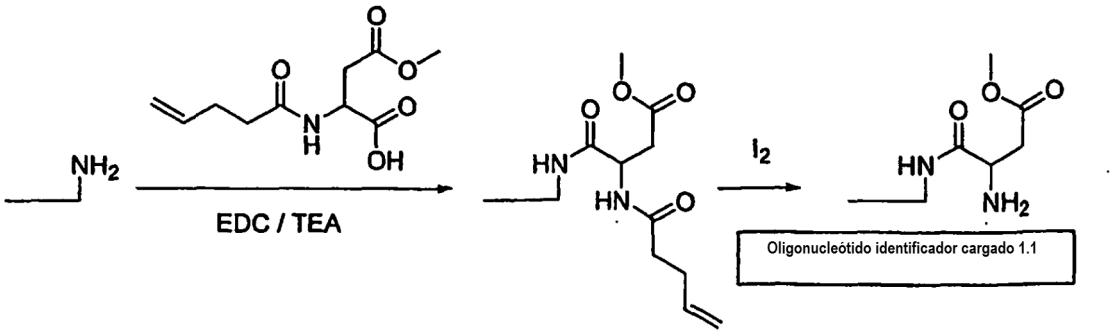
Se mezclaron 10 µl de trietanolamina (TEA) (0,1 M en DMF) con 10 µl de bloque constructivo (BB) con pent-4-enal como grupo de protección de amina (0,1 M en DMSO). De esta mezcla se tomaron 6,7 µl y se mezclaron con 3,3 µl de EDC [clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida] (0,1 M en DMF) y se incubaron 30 minutos a 25ºC. Se añadieron 10 µl de la mezcla de bloque constructivo-EDC-TEA a 10 µl del amino-oligonucleótido en tampón HEPES 0,1 M (ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico, SIGMA), pH 7,5, y se incubaron con el oligonucleótido durante 30 minutos.

Durante esta media hora se mezclaron otros 6,7 µl de la mezcla de BB-TEA con 3,3 µl de EDC (0,1 M en DMF) y se incubaron durante 30 minutos a 25ºC. Entonces se añadieron 10 µl de esta segunda mezcla de BB-EDC-TEA a la mezcla de amino-oligonucleótido junto con 10 µl de tampón HEPES 0,1 M para mantener una relación 1:1 de DMSO/DMF:H_2O. Entonces, la mezcla se incubó durante 30 minutos.

Durante esta media hora se mezclaron otros 6,7 µl de la mezcla de BB-TEA con 3,3 µl de EDC (0,1 M en DMF) y se incubaron durante 30 minutos a 25ºC. Entonces se añadieron 10 µl de esta tercera mezcla de BB-EDC-TEA a la mezcla de amino-oligonucleótido junto con 10 µl de tampón HEPES 0,1 M para mantener una relación 1:1 de DMSO/DMF:H_2O. Entonces, la mezcla se incubó durante 30 minutos.

Entonces, el oligonucleótido cargado se purificó por filtración en gel con columnas (Biospin P-6, Bio-Rad) equilibradas con agua. El grupo de protección de amina pent-4-enal se eliminó entonces mediante la adición de 0,25 volúmenes de I_2 25 mM en 1:1 de agua:tetrahidrofurano (THF) e incubación a 37ºC durante 2 horas. Entonces, la mezcla se purificó por filtración en gel con columnas de centrifugación (Biospin P-6, BioRad) equilibradas con agua. Los oligonucleótidos identificadores cargados se analizaron por EM-ES.

Ejemplo 7.1.1



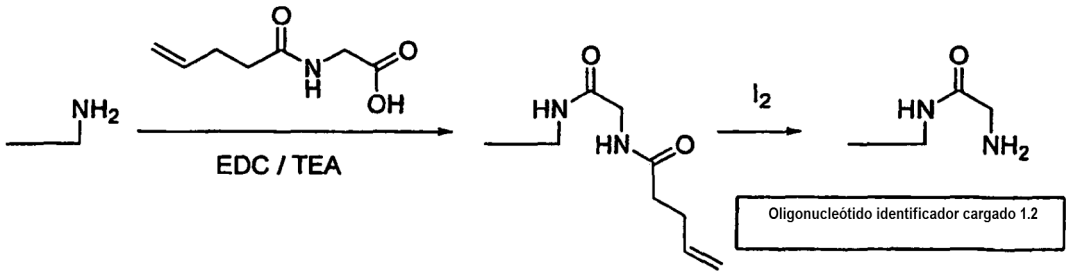
Oligonucleótido identificador cargado 1.1 analizado por EM-ES:

Masa esperada: 11709 Da
Masa observada: 11708 Da

Ejemplo 7.1.2

Oligonucleótido identificador 1.2:5'- **NSP**ACCTCAGCTGTGTATCGAGCGGCAGCAGTGCCG-TCG-3'

N: 5'-Amino-modificador 5 (nº de cat. de Glen Research 10-1905-90)
S: Spacer C3 CPG (nº de cat. de Glen Research 20-2913-01)
P: PC Spacer Phosphoramidite (nº de cat. de Glen Research 10-4913-90)



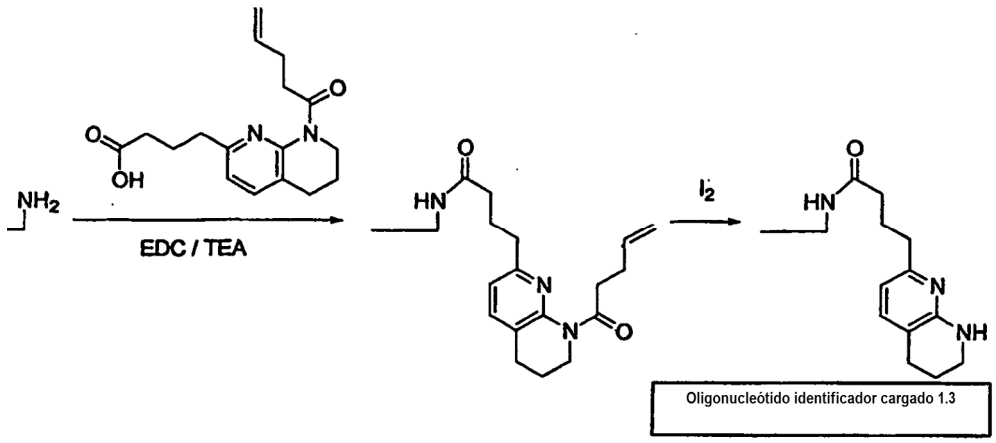
Oligonucleótido identificador cargado 1.2 analizado por EM-ES:

Masa esperada: 11647 Da
Masa observada: 11641 Da

Ejemplo 7.1.3

Oligonucleótido identificador 1.3: 5'- **NSP**ACCTCAGCTGTGTATCGAGCGGCAGCGCACACG-TCG-3'

N: 5'-Amino-modificador 5 (nº de cat. de Glen Research 10-1905-90)
S: Spacer C3 CPG (nº de cat. de Glen Research 20-2913-01)
P: PC Spacer Phosphoramidite (nº de cat. de Glen Research 10-4913-90)



Oligonucleótido identificador cargado 1.2 analizado por EM-ES:

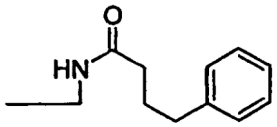
Masa esperada: 11761 Da
Masa observada: 11759 Da

Ejemplo 7.1.4

Oligonucleótido identificador 1.4: 5'- **NSP**ACCTCAGCTGTGTATCGAGCGGCAGCGGATACG-TCG-3'

N: 5'-Amino-modificador 5 (nº de cat. de Glen Research 10-1905-90)
S: Spacer C3 CPG (nº de cat. de Glen Research 20-2913-01)
P: PC Spacer Phosphoramidite (nº de cat. de Glen Research 10-4913-90)

Oligonucleótido identificador cargado:



Masa esperada: 11775 Da
Masa observada: 11775 Da

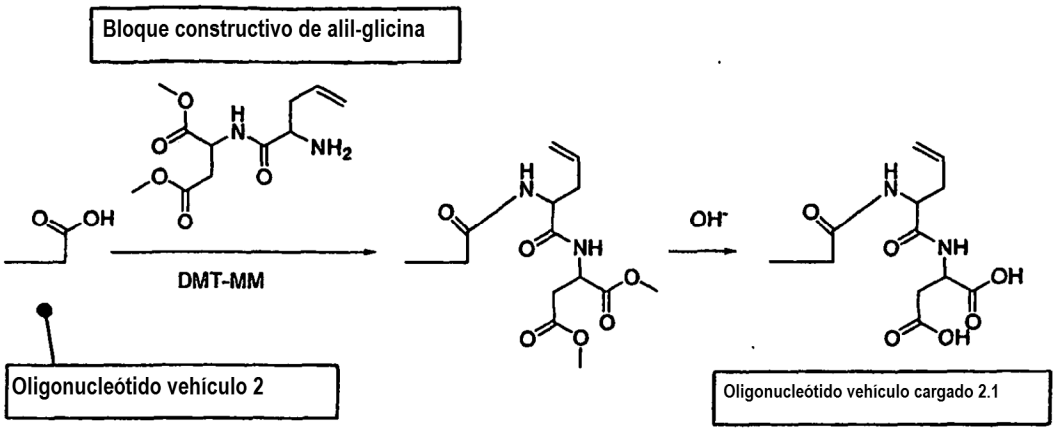
Procedimiento general 2: Carga del oligonucleótido vehículo

Se liofilizaron 10-15 nmoles del oligonucleótido vehículo 2 y se redisolvieron en 27,5 µl de H_2O. A ésta se añadieron 7,5 µl de HEPES 1 M a pH 7,5, 10 µl de bloque constructivo (alil-glicina) protegido con 2-amino-pent-4-enal (0,1 M en sulfóxido de dimetilo) y 5 µl de DMT-MM [cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-tiazin-2-il)-4-metilmorfolinio] (0,5 M en agua). La mezcla se incubó 4-16 horas a 25-30ºC. El oligonucleótido se purificó por filtración en gel (Biospin P-6, BioRad). Para convertir el resto éster metílico del bloque constructivo en un ácido carboxílico se añadieron 5 µl de NaOH 0,4 M y la mezcla se incubó 20 min a 80ºC. Entonces, la mezcla se neutralizó añadiendo 10 µl de HEPES 0,5 M a pH 7,5 y 5 µl de HCl 0,4 M. El oligonucleótido cargado del bloque constructivo se purificó por filtración en gel (Biospin P-6, BioRad) y se analizó por EM-ES

Oligonucleótido vehículo 2: 3'-2GGAGTCGACACATAGCTCGCp-5'

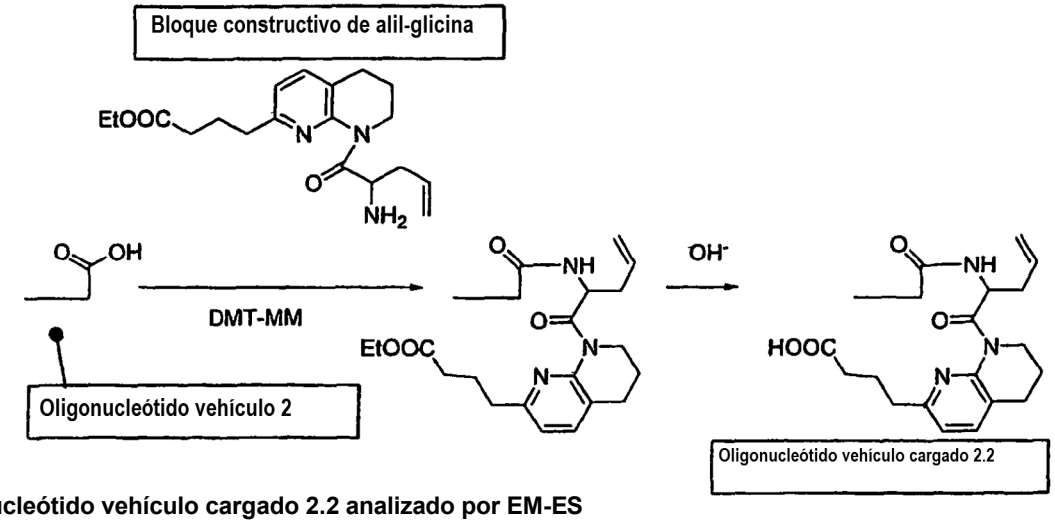
2: Carboxi dT (nº de cat. de Glen Research 10-1035-90)
p: 5'-fosfato

Ejemplo 7.2.1



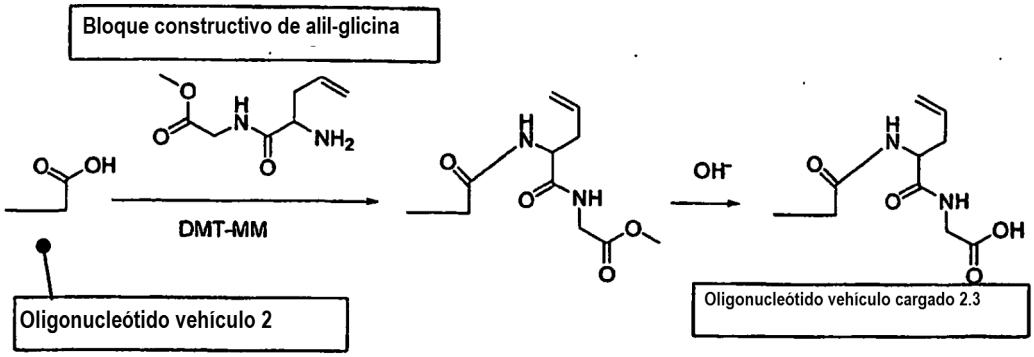
Oligonucleótido vehículo cargado 2.1 analizado por EM-ES
Masa esperada : 6856 Da
Masa observada: 6857 Da

Ejemplo 7.2.2



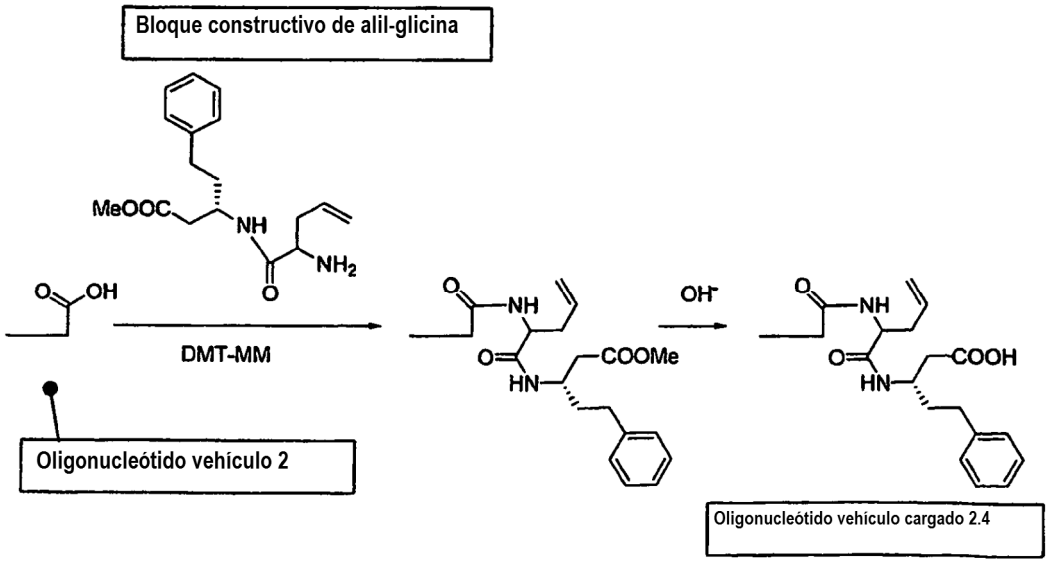
Oligonucleótido vehículo cargado 2.2 analizado por EM-ES
Masa esperada : 6944 Da
Masa observada: 6945 Da

Ejemplo 7.2.3



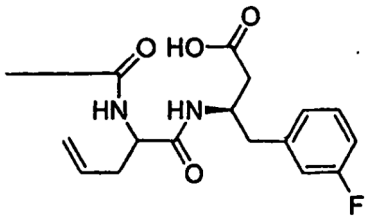
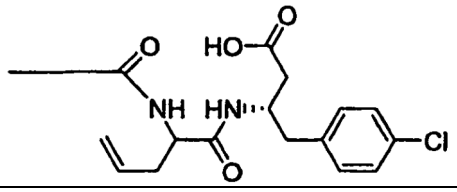
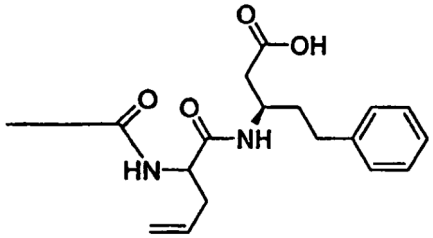
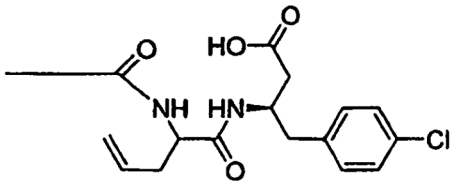
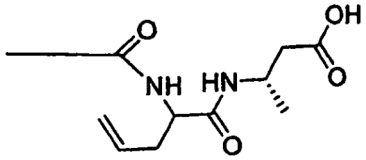
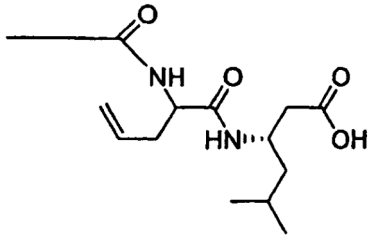
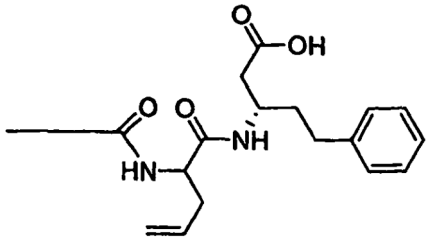
Oligonucleótido vehículo cargado 2.3 analizado por EM-ES
Masa esperada : 6798 Da
Masa observada: 6800 Da

Ejemplo 7.2.4



Oligonucleótido vehículo cargado 2.4 analizado por EM-ES
Masa esperada : 6917 Da
Masa observada: 6919 Da

Tabla I

Ejemplo de oligonucleótidos vehículo	Estructura del oligonucleótido vehículo cargado	Masa esperada	Masa observada
7.2.5		6924	6923
7.2.6		6940	6939
7.2.7		6920	6919
7.2.8		6940	6939
7.2.9		6830	6829
7.2.10		6871	6871
7.2.11		6920	6919

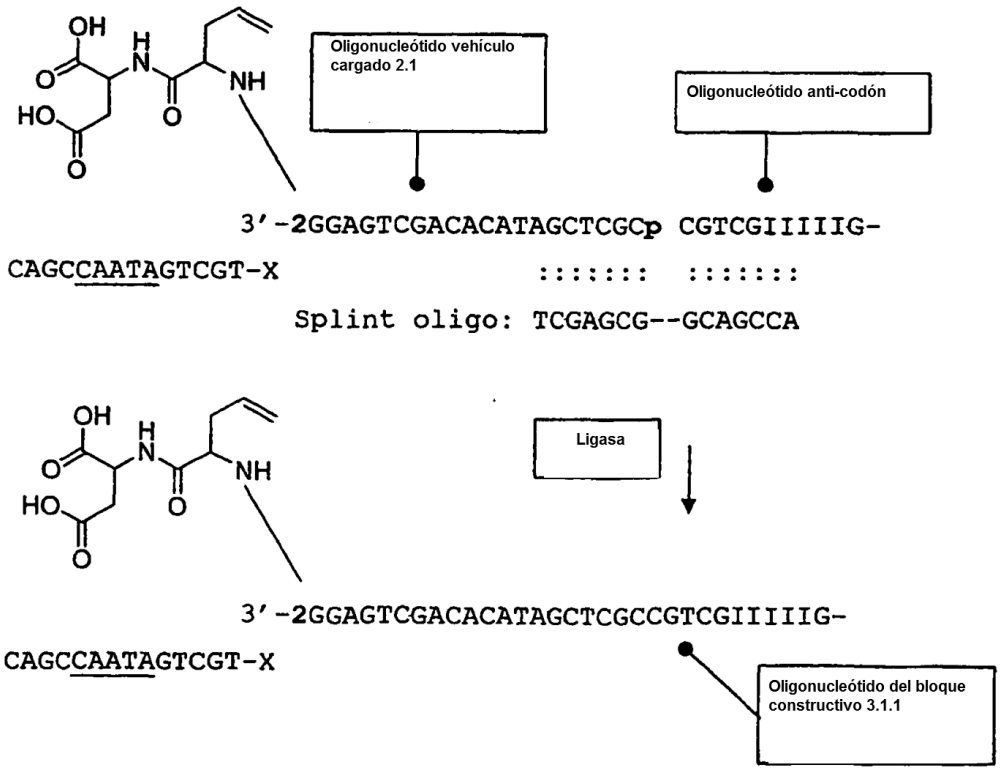
Procedimiento general 3: Ligación de oligonucleótido anti-codón con oligonucleótido vehículo cargado

Se mezclaron 500 pmoles de oligonucleótido vehículo cargado con 750 pmoles de oligonucleótido anti-codón y 750 pmoles de oligonucleótido de puente. La mezcla se liofilizó y se redisolvió en 15 µl de agua. Los oligonucleótidos se

hibridaron mediante calentamiento y enfriamiento lentamente a 20ºC. Se añadieron 15 µl de mezcla de TaKaRa ligasa (Takara Bio Inc) y la reacción se incubó a 20ºC durante 1 hora. La mezcla se purificó por filtración en gel (Biospin P-6, BioRad) y la eficiencia de la ligación se comprobó ejecutando una alícuota en un gel Novex TBE-UREA (Invitrogen).

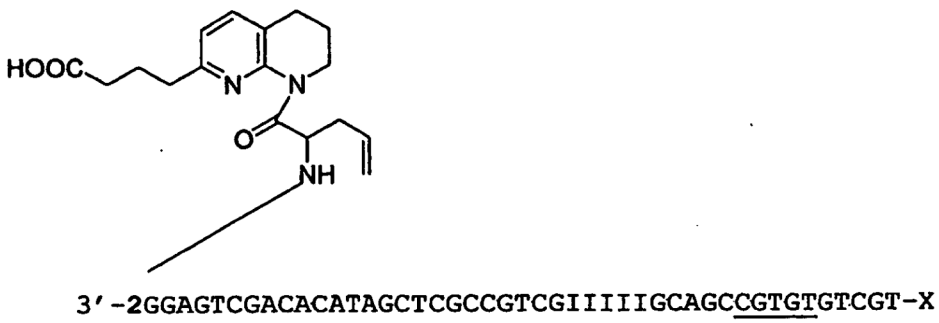
Ejemplos de oligonucleótidos del bloque constructivo para la primera ronda de codificación

Ejemplo 7.3.1.1



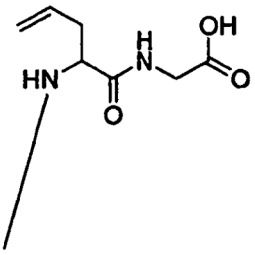
2: Carboxi dT (nº de cat. de Glen Research 10-1035-90)
P: 5'-fosfato
X: 5'-biotina
Eficiencia de ligación: > 95 %

Ejemplo 7.3.1.2



Eficiencia de ligación: > 95 %

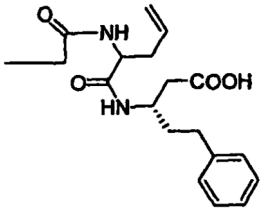
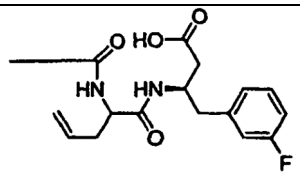
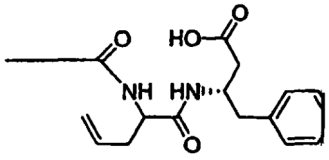
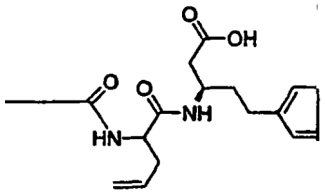
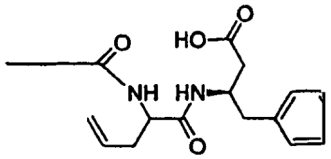
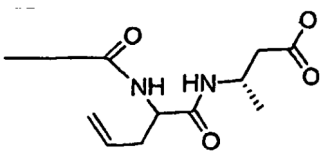
Ejemplo 7.3.1.3

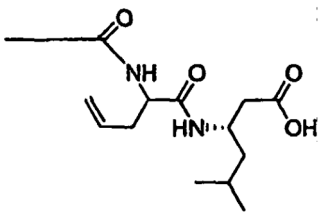
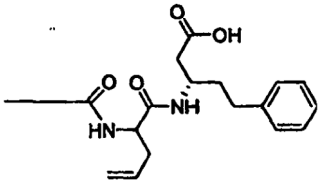


3′-2GGAGTCGACACATAGCTCGCCGTCGIIIIIGCAGCTCACGGTCGT-X

Eficiencia de ligación: > 95 %

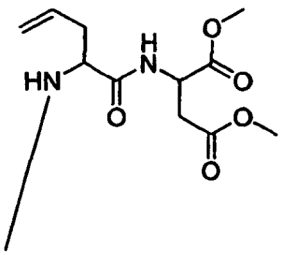
Tabla II

Ejemplo de oligonucleótidos del bloque constructivo	Estructura del fragmento de fármaco cargado	Secuencia 2 del oligonucleótido del bloque constructivo: Carboxi dT (nº de cat. de Glen Research 10-1035-90) X: 5'-biotina	Eficiencia de ligación
7.3.1.4		3′-2GGAGTCGACACATAGCTCGCCGTCGIIIIIGCAGCCCTATGTCGT-X	>95%
7.3.1.5		3′-2GGAGTCGACACATAGCTCGCCGTCGIIIIIGCAGCGCGACGTCGT-X	>95%
7.3.1.6		3′-2GGAGTCGACACATAGCTCGCCGTCGIIIIIGCAGCGACCAGTCGT-X	>95%
7.3.1.7		3′-2GGAGTCGACACATAGCTCGCCGTCGIIIIIGCAGCACAAGGTCGT-X	>95%
7.3.1.8		3′-2GGAGTCGACACATAGCTCGCCGTCGIIIIIGCAGCTGGACGTCGT-X	>95%
7.3.1.9		3′-2GGAGTCGACACATAGCTCGCCGTCGIIIIIGCAGCGCTCGGTCGT-X	>95%

Ejemplo de oligonucleótidos del bloque constructivo	Estructura del fragmento de fármaco cargado	Secuencia 2 del oligonucleótido del bloque constructivo: Carboxi dT (nº de cat. de Glen Research 10-1035-90) X: 5'-biotina	Eficiencia de ligación
7.3.1.10		3'-2GGAGTCGACACATAGCTCGCCGTCGIIIIIGCAGCCATAGGTCGT-X	>95%
7.3.1.11		3'-2GGAGTCGACACATAGCTCGCCGTCGIIIIIGCAGCCCGGAGTCGT-X	>95%

Ejemplos de oligonucleótidos del bloque constructivo para la segunda ronda de codificación

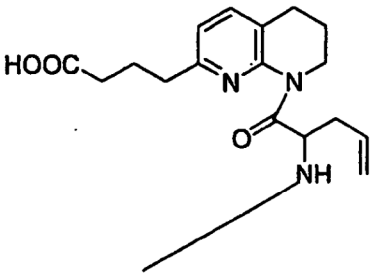
Ejemplo 7.3.2.1
Oligonucleótido del bloque constructivo 3.2.1:



3'-2GGAGTCGACACATAGCTCGCCGTCGIIIIIGCAGCIIIIIGTCGTCAATA-CAGCTTAGACGGTAGATTTX

Eficiencia de ligación: > 95 %

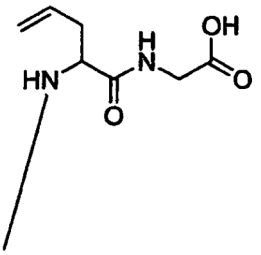
Ejemplo 7.3.2.2



3'-2GGAGTCGACACATAGCTCGCCGTCGIIIIIGCAGCIIIIIGTCGTCGTGTCAG-CTTAGACGGTAGATTTX

Eficiencia de ligación: > 95 %

Ejemplo 7.3.2.3

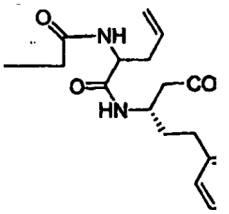
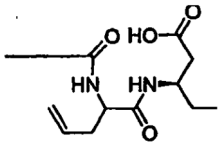
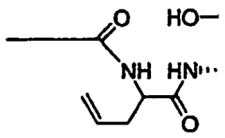
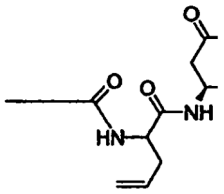
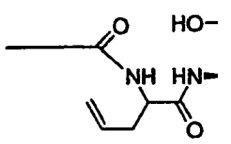
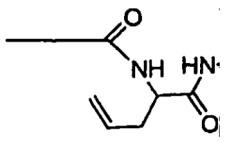


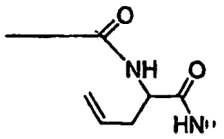
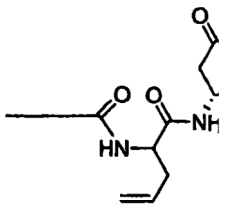
3'-2GGAGTCGACACATAGCTCGCCGTCGIIIIIGCAGCIIIIIGTCGTTCACG-

CAGCTTAGA-CGGTAGATTTX

Eficiencia de ligación: > 95 %

Tabla III

Ejemplo de oligonucleótidos del bloque constructivo	Estructura del fragmento de fármaco cargado	Secuencia 2 del oligonucleótido del bloque constructivo: Carboxi dT (nº de cat. de Glen Research 10-1035-90) X: 5'-biotina	Eficiencia de ligación
7.3.2.4		3'- 2GGAGTCGACACATAGCTCGCCGTCGIIIIIGCAGCIIIIIGTCG TCCTATCAGCTTAGACGGTAGATTTX	>95%
7.3.2.5		3'- 2GGAGTCGACACATAGCTCGCCGTCGIIIIIGCAGCIIIIIGTCG TGCGACCAGCTTAGACGGTAGATTTX	>95%
7.3.2.6		3'- 2GGAGTCGACACATAGCTCGCCGTCGIIIIIGCAGCIIIIIGTCG TGACCACAGCTTAGACGGTAGATTTX	>95%
7.3.2.7		3'- 2GGAGTCGACACATAGCTCGCCGTCGIIIIIGCAGCIIIIIGTCG TACAAGCAGCTTAGACGGTAGATTTX	>95%
7.3.2.8		3'- 2GGAGTCGACACATAGCTCGCCGTCGIIIIIGCAGCIIIIIGTCG TTGGACCAGCTTAGACGGTAGATTTX	>95%
7.3.2.9		3'- 2GGAGTCGACACATAGCTCGCCGTCGIIIIIGCAGCIIIIIGTCG TGCTCGCAGCTTAGACGGTAGATTTX	>95%

Ejemplo de oligonucleótidos del bloque constructivo	Estructura del fragmento de fármaco cargado	Secuencia 2 del oligonucleótido del bloque constructivo: Carboxi dT (nº de cat. de Glen Research 10-1035-90) X: 5'-biotina	Eficiencia de ligación
7.3.2.10		3'- 2GGAGTCGACACATAGCTCGCCGTCGIIIIIGCAGCIIIIIGTCG TCATAGCAGCTTAGACGGTAGATTTX	>95%
7.3.2.11		3'- 2GGAGTCGACACATAGCTCGCCGTCGIIIIIGCAGCIIIIIGTCG TCCGGACAGCTTAGACGGTAGATTTX	> 95%

Procedimiento general 4: Codificación de una biblioteca de moléculas pequeñas por Chemetics™

Ejemplo 7.4.1: Codificación de una biblioteca de moléculas pequeñas de 484 miembros por Chemetics™

Ejemplo 7.4.1.1 Primera ronda de codificación

Se combinaron 2 pmoles de oligonucleótido identificador cargado 1.1 con 200 pmoles de cada oligonucleótido identificador cargado 1.2, 1.3 y 1.4 (602 pmoles de oligonucleótidos identificadores cargados en total). Éstos se mezclaron con 0,7 pmoles de oligonucleótido del bloque constructivo 3.1.3 y 72,7 pmoles de cada uno de los 10 diversos oligonucleótidos del bloque constructivo de la primera ronda (por ejemplo, 3.1.1 y 3.1.2; 727 pmoles de oligonucleótidos del bloque constructivo cargados en total). Los oligonucleótidos se liofilizaron y se redisolvieron en 50 µl de tampón de extensión (EX) [HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 8 mM]. La mezcla se calentó a 80ºC y se enfrió lentamente a 20ºC para permitir la hibridación eficiente del identificador y los oligonucleótidos del bloque constructivo. Se añadieron 5 µl de DMT-MM 0,5 M en agua y la mezcla se incubó a 37ºC durante 4 horas.

La extensión del oligonucleótido identificador en el identificador del oligonucleótido del bloque constructivo se realizó añadiendo 3 µl de una mezcla 10 mM de cada desoxinucleótido trifosfato [dATP, dGTP, dCTP, dTTP] y 3 µl de 13 unidades/µl de secuenasa (Amersham Biosciences). La mezcla se incubó posteriormente a 30ºC durante la noche. Luego se añadieron 3 µl de NaOH 2 M y la mezcla se incubó a 80ºC durante 10 minutos seguido de neutralización mediante la adición de 3 µl de HCl 2 M. Entonces, la mezcla se purificó pasando a través de una columna de filtración en gel (Biospin P-6, BioRad). Se añadieron 0,25 volúmenes de I_2 25 mM en 1:1 de THF:agua, se mezclaron y se incubaron a 37ºC durante 2 horas. Se añadieron 60 µl de tampón de unión (BF) [HEPES 100 mM, NaCl 150 mM] y agua a 300 µl.

La mezcla se añadió a perlas de estreptavidina-Sepharose (Amersham Biosciences) prelavadas 3 veces en tampón BF y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, seguido de incubación sobre hielo durante 10 minutos con agitación suave. Entonces, las perlas se lavaron tres veces con agua. Los oligonucleótidos identificadores extendidos se desprendieron de los oligonucleótidos del bloque constructivo unidos a las perlas de estreptavidina-Sepharose aplicando 100 µl de NH_3 1:1 en agua e incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos.

7.4.1.2 Segundo ronda de codificación

Al eluato se añadieron 0,36 pmoles del oligonucleótido del bloque constructivo cargado 3.2.2 de la segunda ronda y 36,4 pmoles de cada uno de los 10 diversos oligonucleótidos del bloque constructivo de la segunda ronda (por ejemplo, 3.2.1 y 3.2.3; 364 pmoles de oligonucleótidos del bloque constructivo cargados de la segunda ronda en total) y la mezcla se liofilizó y se redisolvió en 50 µl de tampón EX. La codificación se realizó esencialmente como se describe en 7.1.1.

7.4.1.3 Extensión final

Los oligonucleótidos identificadores eluidos se liofilizaron y se disolvieron en 50 µl de tampón EX. Luego se añadieron 200 pmoles del cebador E38 [5'-XTTTTAGATGGCAGAT-3', X=CXS Biotina]. La hibridación se realizó calentando la mezcla a 80ºC y enfriando lentamente a 20ºC. La extensión del oligonucleótido identificador se realizó añadiendo 3 µl de una mezcla 10 mM de cada desoxinucleótido trifosfato [dATP, dGTP, dCTP, dTTP] y 3 µl de 13

unidades/µl de secuenasa. La mezcla se incubó posteriormente a 30ºC durante 2 horas. Entonces, la mezcla se purificó pasando a través de una columna de filtración en gel (Biospin P-6, BioRad). Este eluato se usó para la selección. Se extrajo una alícuota (muestra 7.1.3) para el análisis de la entrada en el procedimiento de selección.

Procedimiento general 5: Selección

Se recubrieron pocillos Maxisorp ELISA (NUNC A/S, Dinamarca) cada uno con 100 µl de 2 µg/ml de la integrina αVβ3 (Bachem) en tampón PBS [NaH_2PO_4 2,8 mM, Na_2HPO_4 7,2 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,2] durante la noche a 4ºC. Entonces, la disolución de integrina se sustituyó por 200 µl de tampón de bloqueo [TBS, 0,05% de Tween 20 (Sigma P-9416), 1% de albúmina de suero bovino (Sigma A-7030), $MnCl_2$ 1 mM] que se dejó durante 3 horas a temperatura ambiente. Entonces, los pocillos se lavaron 10 veces con tampón de bloqueo y la biblioteca codificada se añadió a los pocillos después de diluirla 100 veces con tampón de bloqueo. Tras 2 horas de incubación a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron 10 veces con tampón de bloqueo. Después del lavado final, los pocillos se aclararon del tampón de lavado y posteriormente se invirtieron y se expusieron a luz UV a 300-350 nm durante 30 segundos. Luego se añadieron inmediatamente 100 µl de tampón de bloqueo sin Tween-20 a cada pocillo, los pocillos se agitaron durante 30 segundos y las disoluciones que contenían identificadores eluidos se eliminaron para análisis por PCR (muestra 5.1)

Procedimiento general 6: Análisis de entrada y salida de la selección

Se realizó PCR en la entrada a (muestra 7.3.1) y la salida de (muestra 5.1) la selección usando cebadores correspondientes al extremo 5' de los oligonucleótidos identificadores y el cebador E38. Se realizó PCR usando perlas de PCR Ready-To-Go (RTG) (Amersham Biosciences) y 10 pmoles de cada cebador en un volumen de reacción de 25 µl. La reacción de PCR consistió en una etapa de desnaturalización inicial de 94ºC durante 2 minutos seguido de 30-45 ciclos de desnaturalización a 94ºC durante 30 segundos, hibridación a 58ºC durante 1 minuto y extensión a 72ºC durante 1 minuto. Se incluyó una etapa de extensión final de 2 minutos a 72ºC. Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa y la banda correspondiente al tamaño esperado se cortó del gel y se purificó usando el kit de extracción en gel QIAquick Gel (QIAGEN).

Para secuenciar fragmentos de PCR individuales, los productos de PCR purificados se clonaron en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. La mezcla resultante se usó para la transformación de células TOP10 de *E. coli* (Invitrogen) usando procedimientos convencionales. Las células se sembraron en placa en medio de crecimiento que contenía 100 µg/ml de ampicilina y se dejaron a 37ºC durante 12-16 horas.

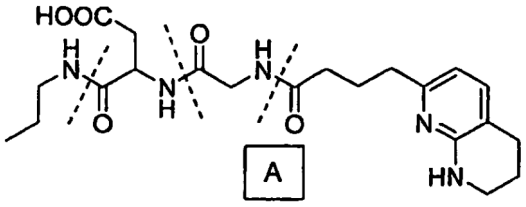
Se seleccionaron clones de *E. coli* individuales y se transfirieron a pocillos de PCR que contenían 50 µl de agua. Estos pocillos se hirvieron luego durante 5 minutos y se usaron 20 µl de mezcla de cada pocillo en una reacción de PCR usando perlas RTG PCR y 5 pmoles de cada uno de los cebadores directo e inverso M13 según las instrucciones del fabricante. Entonces, una muestra de cada producto de PCR se trató con exonucleasa I (USB) y fosfatasa alcalina de gamba (USB) para eliminar el ADN monocatenario degradado y dNTP y se secuenció usando el kit de secuenciación DYEnamic ET cycle (Amersham Biosciences) según las instrucciones del fabricante y las reacciones se analizaron en un secuenciador capilar MegaBace 4000 (Amersham Biosciences). Las salidas de secuencias se analizaron con el software ContigExpress (Informax Inc.).

Visión general de fragmentos de fármacos presentes en la biblioteca:

Identificador			Oligonucleótido del bloque constructivo para la primera ronda			Oligonucleótido del bloque constructivo para la segunda ronda		
Oligonucleótido	Cantidad relativa en la biblioteca	Estructura del fragmento de fármaco	Oligonucleótido	Cantidad relativa en la biblioteca	Estructura del fragmento de fármaco transferido	Oligonucleótido	Cantidad relativa en la biblioteca	Estructura del fragmento de fármaco transferido
1.1	100		3.1.1	1		3.2.1	100	
1.2	1		3.1.2	100		3.2.2	100	
1.3	100		3.1.3	100		3.2.3	1	
1.4	100		3.1.4	100		3.2.4	100	
			3.1.5	100		3.2.5	100	

Identificador			Oligonucleótido del bloque constructivo para la primera ronda			Oligonucleótido del bloque constructivo para la segunda ronda		
Oligonucleótido	Cantidad relativa en la biblioteca	Estructura del fragmento de fármaco	Oligonucleótido	Cantidad relativa en la biblioteca	Estructura del fragmento de fármaco transferido	Oligonucleótido	Cantidad relativa en la biblioteca	Estructura del fragmento de fármaco transferido
			3.1.6	100		3.2.6	100	
			3.1.7	100		3.2.7	100	
			3.1.8	100		3.2.8	100	
			3.1.9	100		3.2.9	100	
			3.1.10	100		3.2.10	100	
			3.1.11	100		3.2.11	100	

La biblioteca tuvo la posibilidad de codificar el ligando A de la integrina αVβ3 (molécula 7 en Feuston B. P. y col., Journal of Medicinal Chemistry 2002, 45, 5640-5648) de 1 de los $3*10^8$ identificadores.



Como puede apreciarse de la tabla anterior, la biblioteca tuvo la posibilidad de codificr el ligando A por cada $3*10^8$ identificadores (1 x 1 x 1 = 1 de cada 301 x 1001 x 1001 ~ $3*10^8$)

Ejemplo 7.6.1: Resultado del análisis de secuenciación de entrada para el procedimiento de selección y salida del procedimiento de selección

La combinación de codones compatible con la codificación del ligando A no se encontró en 28 secuencias derivadas de la biblioteca codificada antes de la selección de acuerdo con la baja abundancia esperada de esta combinación de codones (1 en $3*10^8$).

Una combinación de codones compatible con la codificación del ligando A se encontró en 5 de las 19 secuencias derivadas de la biblioteca codificada después de la selección en pocillos recubiertos con la integrina αVβ3.

Estos números se corresponden con un factor de enriquecimiento de ($3*10^8$ / (19 / 7)) = $8*10^7$.

Ejemplo 8: Selección de moléculas codificadas usando columna de exclusión por tamaño

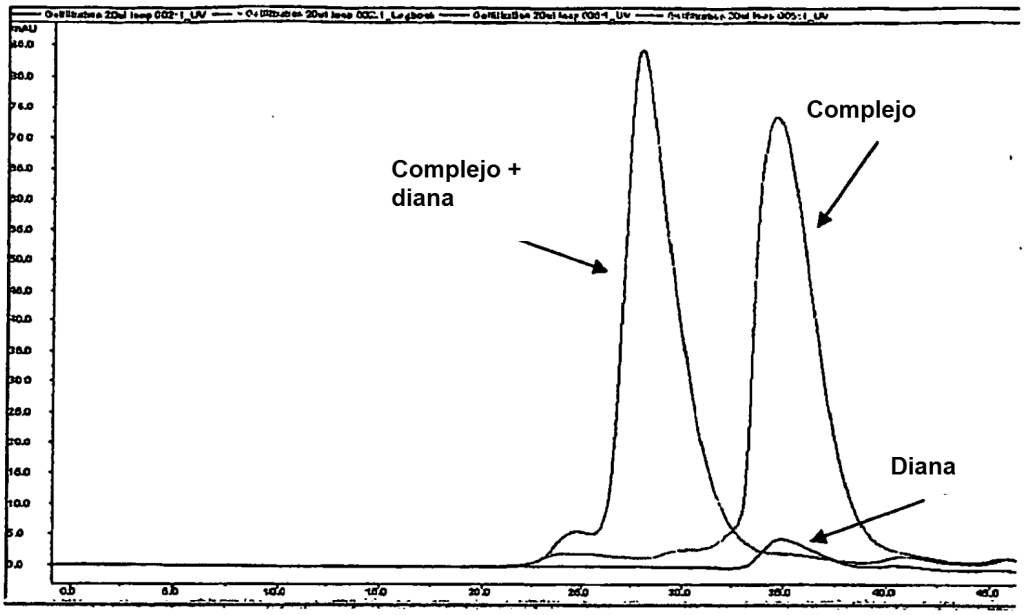
Este ejemplo ilustra la posibilidad de usar la separación en columna para realizar la selección en complejos contra diversas dianas. En este ejemplo se usa la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), pero pueden usarse otros tipos de cromatografía en los que los complejos unidos a diana se separan de los complejos no unidos.

El complejo se ejemplifica en este ejemplo por una molécula de biotina unida a una secuencia de oligonucleótidos con una secuencia predeterminada. Por tanto, la secuencia de nucleótidos del identificador especifica la identidad de la molécula sintética como biotina. La secuencia codificante puede tener cualquier longitud y dividirse en regiones discretas para codificar diversos bloques constructivos como se trata en cualquier sitio en este documento. Por tanto, la molécula presentada puede tener una estructura lineal o de andamiaje.

Biotina-AATTCCGGAACATACTAGTCAACATGA

La biotina es conocida por unirse a estreptavidina. La unión de biotina a estreptavidina ligará el identificador a la molécula diana y, por tanto, cambiará las propiedades físicas y químicas de los identificadores tales como, por ejemplo, el peso molecular aparente. Es posible detectar este cambio usando, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño:

Se cargaron 78 pmoles de la molécula de complejo en una columna Superdex 200, PC 3.2/30 (ÄKT-A-FPLC, Amersham Pharmacia Biotech) y se analizaron en tampón PBS con una velocidad de flujo de 0,050 ml/min. Como puede apreciarse más adelante, el tiempo de retención de las moléculas del complejo fue aproximadamente 35 minutos. Cuando la diana (83 pmoles de estreptavidina) se analizó bajo condiciones idénticas, el tiempo de retención fue aproximadamente el mismo. La baja absorción de las moléculas diana es debida a la longitud de onda (260 nm) usada en la medición. A esta longitud de onda, el coeficiente de extinción es alto para los nucleótidos en los complejos, pero bajo para la diana de proteína.



Sin embargo, cuando las moléculas del complejo se premezclaron con las moléculas diana (78 pmoles de complejo y 83 pmoles de diana incubados durante aproximadamente 1 h en tampón PBS) para permitir la unión y luego se analizaron bajo condiciones idénticas, el tiempo de retención cambió significativamente (28 minutos). El cambio es debido al aumento en el peso molecular (o volumen hidrodinámico) debido a la unión del complejo a la diana. Esto permitirá la separación de los complejos unidos a la diana de los complejos no unidos. La fracción que contiene los complejos y las moléculas diana se reúnen y se amplifican usando cebadores apropiados. Los identificadores amplificados pueden entonces usarse para descodificar las estructuras de las moléculas presentadas enriquecidas.

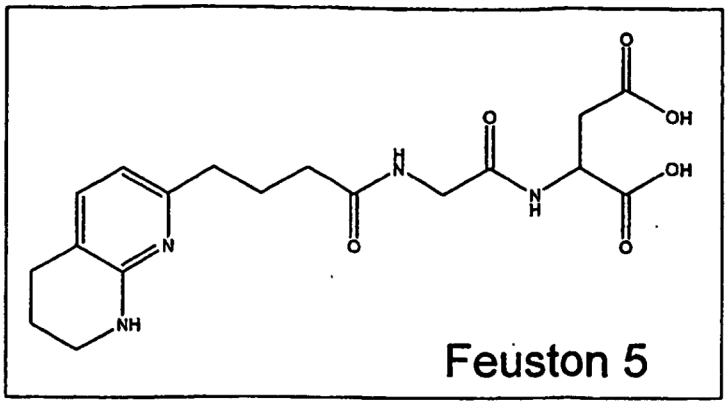
La estrategia de realizar la selección en columna de bibliotecas de complejos bifuncionales tiene dos ventajas principales. Primero, los complejos (unidos a diana) enriquecidos se eluyeron antes que los complejos no unidos, que reducirá drásticamente el fondo de los complejos no unidos. En segundo lugar, el enriquecimiento en la columna será extenso debido a todas las etapas de separación en los poros en la matriz.

La separación de los complejos unidos a la diana usando este enfoque dependerá del peso molecular de los complejos, pero predominantemente del peso molecular de la diana. El peso molecular de la diana puede ajustarse ligando la diana a un soporte que aumenta el peso molecular aparente. El aumento de peso molecular potenciará la separación, reduciendo el tiempo de retención en la columna. Esto puede hacerse usando, por ejemplo, una proteína de fusión, anticuerpo, perlas o reticulación de la diana en forma multimérica. Por tanto, la proteína diana puede expresarse como una proteína de fusión, o un anticuerpo específico puede usarse para aumentar el peso molecular. La diana puede inmovilizarse sobre perlas pequeñas que permiten la separación y la diana puede reticularse usando reactivos convencionales para formar multímeros o reticularse con una molécula vehículo, por ejemplo, otra proteína. Preferentemente, el peso molecular aumenta de forma que las moléculas diana se eluyan en el volumen vacío de la columna.

Ejemplos de otros tipos de separación en columna que pueden usarse son cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y cromatografía de intercambio iónico. Ejemplos de medios de columna, distintos de Superdex, que pueden usarse en la cromatografía de exclusión por tamaño son: Sephacryl, Sepharose o Sephadex.

Ejemplo 9: Formación de la biblioteca de 25 miembros por división y mezcla y selección de ligando

El receptor α_v/β_{III} de la integrina humana participa en muchas funciones biológicas tales como respuestas inflamatorias y formación de trombos, además de migración celular y diseminación metastásica. Los ligandos naturales para α_v/β_{III} contienen un motivo consenso del tripéptido RGD que interactúa con el bolsillo de unión a receptor. Por consiguiente, mucha de la investigación médica se ha basado en la síntesis e identificación de miméticos de RGD de moléculas pequeñas con afinidad aumentada por el receptor α_v/β_{III}. Un mimético, Feuston 5 (Feuston y col., J Med Chem. 2002 Dec 19;45(26):5640-8.), que comprende un bioisóstero de arginina acoplado a un dipéptido GD presenta un afinidad aumentada diez veces por α_v/β_{III} (K_D = 111 nM) en comparación con el tripéptido RGD.



Feuston 5

Aquí se sintetizó una biblioteca de moléculas pequeñas de 25 miembros que comprendía el ligando Feuston 5 y 24 moléculas pequeñas adicionales mediante un procedimiento de división y mezcla. La biblioteca se cribó para interacción con el receptor y el ADN se amplificó por PCR, se secuenció y se identificó (identificaron) el (los) ligando(s) de moléculas pequeñas correspondiente(s).

Protocolo

Generación de bibliotecas:

La Fig. 22 y la Fig. 23 muestran un esquema general para la síntesis de la biblioteca. Inicialmente, un oligonucleótido de 36 nt (ID) 5'-XACCTCAGCTGTGTATCGAGCGGCAGCGGCCTCGTCG
que contiene un grupo amino en el extremo 5' (nº de catálogo de Glen Research 10-1905-90) ligado por un Spacer-PEG18 (nº de catálogo de Glen Research 10-1918-90) y un espaciador fotoescindible (nº de catálogo de Glen Research 10-4913) se sintetizó por química de fosforamidito convencional (comprado de DNA technology A/S Dinamarca). 1 nmol del oligonucleótido ID se cargó con penteneoil-Asp(OMe)-OH usando el siguiente protocolo de carga del andamiaje A:

Se liofilizó 1 nmol del oligonucleótido ID y luego se disolvió en 20 µl de tampón borato de Na 100 mM, pH 8,0, con sulfo-N-hidroxisuccinimida 90 mM (sNHS, Merck). Pre-activación de andamiaje: se incubaron 15 µl de pentenoil-Asp(OMe)-OH 100 mM en DMSO con 15 µl de clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida 100 mM (EDC, Merck) en DMF y se incubó durante 30 min a 30ºC antes de la adición a la disolución de ID. Tras la incubación durante 45 min a 30ºC se añadieron 30 µl adicionales de andamiaje preactivado y la disolución se incubó durante otros 45 min a 30ºC. El andamiaje, los agentes de activación, los disolventes y la sal en exceso se eliminaron por filtración en gel doble usando columnas de microcentrifugación Bio-rad 6 y se eluyeron en agua de calidad para EM. La carga se verificó por análisis de EM por electropulverización (Bruker Inc). Posteriormente, el grupo de protección de amino se eliminó mediante la adición de 0,2 volúmenes de yodo 25 mM en una mezcla de THF/H_2O (1:1) y se incubó a 37ºC durante 2 h. El yodo en exceso se inactivó usando la adición de 2-mercaptoetanol 20 mM antes de la purificación por filtración en gel usando columnas de microcentrifugación Biorad 6. A partir del análisis de EM se estimó que el oligonucleótido ID cargado y desprotegido tenía > 75% de pureza (datos no mostrados).

Se hibridaron 500 pmoles del oligonucleótido ID cargado en D con 500 pmoles de oligonucleótido complementario con la secuencia 5'-TGTGCGACGAGGCCGCTGC
por desnaturalización durante 2 min a 80ºC seguido de enfriamiento lento a temperatura ambiente. El par de oligonucleótidos bicatenarios (ID-ds) con un nucleótido protuberante de 4 nt (para la hibridación y ligación eficiente) se usó en un protocolo de reacción de división y mezcla mostrado esquemáticamente más adelante usando el siguiente procedimiento:

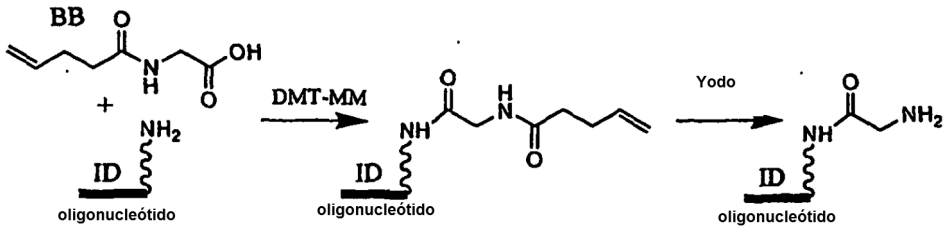
Adición de codones de la posición 2 y reactivos libres: se dividen 500 pmoles de ID-ds en 5 pocillos (aquí, tubos Eppendorf). Se añadieron 100 pmoles de un oligonucleótido del codón de la 2ª posición específica de la secuencia

Z1-0:pCACAAGTACGAACGTGCATCAGAG/pTCCTCTCTGATGCACGTTCGTACT
Z1-1:pCACATAGTCTCCTCCACTTCCATG/pTCCTCATGGAAGTGGAGGAGACTA
Z1-2:pCACATACATCGTTCCAGATACCG/pTCCTCATGGAAGTGGAGGAGACTA
Z1-3:pCACATCCAGTGCAAGACTGAACAG/pTCCTCTGTTCAGTCTTGCACTGGA
Z1-4:pCACAAGCATCACTACTCTGTCTGG/pTCCTCCAGACAGAGTAGTGATGCT

a cada pocillo y los oligonucleótidos se ligaron en un volumen de 20 µl usando tampón de ligación [Tris-HCl 30 mM (pH 7,9), $MgCl_2$ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM] y 10 unidades de ADN ligasa T4 a temperatura ambiente durante 1

hora.

Posteriormente, los 5 productos de ligación se purificaron individualmente usando columnas de centrifugación Biorad 6 según instrucciones del fabricante y se liofilizaron. A continuación, un reactivo específico se hizo reaccionar con el andamiaje según el esquema mostrado en la Fig. 22 usando el protocolo de carga A descrito anteriormente. El reactivo libre, los reactivos y el tampón en exceso se eliminaron por filtración en gel. Los eluatos se reunieron, se liofilizaron y se resuspendieron en 40 µl de H_2O antes de la adición de 10 µl de yodo 25 mM (en THF/H_2O, relación 1:1) para la desprotección.



Reacción del reactivo de glicina protegida con N-penteneoílo con un oligonucleótido ID y posterior desprotección usando yodo. La reacción se incubó a 37ºC durante 2 h. El yodo en exceso se inactivó mediante la adición de 1 µl de 2-mercaptoetanol 1 M y se dejó a temperatura ambiente durante 5 min antes de la purificación de la muestra usando filtración en gel con centrifugación (Bio-rad 6).

La muestra se dividió en 5 pocillos para la adición de los codones de la 3ª posición usando los oligonucleótidos del codón:

Z0-0: pAGGACGAGCAGGACCTGGAACCTGGTGCGTTCCTCCACCACGTCTCCG/
pGCACCAGGTTCCAGGTCCTGCTCG

Z0-1: pAGGACTCGACCACTGCAGGTGGAGCTCCGTTCCTCCACCACGTCTCCG/
pGGAGCTCCACCTGCAGTGGTCGAG

Z0-2: pAGGACGTGCTTCCTCTGCTGCACCACCGGTTCCTCCACCACGTCTCCG/
pCGGTGGTGCAGCAGAGGAAGCACG

Z0-3: pAGGACCTGGTGTCGAGGTGAGCAGCAGCGTTCCTCCACCACGTCTCCG/
pGCTGCTGCTCACCTCGACACCAGG

Z0-4: pAGGACTCGACGAGGTCCATCCTGGTCGCGTTCCTCCACCACGTCTCCG/
pGCGACCAGGATGGACCTCGTCGAG

p = 5'-fosfato.

y se hicieron reaccionar con reactivo libre como se describe para la 2ª posición y se muestra en la Fig. 22 con la siguiente excepción: el reactivo F3 no reaccionó eficientemente usando el protocolo A debido a la mala solubilidad de F3 en disolvente orgánico. Por consiguiente, F3 se hizo reaccionar usando el siguiente procedimiento (protocolo B): la muestra ligada y liofilizada se disolvió en 35 µl de tampón borato de Na 100 mM (pH 8,0) antes de la adición de 10 µl de reactivo F3 100 mM en agua y 5 µl de cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4 metilmorfolinio 500 mM (DMT-MM, activador de ácido carboxílico) y se incubó a 25ºC durante 2 h. Tras la reacción de acoplamiento, el reactivo, el reactivo y la sal en exceso se eliminaron por filtración en gel como se describe en el protocolo A. Las etapas restantes se realizaron como se describe para la posición 2.

Antes de realizar la etapa de selección se realizó una reacción de intercambio de cadena con el fin de asegurar que

no se ensamblaran oligonucleótidos erróneamente hibridados. El cambio de cadenas se hizo por hibridación de 200 pmoles del oligonucleótido AH361 (5'-CGGAGACGTGGTGGAGGAAC-3') en tampón secuenasa que contenía desoxirribonucleótidos 200 µM (dNTP) en un volumen total de 80 µl antes de la adición de 20 unidades de secuenasa e incubación a 30ºC durante 1 h. Tras la extensión, la mezcla de reacción se usó en la etapa de selección sin más purificación.

Selección

Se recubrieron pocillos Maxisorp ELISA (NUNC A/S, Dinamarca) cada uno con 100 µl de 2 µg/ml de la integrina αVβ3 (Bachem) en tampón PBS [NaH_2PO_4 2,8 mM, Na_2HPO_4 7,2 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,2] durante la noche a 4ºC. Entonces, la disolución de integrina se sustituyó por 200 µl de tampón de bloqueo [TBS, 0,05% de Tween 20 (Sigma P-9416), 1% de albúmina de suero bovino (Sigma A-7030), $MnCl_2$ 1 mM] que se dejó durante 1 hora a temperatura ambiente. Entonces, los pocillos se lavaron 2 veces con 250 µl de tampón de bloqueo y se añadieron 5 µl de la biblioteca codificada a los pocillos después de diluirla 20 veces con tampón de bloqueo. Tras 2 horas de incubación a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron con 20 x 250 µl de tampón de bloqueo.

ELUCIÓN

Después del lavado final, los pocillos se aclararon del tampón de lavado y posteriormente se invirtieron y se expusieron a luz UV a 300-350 nm durante 30 segundos usando un conjunto de transiluminador al 70% de potencia.

Inmediatamente se añadieron 100 µl de tampón de bloqueo sin Tween-20 a cada pocillo, los pocillos se agitaron durante 30 segundos y las disoluciones que contenían moldes eluidos se eliminaron para análisis por PCR.

Amplificación por PCR

La PCR en la entrada y salida usa cebadores que se corresponden con el extremo 5' del oligonucleótido Frw-27 (ACCTCAGCTGTGTATCGAG) y el cebador AH361. Se usaron 5 µl de ADN eluido para PCR en una reacción de 25 µl usando 10 µl de HotMasterMix Eppendorf 2,5x y 10 pmoles de cada uno de AH361 y Frw-27. La PCR se ejecutó: (ENRICH30): 94ºC 2 min, luego 30 ciclos de [94ºC 30 s, 58ºC 1 min, 72ºC 1 min], luego 72ºC 10 min.

Clonación y secuenciación

La ligación de TOPO-TA (nº de cat. de Invitrogen K4575-J10) se hizo reaccionar con 4 µl de producto de PCR, 1 µl de disolución de sal, 1 µl de vector. La reacción se incubó a TA durante 30 min. Las células TOP10 de *E. coli* competentes por choque térmico se descongelaron y se pusieron sobre hielo. Se añadieron 5 µl de reacción de ligación. Tras 30 min sobre hielo, las células se sometieron a choque térmico en agua a 42ºC durante 30 s, luego se pusieron sobre hielo. Se añadieron 250 µl de SOC y las células se incubaron 1 h a 37ºC, antes de extenderse sobre placas de LB-ampicilina, seguido de incubación durante la noche a 37ºC.

Se seleccionaron clones de *E. coli* individuales y se transfirieron a pocillos de PCR que contenían 50 µl de agua. Las colonias se incubaron a 94ºC durante 5 minutos y se usaron 20 µl en una reacción de PCR de 25 µl con 5 pmoles de cada cebador de TOPO M13 directo y M13 inverso (AH365/AH366) y perlas de PCR Ready-To-Go (Amersham) usando el programa de PCR EKO50 94ºC 2 min, luego 30 x (94ºC 4 s, 50ºC 30 s, 72ºC 1 min), luego 72ºC 10 min.

Los cebadores y los nucleótidos libres se degradaron añadiendo 1 µl de mezcla EXO/SAP 1:1 a 2 µl de producto de PCR. La incubación fue a 37ºC durante 15 min y luego a 80ºC durante 15 min. Se añadieron 5 pmoles del cebador T7 (AH368) y agua a 12 µl, posteriormente se añadieron 8 µl de mezcla de terminación de la secuenciación DYEnamic ET cycle, seguido de ciclado por PCR usando 30 rondas de (95ºC 20 s, 50ºC 15 s, 60ºC 1 min). La purificación se hizo usando placas de centrifugación Seq96 (Amersham), seguido de análisis en un secuenciador MegaBace.

Salida de secuencias de la biblioteca

18 secuencias satisfactorias fueron informativas del ADN aislado de la etapa de selección y se muestran más adelante

Secuencias de salida

CGGCAGCTGCCTCGTCGCACATCCAGTGCAAGACTGAATAGAGGACTCGACGAGGTCCATCCTGGTCG
CGTTCCTCCACCACGTCTCC
CGGCAGGCCTCGTCGCACATCCAGTGCAAGACTGAACAGAGGACCTCGACGAGGTCCATCCTGGTCGC
GTTCCTCCACCACGTCTCC
CGGCCTCGTCGCACATCATTGC ACGACTGAACAGGAGGACTCGACGAGGTCCATCCTGTCTGCCGGT
TCTCTCACCACACCAGTCTCTC
CGGCAGCGGTCTCGTCGCACATCCAGTGCAAGACTAACAGAGGACCTCGACGAGTTCCATCCTGGTCG
CGTTCCTCCACCACGTCTCC
CGGGCCTCGTCGCACATCCAGTGCAAGACTGAACAGAGGACTCGACGAGGTCCATCCTGGTCGCGTTC
CTCCACCACGTTCC
CGGCAGCGGCCTCGTCGACAAGCATCACTACTCTGTCTGGAGGATCGAGGTCCATCCTGGTCGCGTTC
CTCCACCACGTCTCC
CGGCAGCGGCCTCGTCGCACATCCAGTGCAAGACTGAACAGAGGACTCGACGAGGTCCATCCTGGTCG
CGTTCCTCCACCACGTCTCC
CGGCAGCGGCCTCGTCGCACATCCAGTGCAAGATTGAACAGAGGACTCGACGAGGTCCATCCTGGTCG
CGTTCCTCCACCACGTCTC
CGGCAGCGGCCTCGTCGCACTTCAGTGCAAGACTGAACAGAGGACTCGATGAAGGTCCATCCTGGTCG
CGTTCCTCCACCACGTCTC
CGGCAGCGGCCTCGTCGCACATCCAGGCAAGACTGAACAGAGGACTCGACGAGGTCCATCCTGGTCGC
GTTCCTCCACCACGTCTC
CGGCAGCGGCCTCGTCGCACATAGTNCCCTCCACTTCCATGAGGACTCGACGAGGTCCATCCTGGTCG
CGTTCCTCCACCACGTCTC
CGGCAGCGGCCTCGTCGCACATCCAGTGCAAGACTGAACAGAGGACTCGACGAGGTCCATCCTGGTCG
CGTTCCTCCACCACGTCTC
CGGCAGCGGCCTCGTTGCACATCAGTGCAAGACTGAACAGAGGACTCGACGAGGTCCATCCTGGTCGC
GTTCCTCCACCACGTCTC
CGGCAGCGGCCTCGTCGCACATCAGTGCAAGACTGAACAGAGGCTCGACGAGGTCCATCCTGGTCGCG
TTCCTCCACCACGTCTC
CGGCAGCGGCCTCGTCGCACATCAGTGCAAGACTGAACAGAGGACTCGACGAGGTCCATCCTGGTCGC
GTTCCTCCACCACGTCTC
CGGCAGCGGCCTCGTCGCACATCCAGTGCAAGACTGAACAGAGGACTCGACGAGGTCCATCCTGGTCG
CGTTCCTCCACCACGTCTC
CGGCAGCGGCCTCGTCGCACATCAGTGCAAGACTGAACAGAGGACTCGACGAGGTCCATCCTGGTCGC
GTTCCTCCACCACGTCTC
CGGCAGCGGCCTCGTCGCACATCCAGTGCAAGACTGAACAGAGGACTCGACGAGGTCCATCCTGGTCG
CGTTCCTCCACCACGTCTC

Las secuencias 5-meras marcadas en la posición 1 se corresponden con ácido aspártico, la secuencia 20-mera marcada en la posición 2 (central) se corresponde con glicina y la secuencia 20-mera marcada (+4 bases del nucleótido protuberante de ligación) se corresponde con el bloque constructivo F3. Por tanto, 16 de las 18 secuencias identifican el ligando Feuston-5 exacto (F3-G-D) como la única molécula pequeña dominante que se une al receptor de la integrina α_v/β_{III}. Obsérvese que sólo el BB F3 se identifica en la posición 3, abogando por un sesgo muy fuerte hacia este bioisóstero de arginina.

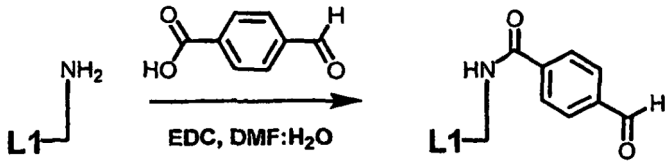
Los datos muestran que la síntesis química de la biblioteca de moléculas pequeñas, el marcaje, la selección y el procedimiento de identificación es altamente eficiente usando esta tecnología que es, como cabría esperar, fácilmente escalable y aplicable a bibliotecas que comprenden más de 10^8-10^{10} moléculas diferentes.

La Fig. 22 muestra una visión general de la generación de bibliotecas usando un único oligonucleótido de la 1ª posición cargado con D (aspartato), 5 pares de reactivos/oligonucleótidos diferentes en la 2ª posición y 5 pares de reactivos/oligonucleótidos diferentes en la 3ª posición. Por último se ensambla una biblioteca de 1x5x5 = 25 trímeros diferentes unidos cada uno a su único código de ADN correspondiente. Las puntas de flecha indican sitio de ligación.

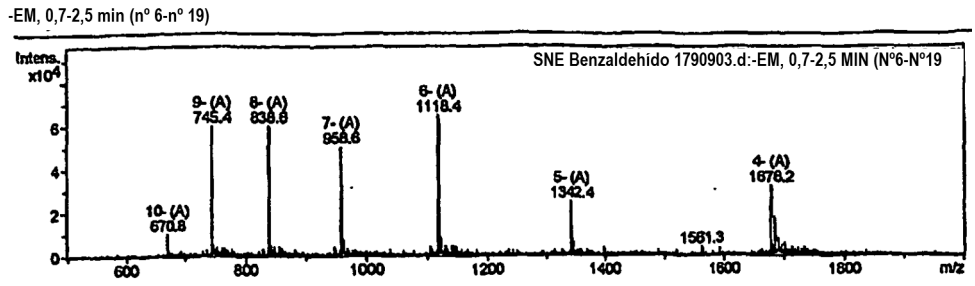
Ejemplo 9: Producto de IMCR de la reacción multicomponente codificada

9.1 Preparación de oligonucleótido de andamiaje que comprende aldehído usando 4-carboxibenzaldehído

Una disolución de 4-carboxibenzaldehído (andamiaje) en DMF (25 µl, 150 mM) se mezcló con 25 µl de una disolución 150 mM de EDC en DMF. La mezcla se dejó durante 30 min a 25ºC. Se añadieron 50 µl de amino-oligonucleótido (10 nmoles) en tampón HEPES 100 mM a pH 7,5 y la mezcla de reacción se dejó durante 20 min a 25ºC. El andamiaje en exceso se eliminó por extracción con EtOAc (500 µl) y el EtOAc restante se eliminó a vacío centrifugando 10 min en un SpeedVac. Entonces, la mezcla se purificó por filtración en gel con columnas de centrifugación (Biospin P-6, BioRad) equilibradas con agua. El oligonucleótido cargado se analizó por EM-ES.



Mw 6585 **Mw 6716**



Componente	Masa desconvolucionada	Molécula	Abundancia absoluta	Abundancia relativa
A	6716.11	[M - H]-	301899	100.00
B	6737.93	[M - H]-	50426	16.70

Amino-oligonucleótido **L1.1** usado en la sección 9.2: Mw = 7154

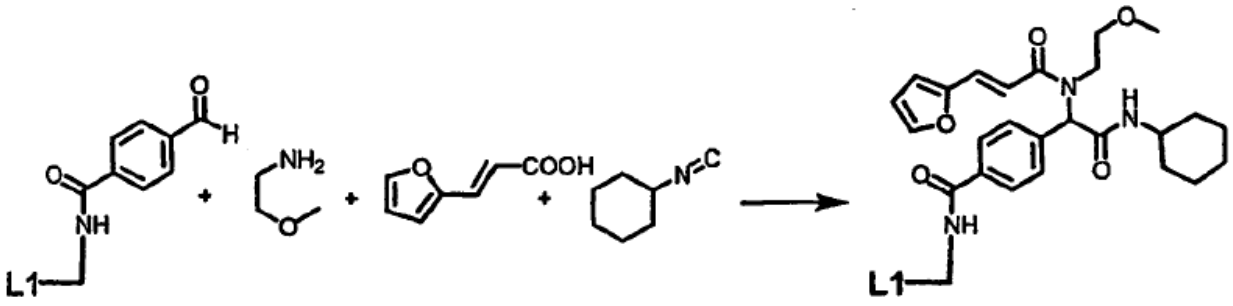
L1.1: 5'-5CG ATG GTA CGT CCA GGT CGC AX
3'X = 3'-Biotina
5'5 = 5'-amino C6 (nº de catálogo de Glen Research 10-1906-90)

Amino-oligonucleótido **L1.2** usado en sección 9.3: Mw = 6585

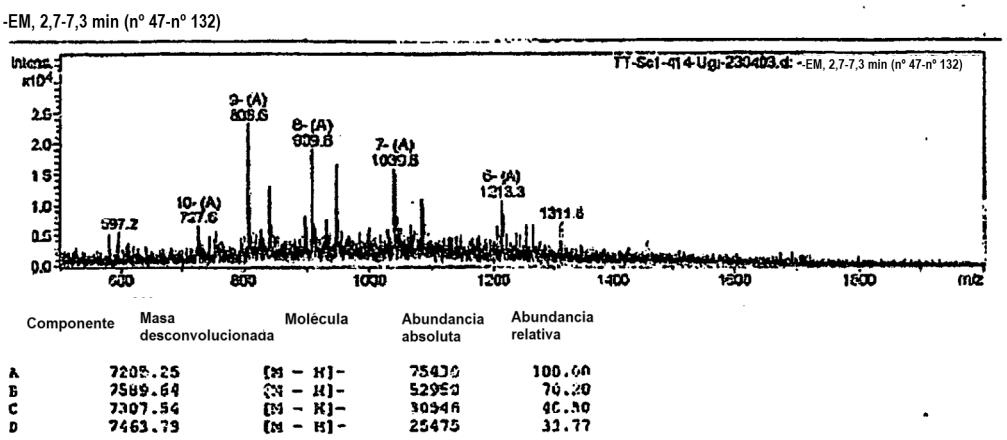
L1.2: 5'-GCG ACC TGG AGC ATC CAT CGX
3'X = Amino-C2-dT-3'-PO_4 (nº de catálogo de Glen Research 10-1037-90)

9.2 Reacción multicomponente

Una disolución de oligonucleótido **L1.1** (200 pmoles) cargada con benzaldehído se liofilizó y se redisolvió en 10 µl de H_2O. Se añadieron 2-metoxietilamina en metanol (10 µl, 40 mM), ácido 3-furan-2-il-acrílico en metanol (10 µl, 40 mM) e ciclohexilisocianuro en metanol (10 µl, 40 mM) y se incubó durante la noche a 37ºC. La mezcla de reacción se diluyó con 40 µl de H_2O y se purificó por filtración en gel con columnas de centrifugación (Biospin P-6, BioRad) equilibradas con agua. El producto de MCR en el oligonucleótido se analizó por EM-ES. El oligonucleótido **L1** cargado con benzaldehído de partida **(A)** se identificó en el espectro de EM junto con el producto de UGI **(B)**.



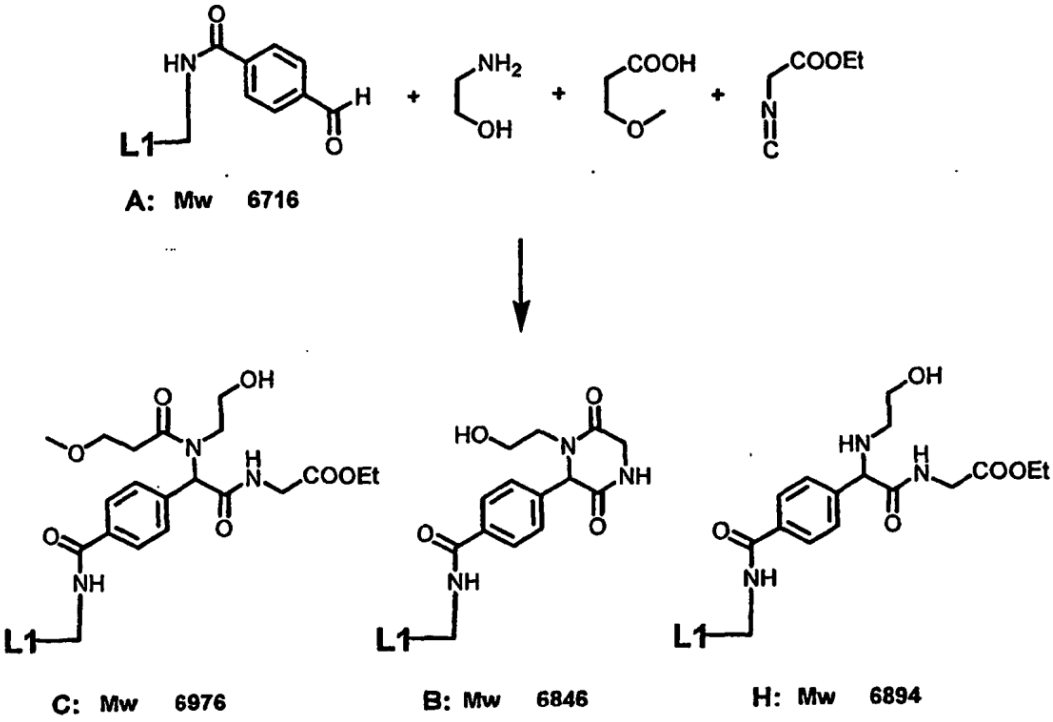
A: Mw 7285 **B: Mw 7589**

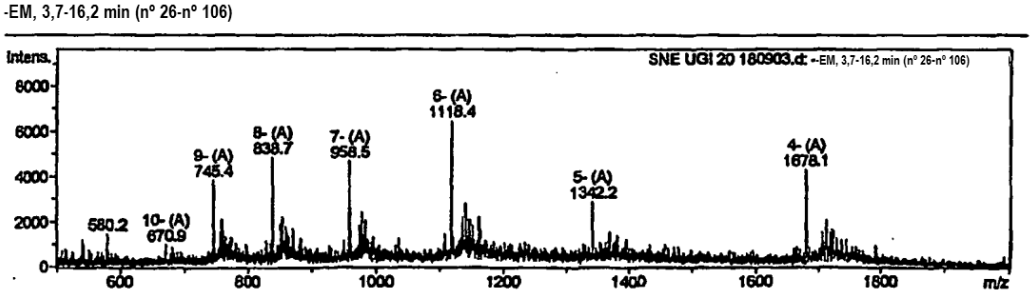


Componente	Masa desconvolucionada	Molécula	Abundancia absoluta	Abundancia relativa
A	7285.25	[M - H]-	75430	100.00
B	7589.64	[M - H]-	52950	70.20
C	7307.54	[M - H]-	30946	40.30
D	7463.79	[M - H]-	25475	33.77

9.3 *Reacción multicomponente*

Una disolución de oligonucleótido **L1.2** (320 pmoles) cargada con benzaldehído se liofilizó y se redisolvió en 10 µl de H_2O. Se añadieron 2-aminoetanol en metanol (10 µl, 40 mM), ácido 3-metoxipropiónico en metanol (10 µl, 40 mM), e isocianoacetato de etilo en metanol (10 µl, 40 mM) y se incubó durante la noche a 37ºC. La mezcla de reacción se diluyó con 40 µl de H_2O y se purificó por filtración en gel con columnas de centrifugación (Biospin P-6, BioRad) equilibradas con agua. El producto de MCR en el oligonucleótido se analizó por EM-ES. El oligonucleótido **L1** cargado con benzaldehído de partida **(A)** se identificó en el espectro de EM junto con tres productos, dicetopiperazina **B**, producto de UGI **C** y el producto de amina **H**.





Componente	Masa desconvolucionada	Molécula	Abundancia absoluta	Abundancia relativa
A	6716.10	[M - H]-	27984	100.00
B	6845.98	[M - H]-	13154	47.01
C	6976.15	[M - H]-	8913	31.85
D	6818.39	[M - H]-	10156	36.29
E	6887.71	[M - H]-	10187	36.40
F	6872.09	[M - H]-	8871	31.70
G	6913.59	[M - H]-	5551	19.84
H	6894.50	[M - H]-	4579	16.36

9.4 Codificación

Los reactivos, los agentes de activación, los disolventes y la sal en exceso se eliminaron por filtración en gel doble usando columnas de microcentrifugación Bio-rad 6 y se eluyeron en H_2O de calidad para EM y la carga se verificó por análisis de EM por electropulverización (Bruker Inc) antes de codificarse la molécula presentada unida al oligonucleótido L1.

El oligonucleótido L1.1 cargado con benzaldehído en la sección 9.2, que ha reaccionado con los otros tres componentes para formar la molécula presentada como se ha descrito anteriormente, se mezcló con los oligonucleótidos del codón L2, L3 y L4 junto con los oligonucleótidos de puente S1, S2 y S3 (secuencias mostradas más adelante) y se ligaron usando una ligasa (ADN ligasa T4). La ligación se realizó usando las siguientes condiciones. El oligonucleótido bicatenario se logró mezclando las cadenas de codificación (L1, L2, L3 y L4) con los oligonucleótidos de puente (S1, S2 y S3) para formar un producto de hibridación de 7 oligonucleótidos (para

hibridación y ligación eficiente). Se usaron aproximadamente 50 pmoles de cada oligonucleótido específico y los oligonucleótidos se ligaron en un volumen de 20 µl usando tampón de ligación [Tris-HCl 30 mM (pH 7,9), $MgCl_2$ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM] y 10 unidades de ADN ligasa T4 a temperatura ambiente durante 1 hora.

L1: 5'-CGATGGTACGTCC**AGGTCGCA**-3'
S1: 5'-**ATCGTGCTGCGACCT-3'**
L2: 5'-**GCACGATAT**GTACG**ATACACTGA**-3'
S2: 5'-**GTGCCATTCAGTGT-3'**
L3: 5'-**ATGGCAC**TTAATGGTT**GTAATGC**-3'
S3: 5'-**TGTATGCGCATTAC**-3'
L4: 5'-**GCATACA**AATCGATAATGCAC-3'

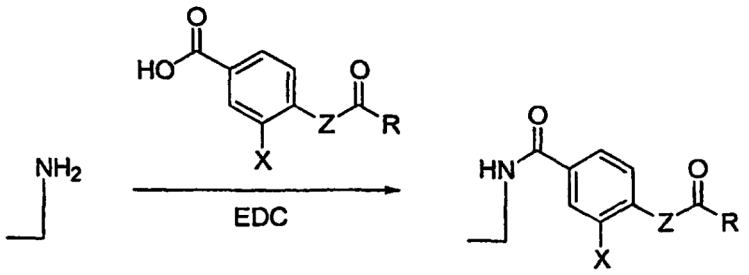
El identificador que comprende las marcas se amplificó usando un cebador directo (FP) e inverso (RP) usando las siguientes condiciones: se usaron 5 µl del oligonucleótido identificador ligado para PCR en una reacción de 25 µl usando 10 µl de HotMasterMix Eppendorf 2,5x y 10 pmoles de cada uno de AH361 y Frw-27. La PCR se ejecutó: (ENRICH30): 94ºC 2 min, luego 30 ciclos de [94ºC 30 s, 58ºC 1 min, 72ºC 1 min], luego 72ºC 10 min.

FP: 5'-CGATGGTACGTCCAGGTCGCA-3'
RP: 5'-GTGCATTATCGATTTGTATGC-3'

El oligonucleótido identificador amplificado se clonó para verificar que los oligonucleótidos ensamblados contuvieran la región de codón (CGTCC, GTACG, AATGG y TCGAT). La ligación de TOPO-TA (nº de cat. de Invitrogen K4575-J10) se hizo reaccionar con 4 µl de producto de PCR, 1 µl de disolución de sal, 1 µl de vector. La reacción se incubó a TA durante 30 min. Las células TOP10 de *E. coli* competentes por choque térmico se descongelaron y se pusieron sobre hielo. Se añadieron 5 µl de reacción de ligación. Tras 30 min sobre hielo, las células se sometieron a choque térmico en agua a 42ºC durante 30 s, y luego se pusieron sobre hielo. Se añadieron 250 µl de SOC y las células se incubaron 1 h a 37ºC, antes de extenderse sobre placas de LB-ampicilina, seguido de incubación durante la noche a 37ºC.

Se seleccionaron clones de *E. coli* individuales y se transfirieron a pocillos de PCR que contenían 50 µl de agua. Las colonias se incubaron a 94ºC durante 5 minutos y se usaron 20 µl en una reacción de PCR de 25 µl con 5 pmoles de cada cebador de TOPO M13 directo y M13 inverso (AH365/AH366) y perlas de PCR Ready-To-Go (Amersham) usando el programa de PCR: 94ºC 2 min, luego 30 x (94ºC 4 s, 50ºC 30 s, 72ºC 1 min), luego 72ºC 10 min. Los cebadores y los nucleótidos libres se degradaron añadiendo 1 µl de mezcla EXO/SAP 1:1 a 2 µl de producto de PCR. La incubación fue a 37ºC durante 15 min y luego a 80ºC durante 15 min. Se añadieron 5 pmoles del cebador T7 (AH368) y agua a 12 µl. Posteriormente se añadieron 8 µl de mezcla de terminación de la secuenciación DYEnamic ET cycle, seguido de ciclado por PCR usando 30 rondas de (95ºC 20 s, 50ºC 15 s, 60ºC 1 min). La purificación se hizo usando placas de centrifugación Seq96 (Amersham), seguido de análisis en un secuenciador MegaBace.

Ejemplo 10: Carga de entidad sobre marca.



Cargado

Procedimiento:

Se mezclaron 25 µl de una disolución de bloque constructivo 150 mM en DMF con 25 µl de una disolución 150 mM de EDC en DMF. La mezcla se dejó durante 30 min a 25ºC. Se añadieron 50 µl de un amino-oligonucleótido (10 nmoles) en tampón HEPES 100 mM a pH 7,5 y la mezcla de reacción se dejó durante 20 min a 25ºC. El bloque constructivo en exceso se eliminó por extracción con EtOAc (500 µl). El EtOAC en exceso se eliminó a presión reducida en un SpeedVac. El amino-oligonucleótido cargado con bloque constructivo se precipitó en etanol dos veces usando NH_4OAc y se analizó por espectrometría de masas por electropulverización (EM-ES).

Ejemplo 11:

El siguiente ejemplo ilustra el uso del principio de marcaje para la identificación de entidades que comprenden propiedades deseables aisladas de una biblioteca de entidades. El principio se muestra esquemáticamente en la Figura 1.

Marcaje de ADN de péptidos para la identificación de complejos que se unen al receptor de la integrina αV/β3.

Materiales:

- Integrina αV/β3 humana purificada (Chemicon Inc.)
- Estreptavidina-Sepharose 6B (Amersham Pharmacia)
- Nunc Immunomodule U8 Maxisorp (nº de cat. de Biotecline Nun-475078)
- ADN de arenque cortado (Sigma)
- Taq-polimerasa (Promega) y 10 x Taq-tampón pol
- Tampón de unión [NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5]
- Transiluminador de UV
- SPDP [3(2-piridilditio)propionato de *N*-succinimidilo] (Molecular Probes, cat.: S-1531)
- Micro Bio-Spin 6 (cat de Bio-Rad: 732-6221)
- 6 oligonucleótidos de marcaje con las siguientes secuencias:

TO#1: 5'-XCTATGCGGACTGACTGGTAC-3'
TO#2: 5'-XCTATGATGCTTAGGCGGTAC-3'
TO#3: 5'-XCTATGTACCGTACGTGGTAC-3'
TO#4: 5'-XCTATGAATGCTAGCTGGTAC-3'
TO#5: 5'-XCTATGGATTGCGCGTGGTAC-3'
TO#6: 6'-XCTATGCCACTATTAGGGTAC-3' en las que X = amino-modificador C6 en 5' (nº de cat. de Glen Research 10-1916-90) adecuado para la unión de entidades funcionales tales como péptidos, moléculas pequeñas o polímeros.

- Oligonucleótidos (molde) complementarios con las siguientes secuencias: CO#1:

5'-**BPTATAGGA**TCCGTACCAGTCAGTCCGC**ATAGGAATTCTAGT-3'** CO#2:
5'-**BPTATAGGATCCGTA**CCGCCTAAGCATCATAGG**AATTCTAGT-3'** CO#3:
5'-**BPTATAGGATC**CGTACCACGTACGGTACATAGG**AATTCTAGT-3'** CO#4:
5'-**BPTATAGGA**TCCGTACCAGCTAGCATTCATAG**GAATTCTAGT-3'** CO#5:
5'-**BPTATAGGAT**CCGTACCACGCGCAATCCATAGG**AATTCTAGT-3'** CO#6:
5'-**BPTATAGGAT**CCGTACCCTAATAGTGGCATAGG**AATTCTAGT-3'**

en las que B = 5'-biotina (nº de cat. de Glen Research 10-1953-95) y P = fotoligador escindible (nº de cat. de Glen Research 10-4913-90).

Las secuencias de 10 nucleótidos subrayadas son únicas para cada oligonucleótido de marcaje y tienen un único homólogo de oligonucleótidos complementario.

Las secuencias marcadas en negrita son adecuadas para fines de clonación.

- Oligonucleótidos para amplificación por PCR

AO#1: 5'-BPTATAGGATCCGTACC-3'
AO#2: 5'-ACTAGAATTCCTATG-3'

- 6 péptidos con la siguiente composición

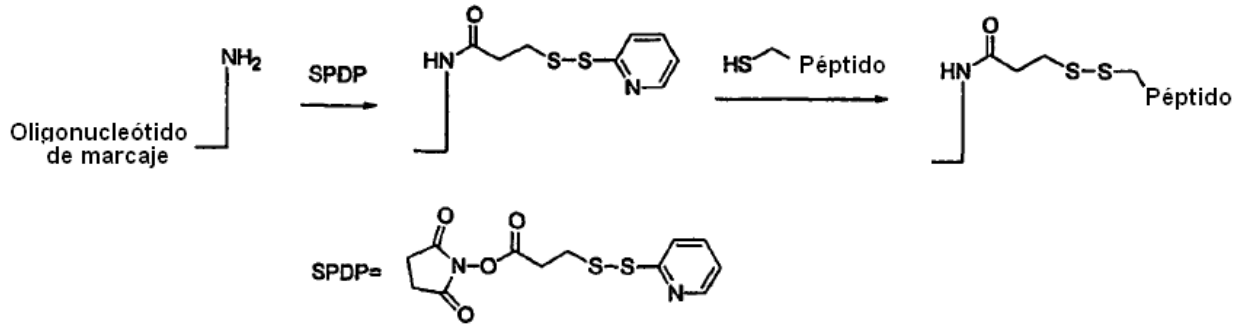
P#1: GRGDSPC
P#2: GRADSPC
P#3: GRGESPC
P#4: GDGRSPC
P#5: CKKK
P#6: CFFKKK

A = Alanina, G = Glicina, R = Arginina, D = Aspartato, P = Prolina, F = Fenilalanina, K = Lisina y E = Glutamato. Todos los péptidos están tapados en los extremos por carboxilación del extremo N y amidación del extremo C. Los péptidos se suministraron por Schafer-N A/S, DK-Dinamarca.

Protocolo

Etapa 1: Marcaje de los péptidos nº 1-6 con un oligonucleótido específico (TO#1-6).

Cada oligonucleótido TO contiene un único nucleófilo amino del extremo 5' (X) que puede enlazarse covalentemente al grupo tiol de cisteína de un péptido usando el reticulante heterobifuncional SPDP en la siguiente reacción.



Procedimiento: Se secan 5 nmoles de amino-oligonucleótido y se resuspenden en 160 µl de HEPES-OH 100 mM, (pH 7,5). Se añaden 40 µl de SPDP 20 mM (en DMSO) y se incuban durante 2 h a 30ºC. La muestra se extrae con 3 x 500 µl de acetato de etilo y se seca durante 10 min en un SpeedVac. La muestra se purifica usando la columna Micro Bio-spin 6 equilibrada con HEPES-OH 100 mM. Añadir 10 µl de péptido 1 M e incubar a 25ºC durante 2 h. Precipitar dos veces con NH_4OAc/etanol 2 M. Redisolver en 50 µl de H_2O y verificar el marcaje por análisis de EM por electropulverización (Bruker Inc.).

Etapa 2: Hibridación de oligonucleótidos complementarios (CO#1-6) con complejos de TO-péptido de la etapa 1.

Procedimiento:

Se añaden 10 pmoles de TO#1-6 cargado con su correspondiente péptido a una mezcla que comprende 20 pmoles de cada uno de CO#1-6 en tampón de unión [NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM, HEPES-OH 50 mM, pH 7,5] y un volumen total de 100 ul. La muestra se calienta a 80ºC durante 2 minutos y se enfría lentamente hasta temperatura ambiente durante 30 minutos.

Etapa 3: Purificación de complejos de ADN bicatenario-péptido (¡opcional!).

Tras la hibridación, sólo las moléculas marcadas que se han hibridado con sus secuencias de oligonucleótidos complementarias comprenderán tanto una entidad funcional como un asa de biotina (véase la Figura 1). Por consiguiente, para reducir el “ruido” en la etapa de selección, las moléculas monocatenarias marcadas pueden eliminarse de la biblioteca en una etapa de pre-selección usando el asa de biotina.

Procedimiento:

Se lavan 50 µl de suspensión de estreptavidina-Sepharose 6B en 3 x 1 ml de tampón de unión antes de resuspender las perlas en 100 µl de tampón de unión. La mezcla de hibridación de péptidos CO/TO se añade a las perlas de estreptavidina y se incuba a 25ºC durante 30 min con agitación. Posteriormente, las perlas de estreptavidina se sedimentan, el sobrenadante se desecha y las perlas se lavan tres veces con 1 ml de tampón de unión. Las perlas se resuspenden en 100 µl de tampón de unión y finalmente se liberan los complejos de péptidos CO/TO usando fotoescisión. La reacción de fotoescisión se realiza incubando la muestra en un transiluminador de UV Vilber-Lourmat TFX-20.M durante 30 segundos al 70% de efecto. Los complejos de péptidos CO/TO eluidos se trasladan a un nuevo tubo.

Etapa 4: Enriquecimiento de la biblioteca para ligandos que se unen al receptor de la integrina αV/β3.

La biblioteca de moléculas se prueba para la unión al receptor de la integrina αV/β3 inmovilizado sobre una superficie de plástico.

Procedimiento:

Un único pocillo de una placa de 8 pocillos Nunc se incuba durante la noche con 100 µl de 1 µg/ml del receptor de integrina en solución salina tamponada con fosfato (PBS) convencional. El pocillo se lava cinco veces con 100 µl de PBS seguido de bloqueo usando 100 µl de 0,5 mg/ml de ADN de arenque cortado en tampón PBS durante 2 h a temperatura ambiente.

Finalmente, el pocillo se lava cinco veces usando 100 µl de tampón de unión a integrina [Tris-HCl (pH 7,5), NaCl 137

mM, KCl 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM y $MnCl_2$ 1 mM].

Los complejos de péptidos CO/TO se añaden a la integrina inmovilizada y se incuban a 37ºC durante 30 min. El sobrenadante se elimina y la integrina inmovilizada se lava 5 veces usando 100 µl de tampón de unión a integrina. Los complejos de péptidos CO/TO se eluyeron calentando la muestra a 80ºC durante 5 min. La muestra se enfría a temperatura ambiente. Se usa 1 µl de la muestra para amplificación por PCR usando 10 pmoles de cada uno de AO#1 y 2 como cebadores externos en una reacción que comprende Tris-HCl 10 mM a pH 9,0, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1 mM, 0,1% de Triton X-100, 250 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP. La muestra se ejecuta con desnaturalización inicial a 94ºC durante 2 min y 30 ciclos usando desnaturalización a 94ºC durante 30 segundos, hibridación a 44ºC durante 30 segundos y extensión a 72ºC durante 15 segundos. Finalmente, la muestra se precipita.

Etapa 5: Aislamiento de moldes monocatenarios.

Para las posteriores rondas de selección y amplificación, la cadena no molde de los productos de PCR amplificados debe eliminarse. Esta etapa se realiza usando purificación específica del oligonucleótido molde biotinilado.

Procedimiento:

Se lavan 50 µl de estreptavidina-Sepharose 6B tres veces con 1 ml de tampón de unión. Las perlas lavadas se incuban con 25 µl (<10 pmoles) de producto de PCR de la etapa 4 en 100 µl de tampón de unión durante 30 min a 25ºC. Centrifugar la muestra brevemente para recoger las perlas. Eliminar el sobrenadante y lavar cinco veces usando 800 µl de H_2O. Las perlas se resuspenden en 500 µl de NaOH 10 mM durante 2 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se elimina y las perlas se resuspenden en biotina 100 mM en 100 µl de H_2O. Para la elución, la muestra se incuba a 95ºC durante 10 min con agitación. Posteriormente, la biotina en exceso se elimina por filtración en gel en Micro-spin.

Etapa 6: Hibridación de la nueva población de oligonucleótidos molde con la biblioteca de péptidos marcados de la etapa 1.

La nueva población de oligonucleótidos molde monocatenarios que están enriquecidos para secuencias que representan ligandos para el receptor de la integrina αV/β3 se hibridan con la biblioteca de péptidos marcados de la etapa 1 como se describe en la etapa 2 y se somete a todavía otra ronda de selección y amplificación.

El procedimiento de selección y amplificación (etapa 2-6) se repite durante 5 rondas.

Etapa 7: Identificación de ligandos.

La identidad de fragmentos de ADN bicatenarios enriquecidos específicos para una entidad o entidades de ligando se establece clonando ADN en un vector de plásmido M13mp18 y examinando clones individuales por análisis de secuencias. Para fines estadísticos, más de 30 clones se secuencian para identificar secuencia(s) dominante(s) dentro del conjunto de marcas de secuencias clonadas. Como la secuencia de ADN dominante clonada se corresponde con un ligando, el sesgo de la secuencia identifica directamente el (los) candidato(s) a ligando adecuado(s) para el examen adicional.

Ejemplo 12

El siguiente ejemplo ilustra el uso del principio de marcaje para la identificación de una secuencia de ADN que representa una molécula pequeña aislada de una biblioteca de secuencias. El principio se muestra esquemáticamente en las figuras.

Marcaje de ADN de biotina y glutatión para la identificación de complejos que se unen a estreptavidina.

Materiales:

- Estreptavidina-Sepharose 6B (Amersham Pharmacia)
- Taq-polimerasa (Promega) y 10 x Taq-tampón pol
- Tampón de unión [NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5]
- SPDP [3(2-piridilditio)propionato de *N*-succinimidilo] (Molecular Probes, cat: S-1531)
- Éster de N-hidroxisuccinimidilo-biotina (Fluka nº 14405)
- Glutatión (Sigma)
- Micro Bio-Spin 6 (cat de Bio-Rad: 732-6221)
- Exonucleasa T7 (gen 6) y 5 x tampón
- Oligonucleótidos de marcaje con las siguientes secuencias:

TO#1: 5'-XCTATGCGGACTGACTGGTAC-3'
TO#2: 5'-XCTATGANNNNNNNNCGGTAC-3', (65.536 combinaciones de secuencias)

en las que X = amino-modificador C6 en 5' (nº de cat. de Glen Research 10-1039-90) adecuado para la unión de entidades funcionales tales como péptidos, moléculas pequeñas o polímeros. N es G, A, T o C

- Oligonucleótidos (molde) complementarios con las siguientes secuencias: CO#1:

5'-$T_sA_sT_s$AGGATCCGTACCAGTCAGTCCGCATAGG**AATTCTAGT-3'** CO#2:
5'-$T_sA_sT_s$AGGATCCGTACCGNNNNNNNNTCATAGG**AATTCTAGT-3'**

en las que S denota la posición de un fosforotioato en el esqueleto de ADN. Las secuencias de 10 nucleótidos subrayadas son únicas para cada marcaje de oligonucleótido o conjunto de marcaje de oligonucleótidos y tienen un único homólogo de oligonucleótidos complementario. Las secuencias marcadas en negrita son adecuadas para fines de clonación.

- Oligonucleótidos para amplificación por PCR

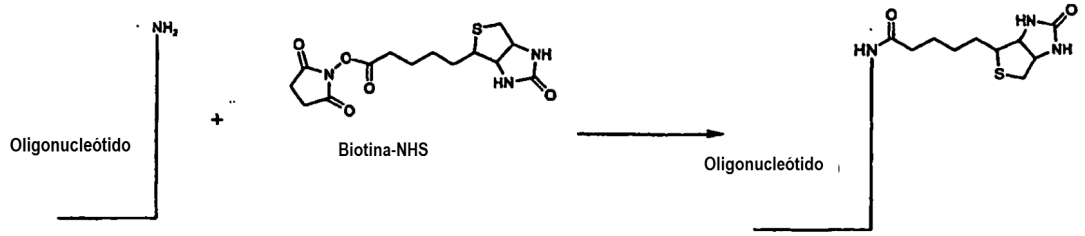
AO#1: 5'-$T_sA_sT_s$AGGATCCGTACC-3'
AO#2: 5'-ACTAGAATTCCTATG-3'

en las que S denota la posición de un fosfotioato en el esqueleto de ADN.

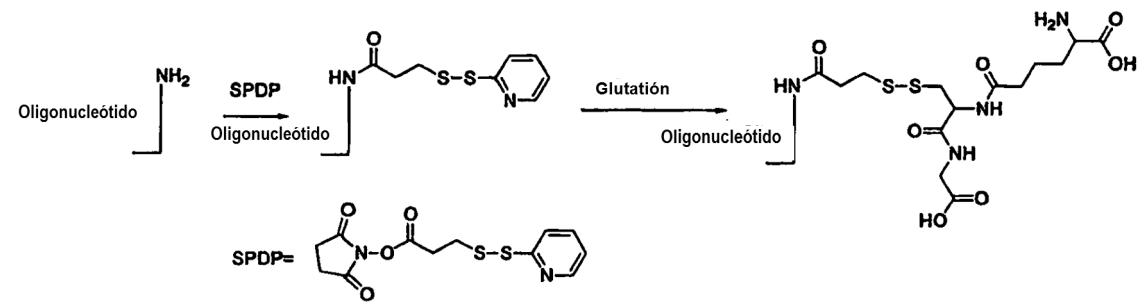
Protocolo

Etapa 1: Marcaje de biotina con TO#1 y marcaje de glutatión con TO#2.

Todos los oligonucleótidos TO contienen un único nucleófilo amino del extremo 5' (X) que puede usarse para el enlace covalente de moléculas pequeñas. La biotina se liga al grupo amino de TO#1 usando NHS-biotina (Merck) en la siguiente reacción.



El glutatión se liga al conjunto de oligonucleótidos usando el reticulante heterobifuncional SPDP en la siguiente reacción.



Procedimiento:

Marcaje de biotina con TO#1:

Se secan 5 nmoles del oligonucleótido TO#1 y se resuspenden en 80 µl de tampón HEPES-OH 100 mM (pH 7,5). Se añaden 20 µl de NHS-biotina 50 mM (en DMSO) al oligonucleótido y la muestra se incuba a 30ºC durante 2 horas. La muestra se extrae dos veces usando 200 µl de acetato de etilo antes de la purificación en una columna Micro-Spin 6. El marcaje de biotina se verifica usando EM por electropulverización (Bruker Inc.).

Marcaje de glutatión (GSH) con TO#2:

Se secan 5 nmoles de TO#2 y se resuspenden en 160 µl de HEPES-OH 100 mM (pH 7,5). Se añaden 40 µl de SPDP 20 mM (en DMSO) y la muestra se incuba durante 2 h a 30ºC. La muestra se extrae con 3 x 500 µl de acetato de etilo y se seca durante 10 min en SpeedVac. La muestra se purifica usando la columna Micro Bio-Spin 6 equilibrada con HEPES-OH 100 mM. Se añaden 10 µl de GSH 0,1 M y la muestra se incuba a 25ºC durante 2 h. Precipitar dos veces con NH_4OAc 2 M/etanol. Redisolver en 50 µl de H_2O y verificar el marcaje por análisis de EM por electropulverización (Bruker Inc.).

La única marca de la secuencia de biotina y las 65.536 marcas diferentes de la secuencia de glutatión comprenden un total de 65.537 marcas de secuencia diferentes. La biblioteca se mezcla para comprender cantidades equimolares de cada marca de secuencia. Por consiguiente, la biblioteca consiste en 65.536 veces el exceso de glutatión marcado con respecto a biotina marcada.

Etapa 2: Hibridación de oligonucleótidos complementarios (CO#1 y 2) con complejos de TO de la etapa 1.

Procedimiento:

Se añaden un total de 10 pmoles de las moléculas de la biblioteca marcadas a una mezcla que comprende 20 pmoles de moléculas del molde (CO#1 y 2) que comprende 65.536 veces el exceso de CO#2 con respecto a CO#1 en un tampón de unión [NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM, HEPES-OH 50 mM, pH 7,5] y un volumen total de 100 µl. La muestra se calienta a 80ºC durante 2 minutos y se enfría lentamente hasta temperatura ambiente durante 30 minutos.

Etapa 3: Purificación de complejos de ADN bicatenario (opcional).

Tras la hibridación, sólo las moléculas marcadas que se han hibridado con sus secuencias de oligonucleótidos complementarias comprenderán tanto una entidad funcional como un asa del esqueleto de fosforotioato (véase la Figura 1). Por consiguiente, para reducir el “ruido” en la etapa de selección, las moléculas monocatenarias marcadas pueden eliminarse de la biblioteca en una etapa de pre-selección usando el asa de fosforotioato.

Procedimiento:

Se lavan 50 µl de suspensión de tiopropilo activado-Sepharose en 3 x 1 ml de tampón de unión antes de resuspender las perlas en 100 µl de tampón de unión. La mezcla de hibridación de CO/TO se añade a las perlas de tiopropilo-Sepharose y se incuba a 30ºC durante 30 min con agitación. Posteriormente, las perlas se sedimentan, el sobrenadante se desecha y las perlas se lavan tres veces con 1 ml de tampón de unión. Las perlas se resuspenden en 100 µl de tampón de unión y finalmente se liberan los complejos de CO/TO usando incubación con 100 µl de DTT 50 mM en tampón de unión. Los complejos de CO/TO eluidos se trasladan a un nuevo tubo.

Etapa 4: Enriquecimiento de la biblioteca para ligandos que se unen a estreptavidina.

La biblioteca de moléculas se prueba para la unión a estreptavidina-Sepharose 6B.

Procedimiento:

Se lavan 50 µl de suspensión de estreptavidina-Sepharose 6B tres veces con 1 ml de tampón de unión. Se incuban 10 µl de moléculas de la biblioteca eluidas en la etapa 3 con la estreptavidina en 100 µl de tampón de unión durante 10 minutos a 25ºC con agitación. Posteriormente, la muestra se lava cinco veces usando 1 ml de tampón de unión. El ADN del ligando se eluye incubando la muestra en 100 µl de H_2O a 95ºC durante 5 minutos. La muestra se enfría a temperatura ambiente. Se usa 1 µl de la muestra para amplificación por PCR usando 10 pmoles de cada uno de AO#1 y 2 como cebadores externos en una reacción que comprende Tris-HCl 10 mM a pH 9,0, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1 mM, 0,1% de Triton X-100, 250 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP. La muestra se ejecuta con desnaturalización inicial a 94ºC durante 2 min y 30 ciclos usando desnaturalización a 94ºC durante 30 segundos, hibridación a 44ºC durante 30 segundos y extensión a 72ºC durante 15 segundos. Finalmente, la muestra se precipita.

Etapa 5: Aislamiento de moldes monocatenarios.

Para las posteriores rondas de selección y amplificación, la cadena no molde de los productos de PCR amplificados debe eliminarse. Esta etapa se realiza usando purificación específica de la cadena del oligonucleótido molde que comprende un esqueleto de fosforotioato.

Procedimiento:

El producto de PCR bicatenario se somete a digestión con exonucleasa usando la exonucleasa del fago T7 (gen 6).

Esta enzima es una exonucleasa de 5' específica bicatenaria que es inhibida por la presencia de fosforotioato en el esqueleto de ADN. Se incuban 20 µl de producto de PCR bicatenario de la etapa 4 en tampón de exonucleasa T7 antes de la adición de 50 unidades de la enzima exonucleasa T7. La muestra se incuba a 30ºC durante 10 minutos. La muestra se extrae una vez con 100 µl de fenol antes de la precipitación usando acetato de NH_4/etanol. Resuspender la muestra en H_2O.

Etapa 6: Hibridación de la nueva población de oligonucleótidos molde con la biblioteca de moléculas marcadas de la etapa 1.

La nueva población de oligonucleótidos molde monocatenarios que están enriquecidos para secuencias que representan ligandos para la estreptavidina se hibrida con la biblioteca de moléculas marcadas de la etapa 1 como se describe en la etapa 2 y se somete a todavía otra ronda de selección y amplificación.

El procedimiento de selección y amplificación (etapa 2-6) se repite durante 5 rondas.

Etapa 7: Identificación de ligandos.

La identidad de fragmentos de ADN bicatenarios enriquecidos específicos para una entidad o entidades de ligando se establece clonando ADN en un vector de plásmido M13mp18 y examinando clones individuales por análisis de secuencias.

Para fines estadísticos, más de 30 clones se secuencian para identificar secuencia(s) dominante(s) dentro del conjunto de marcas de secuencias clonadas. Como la secuencia de ADN dominante clonada se corresponde con un ligando, el sesgo de la secuencia identifica directamente el (los) candidato(s) a ligando adecuado(s) para el examen adicional.

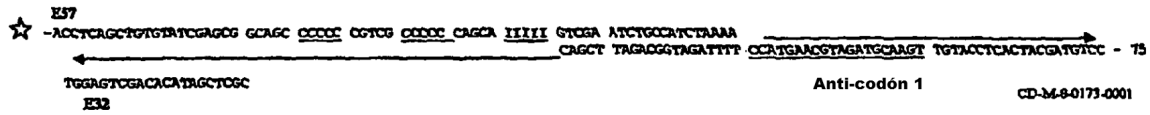
Ejemplo 13: Codificación sobre un identificador obtenido a partir de un procedimiento de codificación de conjuntos (Modo 1) usando un procedimiento de codificación de compartimentos separados (Modo 2).

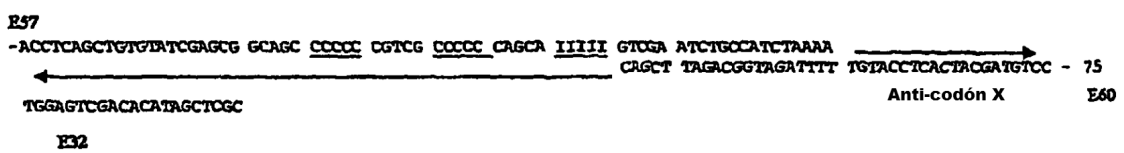
Este ejemplo describe las condiciones experimentales usadas para realizar la codificación de Modo 2 de reactivos en un identificador que contiene codones que han sido obtenidos usando la codificación de Modo 1. La codificación de Modo 1 se realiza como se describe en el ejemplo previo, notablemente el Ejemplo 7. El ejemplo ilustra el principio general de codificación combinando el Modo 1 y 2.

La extensión del identificador codificado y la transferencia del reactivo se realiza en pocillos separados en los que se mezclan un bloque constructivo de cremallera específico y un oligonucleótido anti-codón específico que codifica la entidad funcional cargada para el bloque constructivo de cremallera. Este enfoque también puede usarse para reactivos libres.

Extensión usando el Modo 2 de codificación.

En este ejemplo, un oligonucleótido identificador marcado radiactivo (E57) se mezcla con un bloque constructivo de cremallera específico (E32) y un oligonucleótido anti-codón (CD-M-8-0172-0001) con la secuencia del anti-codón (anti-codón 1) como se muestra más adelante. En otro experimento se usó un oligonucleótido anti-codón (E60) diferente con una secuencia del anti-codón (anti-codón X) diferente como muestra de referencia.





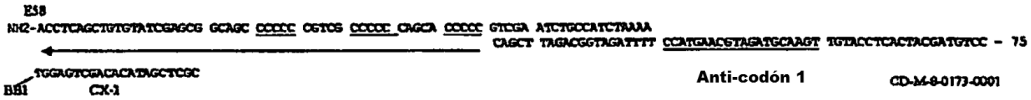
Las combinaciones de oligonucleótidos (como se muestra más adelante) se mezclaron juntas en compartimentos separados para permitir la hibridación específica de los pares de bloque constructivo de cremallera y oligonucleótidos anti-codón. La extensión se realizó en un tampón de extensión (HEPES 20 mM, MgCl 8 mM, NaCl 150 mM) usando 1 pmol de oligonucleótido identificador, 2 pmoles de bloque constructivo de cremallera, 2 pmoles de anti-codón en un volumen final de 10 µl. Los oligonucleótidos se calentaron y luego se permitió que se volvieran a rehibridar lentamente a partir de 80 - 20ºC en una máquina de PCR. Después de la hibridación se añadió una muestra de mezcla (-20 ul) de dNTP 0,5 mM y 13 U de secuenasa y la extensión se ejecutó durante 1 h a 30ºC. Entonces, la muestra se analizó por electroforesis en gel de 10% de urea-poliacrilamida como se muestra en la Fig. 31A.

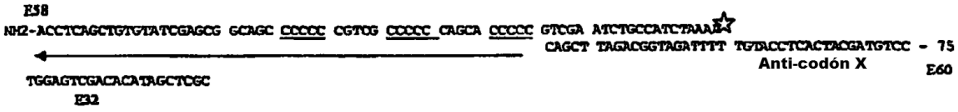
El análisis en gel muestra que el identificador se extiende completamente tanto con el anti-codón 1 largo (carril 2) como con el anti-codón X más corto (carril 3). El resultado también muestra que no hay mezcla entre los oligonucleótidos anti-codón si se permite que se hibriden primero con el oligonucleótido identificador antes de mezclarse y extenderse (carril 4).

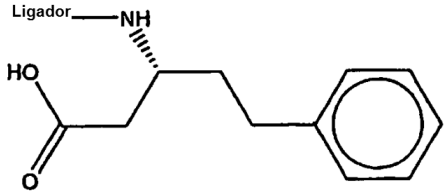
Reticulación.

La codificación de Modo 2 de un reactivo en una molécula codificada en el Modo 1 se probó usando un identificador con tres codones y una molécula presentada. La transferencia de los reactivos se ilustra en este ejemplo por una reticulación de un reactivo en un bloque constructivo de cremallera con la molécula presentada en el oligonucleótido identificador. Las transferencias se probaron con reticulación para simplificar el análisis en el gel, pero no se limitan a este tipo de reacción.

La entidad funcional como se muestra más adelante (estructura química) está ligada al oligonucleótido para formar el bloque constructivo de cremallera (CX-1) que se hibrida con el oligonucleótido identificador mediante la región complementaria. Este bloque constructivo de cremallera se usó junto con un oligonucleótido anti-codón (CD-M-8-0172-0001) con la secuencia del anti-codón (anti-codón 1) como se muestra más adelante. En otro experimento (control) se usó un bloque constructivo de cremallera (E32) diferente junto con un oligonucleótido anti-codón (E60) diferente con una secuencia del anti-codón (anti-codón X) diferente.







Las combinaciones de oligonucleótidos se mezclaron juntas en compartimentos separados para permitir la hibridación específica de los pares de oligonucleótidos del bloque constructivo de cremallera y anti-codón. La hibridación tuvo lugar en un tampón de extensión (HEPES 20 mM, MgCl 8 mM, NaCl 150 mM) usando 1 pmol de oligonucleótido identificador, 2 pmoles de bloque constructivo de cremallera, 2 pmoles de anti-codón en un volumen final de 10 µl. Los oligonucleótidos se calentaron y luego se permitió que se volvieran a rehibridar lentamente a partir de 80 - 20ºC en una máquina de PCR. La reticulación se realizó añadiendo reactivo DMT-MM 5 mM e incubación durante 2 h a 37ºC. Entonces, la muestra se analizó por electroforesis en gel de 10% de urea-poliacrilamida como se muestra en la Fig. 31B.

El análisis en gel muestra que la entidad funcional en el bloque constructivo de cremallera (CX-1) está reticulado con el oligonucleótido identificador que contiene los codones (carril 2), mientras que el bloque constructivo de cremallera que carece del reactivo (E32) es incapaz de reaccionar con el oligonucleótido identificador. El resultado también muestra que no hay mezcla entre los oligonucleótidos del bloque constructivo de cremallera si se permite que se hibriden primero con el oligonucleótido identificador antes de mezclarse y reticularse (carril 4).

Aunque la invención se ha descrito con referencia a procedimientos y realizaciones específicas, se apreciará que puedan hacerse diversas modificaciones y cambios sin apartarse de la invención.

Ejemplo 14: Enriquecimiento de partes codificantes de complejos bifuncionales que presentan ligandos de los receptores de la integrina αvβ3.

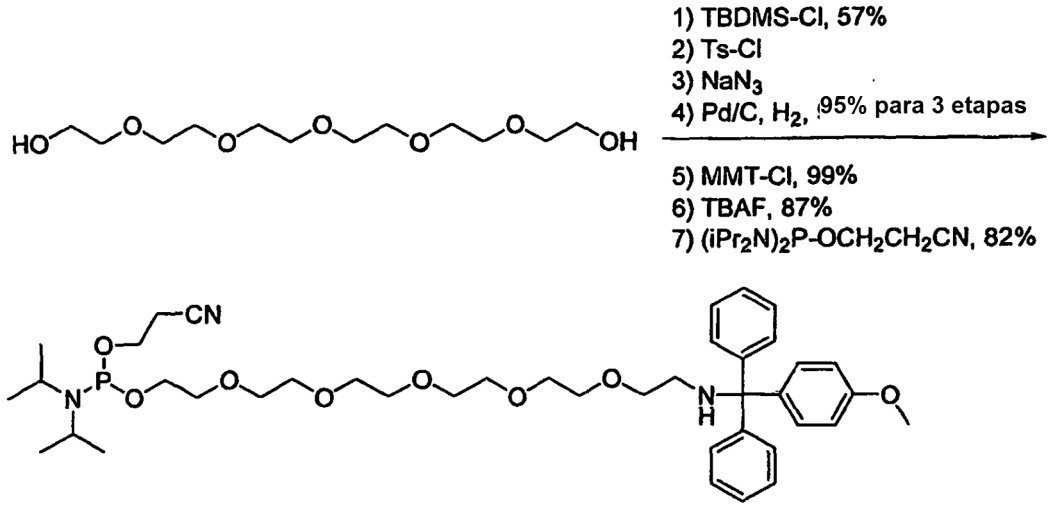
Ejemplo 14.1 Formación de L1-RGD y L1-cRGD:

Se usó un oligonucleótido L1-NH_2 para marcar el péptido cRGD y el péptido RGD, respectivamente, mezclando 4 nanomoles de L1-NH2 en 80 µl de mezcla de HEPES-KOH 500 mM, pH 7,5, y 20 µl de BMPS 25 mM en DMSO y luego incubando durante 2 horas a 30ºC. El oligonucleótido L1-NH2 activado con BMPS se lavó tres veces con EtOAc para eliminar el BMPS sin unir y el EtOAc en exceso se eliminó por evaporación por destilación a vacío. Se añadieron diez µl de 100 mM de péptido cRGD o RGD, respectivamente, y la reacción se incubó a temperatura ambiente durante la noche. Después de la incubación, el oligonucleótido marcado con cRGD o RGD se aclaró del péptido sin unir en exceso por filtración en gel. El marcaje del péptido se confirmó por análisis de espectrometría de masas y los productos marcados se denominan en lo sucesivo L1-cRGD y L1-RGD, respectivamente.

Materiales:

Se adquirió L1-NH2 (6-8-CAGCTTGGACACCACGTCATAC, 6=LH193, 8=PC Spacer) de DNA-Technology, Aarhus, DINAMARCA, PC Spacer es un espaciador fotoescindible (nº de cat. de Glen Research Products 10-4913), BMPS (éster de *N*-[β-maleimidopropiloxi]succinimida) se adquirió de Pierce (nº de cat. 22298). LH193 (éster 2-[2-(2-{2-[2-(2-{[(4-metoxi-fenil)-difenil-metil]-amino}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etílico del éster 2-ciano-etílico de ácido diisopropil-fosforamidoso) se sintetizó según el siguiente procedimiento:

I



hexaetilenglicol comercialmente disponible se protegió selectivamente con mono-TBDMS usando TBDMS-Cl, imidazol y DMAP con 57% de rendimiento. La función alcohol libre se convirtió en una función amina por un protocolo de tres etapas estándar: activación con cloruro de tosilo en piridina seguido de desplazamiento nucleófilo con azida de sodio en DMF y posterior reducción usando Pd/C e H_2 con el 95% global para las tres etapas. Entonces, la función amina se protegió con 4-monometoxitritilo (MMT) con 99% de rendimiento y el grupo TBDMS se eliminó usando TBAF. La función hidroxilo libre se hizo reaccionar finalmente con cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosforodiamidito bajo catálisis con tetrazol y dio el compuesto deseado con 82% de rendimiento. RMN ^{31}P ($CDCl_3$) = 148,5 ppm.

14.2 Formación de L1-F5:

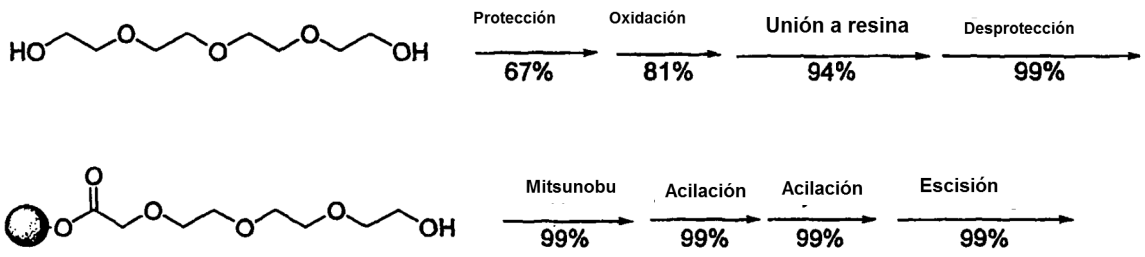
Una mezcla de 5 nanomoles de L1-NH2, DMT-MM 50 mM y F5 10 mM en borato de Na 100 mM a pH 8,0 en 50 µl se incubó durante la noche a 30ºC y el oligonucleótido marcado con F5 se aclaró del F5 sin unir en exceso por filtración en gel. Posteriormente, el oligonucleótido cargado se secó por destilación en SpeedVac y se resuspendió

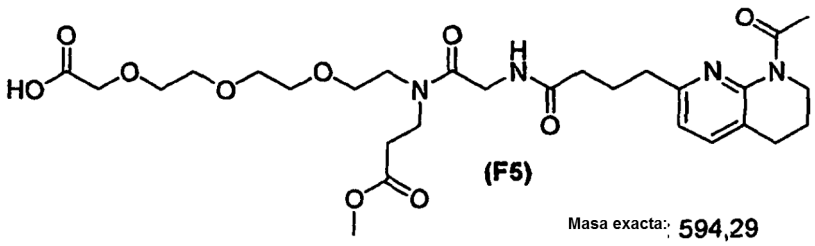
en NaOH 100 mM en 50 microlitros y se dejó durante la noche a 50ºC para la desprotección (escisión del éster y escisión de N-acetamida) de la molécula F5. Después de la desprotección, la suspensión se neutralizó con HCl y la carga de F5 se confirmó por análisis de espectrometría de masas. El marcaje de F5 se confirmó por análisis de espectrometría de masas. El producto marcado se denomina en lo sucesivo L1-F5.

Materiales:

Se preparó DMT-MM (cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio) a partir de *N*-metilmorfolina y 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina comercialmente disponibles según Kaminski y col. (JOC (1998), 63, 4248-55).

F5 (éster y derivado de *N*-acetilo) se sintetizó según el siguiente procedimiento:





El producto marcado L1-F5 lleva un ácido carboxílico libre (el resto homoglicina) y un grupo amino libre (la aminopiridina cíclica).

El tetraetilenglicol comercialmente disponible se monoprotegió con ácido 4-nitrobenzoico usando cloruro de 4-nitrobenzoílo con el 67% de rendimiento. Se realizó una oxidación posterior del alcohol primario restante al ácido carboxílico correspondiente con el 81% de rendimiento usando una mezcla de TEMPO, clorito e hipoclorito. El compuesto se unió a una resina de cloruro de 2-clorotritilo y posteriormente se trató con KCN en MeOH-DMF (1:5) para desproteger el éster de 4-nitrobenzoílo. El éster metílico de beta-alanina activado con N-(2-nitrofenilsulfonilo) se unió usando un protocolo de Mitsunobu. El grupo 4-nitrofenilsulfonilo se eliminó mediante tratamiento con mercaptoetanol/DBU en exceso y entonces la amina formada se aciló con dos bloques constructivos posteriores usando química de Fmoc convencional. La molécula final se escindió de la resina mediante tratamiento con HCl 0,4 M en éter-DCM (1:4). $[M+ H]^+$ (calc.) = 595,30. $[M+ H]^+$ (hallado) = 595,28.

14.3 Formación del componente 1 de la biblioteca.

Formación de L1-cRGD marcado bicatenario (denominado en lo sucesivo L1-cRGD-T1): Doscientos picomoles de un molde de ADN, T1

(GCTAGAGACGTGGTGGAGGAAGTCTTCCTAGAAGCTGGATATC*ACCACATCTC*
***TAGCAGCTA*GTATGACGTGGTGTCCAAGCTG)**

se hibridaron con 50 picomoles de L1-cRGD. Posteriormente, el oligonucleótido L1-cRGD se extendió por ADN polimerasa (secuenasa).

La secuenasa se adquirió de Upstate Biotechnology (nº de cat 70775Y).

14.4 Formación del componente 2 de la biblioteca.

L1-RGD bicatenario. Denominado en lo sucesivo L1-RGD-T2:
Doscientos pmoles de T2

(GCTAGAGACGTGGTGGAGGAAGTCTTCCTAGAAGCTGGATAT*CAGGTCTTCT*
***GTCTTCTTCC*GTATGACGTGGTGTCCAAGCTG)**

se hibridaron con 50 picomoles de L1-RGD. Posteriormente, el oligonucleótido L1-RGD se extendió por ADN polimerasa como se ha descrito anteriormente.

14.5 Formación del componente 3 de la biblioteca.

L1-F5 bicatenario. Denominado en lo sucesivo L1-F5-T3:

Doscientos pmoles de T3

(GCTAGAGACGTGGTGGAGGAAGTCTTCCTAGAAGCTGGATAT*CTTCAGTTCTC*
***GACTCCTGA*GTATGACGTGGTGTCCAAGCTG)**

se hibridaron con 50 picomoles de L1-F5. Posteriormente, el oligonucleótido L1-F5 se extendió por ADN polimerasa como se ha descrito anteriormente.

14.6 Formación del componente 4 de la biblioteca.

L1-NH2 bicatenario. Denominado en lo sucesivo L1-NH2-T4:

Cincuenta pmoles de T4

(GCTAGAGACGTGGTGGAGGAAGTCTTCCTAGAAGCTGGATAT*CTGACGTGTT*
***GACGTACACA*GTATGACGTGGTGTCCAAGCTG)**

se hibridaron con 200 picomoles de L1-NH2. Posteriormente, el oligonucleótido L1-NH2 se extendió por ADN polimerasa como se ha descrito anteriormente.

Se produjo un total de 50 picomoles de cada uno de los componentes de la biblioteca L1-cRGD-T1, L1-RGD-T2, L1-F5-T3 y L1-NH2-T4.

14.7 Enriquecimiento

El enriquecimiento de complejos de unión a integrina se realizó recubriendo 0,04 µg/pocillo del receptor de la integrina αvβ3 en pocillos Nunc Immunomodule U8 Maxisorp (nº de cat. de Biotecline Nun-47507).

En un experimento (Fig. 32), L1-cRGD-T1, L1-RGD-T2, L1-F5-T3 y L1-NH2-T4 se mezclaron en relaciones de 1 pmol de complejo L1-NH2-T4, 1/1000000 pmol de complejo L1-cRGD-T1, 1/100000 pmol de complejo L1-RGD-T2 y 1/10000 pmol de complejo L1-F5-T3 en 100 µl de tampón A (solución salina tamponada con Tris, 0,05% de Tween 20, 1% de albúmina de suero bovino, 0,1 mg/ml de ADN de esperma de arenque). La incubación en pocillos recubiertos con integrina se hizo durante 90 min a 25ºC. Después de unirse al ligando, todos los pocillos se lavaron 20 veces con 250 µl de tampón A durante una hora. Después se aplicaron 100 µl de tampón A a cada pocillo y los pocillos se expusieron a luz UV a 350 nanómetros durante 30 segundos con el fin de escindir el PC Spacer, así como liberar los moldes de ADN de la molécula de ligando. Tras la exposición a luz UV, el volumen de elución se eliminó inmediatamente y se analizó para la presencia de cadenas de ADN T1, T2, T3 y T4 por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR).

En un experimento similar (Fig. 33), L1-cRGD-T1, L1-RGD-T2, L1-F5-T3 y L1-NH2-T4 se mezclaron en relaciones de 1 pmol de complejo L1-NH2-T4, 1/10000 pmol de complejo L1-cRGD-T1, 1/10000 pmol de complejo L1-RGD-T2 y 1/10000 pmol de complejo L1-F5-T3 en 100 µl de tampón A. Por lo demás, las condiciones de ensayo fueron como se han descrito anteriormente.

Para una premezcla de 5 ml (para una placa de 96 pocillos), 2,5 ml de Taqman Universal PCR Master Mix (Applied

Biosystems) se mezcló con 450 µl de RPv2 (GTCAGAGACGTGGTGGAG-GAA) (10 pmol/µl), 25 µl de la sonda Taqman (6-FAM-TCCAGCTTCTAGGAAGAC-MGBNFQ; 50 µM) y 1075 µl de H_2O

40,5 µl de la premezcla se separaron en alícuotas en cada pocillo y se añadieron 4,5 µl de cebador de PCR en la dirección 5' relevante (FPv2 (CAGCTTGGACACCACGTCATAC) (para la curva patrón) o uno de los cebadores específicos del molde P1 (GTCATACTAGCTGCTAGAGATGTGGTGATA) específico para T1, P-2 (CATACGGAAGAAGACAGAAGACCTGATA) específico para T2, P-3 (TCATACTCAGGAGTCGAGAACTGAAGATA) específico para T3 o P-4 (CATACTGTGTACGTCAACACGTCAGATA) específico para T4; 10 pmol/µl) y 5 µl de muestra (H_2O en pocillos para controles negativos).

Las muestras para la curva patrón se prepararon diluyendo T4 a 10^8 copias/5 µl y posteriormente realizando una dilución seriada de 10 veces de esta muestra. Se usaron 5 µl para cada reacción de Q-PCR.

El termociclado/medición de la fluorescencia se realizó en un instrumento en tiempo real ABI Prism 7900HT de Applied Biosystems utilizando los parámetros de ciclado: 95ºC 10 min, 40 ciclos de 95ºC 15 s, 64ºC 1 min.

De la Figura 32 puede observarse que los complejos de ADN bicatenario L1-cRGD-T1, L1-RGD-T2, L1-F5-T3, cuando se considera la relación de entrada en comparación con la relación de salida enriquecida, se enriquecen aproximadamente 1 millón de veces, 100000 veces y 30000 veces, respectivamente, con respecto al complejo L1-NH2-T4. L1-cRGD-T1, L1-RGD-T2 y L1-F5-T3 no pudieron detectarse después de la incubación en pocillos sin receptor de la integrina.

La Figura 33 muestra el enriquecimiento de L1-cRGD-T1, L1-RGD-T2 y L1-F5-T3, respectivamente. Los complejos de ADN de ligando se enriquecen de forma diferente. Esto es lo más probable debido a diferentes constantes de disociación para las tres moléculas. L1-cRGD-T1, L1-RGD-T2 y L1-F5-T3 no pudieron detectarse después de la incubación en pocillos sin receptor de la integrina.

Artículos

En una realización de la presente invención puede caracterizarse por el conjunto de artículos de la presente siguientes (estos artículos no deben considerarse como reivindicaciones).

1. Un procedimiento para obtener un complejo bifuncional que comprende una parte de molécula de presentación y una parte codificante, en el que un complejo bifuncional naciente que comprende un sitio de reacción química y un sitio de cebado para la adición enzimática de una marca se hace reaccionar en el sitio de reacción química con uno o más reactivos, y se proporciona con la(s) marca(s) respectiva(s) que identifican los reactivo(s) en el sitio de cebado usando uno o más enzimas.
2. El procedimiento de acuerdo con el artículo 1, en el que el complejo bifuncional obtenido en el artículos 1, se hace reaccionar además una o más veces con un reactivo y se proporciona con las marcas identificadoras para producir un producto de la reacción como una parte del complejo bifuncional y una parte codificante que comprende marcas que codifican la identidad de los reactivos que han participado en la formación del producto de la reacción.
3. El procedimiento de acuerdo con los artículos 1, 2 ó 3, en el que la marca es una secuencia de ácidos nucleicos.
4. El procedimiento de acuerdo con los artículos 1 a 3, en el que la una o más marcas está/están provistas en el sitio de cebado de los complejos bifuncionales nacientes usando una reacción de extensión enzimática.
5. El procedimiento de acuerdo con los artículos 1 a 4, en el que un resto de enlace está conectando el sitio de reacción química y el sitio de cebado.
6. El procedimiento de acuerdo con el artículo 5, en el que un resto de enlace es una secuencia de ácidos nucleicos de una longitud adecuada para la hibridación con un oligonucleótido complementario.
7. El procedimiento de acuerdo con los artículos 5 ó 6, en el que el resto de enlace está unido al sitio de reacción química a través de un separador que comprende un ligador selectivamente escindible.
8. El procedimiento de acuerdo con los artículos 1 ó 2, en el que el sitio de reacción química es un andamiaje químico que comprende una estructura química que tiene uno o más grupos reactivos o precursores de tales grupos reactivos.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de los artículos 1 a 8, en el que dos o más reactivos están implicados en la reacción con el sitios de reacción química y el sitio de cebado antes o después de que la reacción se proporcione con las marcas respectivas que identifican los reactivos.
10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de los artículos 1 a 9, en el que el sitio de cebado comprende un grupo 3'-OH o 5'-fosfato de un nucleótido, o derivados funcionales del mismo.
11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de los artículos 1 a 10, en el que la adición de la marca se realiza por un enzima seleccionado de polimerasa, ligasa, quinasa, recombinasa, o una combinación de los mismos.
12. El procedimiento de acuerdo con el artículo 1, en el que la adición de la marca se realiza antes de la reacción del reactivo con el sitio de reacción química.
13. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de los artículos 1 a 12, en el que la parte de ácido nucleico

del complejo bifuncional es de cadena doble cuando reacciona el reactivo con el sitio de reacción química.

14. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de los artículos anteriores, en el que el reactivo es un reactivo libre.

15. El procedimiento de cualquiera de los artículos 1 a 13, en el que el reactivo comprende una secuencia de ácidos nucleicos y una entidad funcional capaz de ser reaccionada en el sitio de reacción química.

16. El procedimiento de acuerdo con el artículo 15, en el que el reactivo es un bloque de construcción que comprende un oligo nucleótido suficientemente complementario con el resto de enlace para permitir la hibridación, una entidad funcional transferible, y un anti-codón que identifica la entidad funcional.

17. El procedimiento de cualquiera de los artículos 1 a 16, en el que la marca comprende un codón que identifica el reactivo y una anti-marca comprende una secuencia de ácidos nucleicos complementaria al codón (anti-codón).

18. El procedimiento de acuerdo con el artículo 17, en el que la marca comprende además una secuencia de marco informativa del punto temporal de la historia de la síntesis en la que el reactivo asociado ha reaccionado.

19. El procedimiento de acuerdo con el artículo 1, en el que la etiqueta comprende un oligonucleótido de 3, 5, 8, 11, 15, 20, 30 o más nucleótidos.

20. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de los artículos anteriores, en el que el complejo bifuncional comprende codones de longitudes diferentes.

21. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de los artículos 1 a 20, en el que un oligonucleótido que comprende una secuencia que complementa el oligonucleótido marca está inmovilizado.

22. El procedimiento de acuerdo con el artículo 1, en el que en lugar de usar la adición enzimática de una marca, la marca se conecta químicamente al sitio de cebado aplicando un oligonucleótido de guía que complementa un extremo de la marca y una parte del complejo bifuncional que comprende el sitio de cebado, de tal manera que los extremos contactan entre sí.

23. Un procedimiento para obtener un complejo bifuncional que comprende una parte de molécula de presentación y una parte codificante, que comprende las etapas de

a) proporcionar un complejo bifuncional naciente que comprende un grupo reactivo y una región identificadora de oligonucleótidos,
b) proporcionar un bloque de construcción que comprende un oligonucleótido suficientemente complementario con la región identificadora para permitir la hibridación, una entidad funcional transferible, y un anti-codón que identifica la entidad funcional,
c) mezclar el complejo bifuncional naciente y el bloque de construcción bajo condiciones de hibridación para formar un producto de hibridación,
d) transferir la entidad funcional del bloque de construcción al complejo bifuncional naciente a través de una reacción que implica el grupo reactivo del complejo bifuncional naciente, y
e) extender enzimáticamente la región identificadora de oligonucleótidos para obtener un codón unido al complejo bifuncional que ha recibido la entidad funcional.

24. El procedimiento de acuerdo con el artículo 23, que comprende además las etapas f) separar los componentes del producto de hibridación y recuperar el complejo.

25. El procedimiento de acuerdo con el artículo 23 y 24, dicha parte de molécula de presentación comprendiendo el producto de la reacción de las entidades funcionales y el grupo reactivo del complejo inicial, en el que los pasos c) a f) se repiten como sea apropiado.

26.El procedimiento de acuerdo con cualquiera de los artículos 23 a 25, en el que el grupo reactivo del complejo funcional naciente es parte de un andamiaje químico.

27. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de los artículos 23 a 26, en el que el enzima para la producción del codón es una polimerasa.

28. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de los artículos 23 a 27, en el que el anticodón es único.

29. El procedimiento y los artículos 23 a 28, en el que una combinación similar de nucleótidos de un anti-codón no aparece en otro bloque de construcción que lleva otra entidad funcional.

30. Un procedimiento para generar una biblioteca de complejos bifuncionales, que comprende las etapas de:

a) proporcionar uno o más complejos bifuncionales nacientes diferentes que comprenden un grupo reactivo y una región identificadora de oligonucleótidos.
b) proporcionar una pluralidad de bloques de construcción, cada uno comprendiendo un oligonucleótido suficientemente complementario con una región identificadora para permitir la hibridación, una entidad funcional transferible, y un anti-codón que identifica la entidad funcional,
c) mezclar los complejos bifuncionales nacientes y la pluralidad de bloques de construcción bajo condiciones de hibridación para formar productos de hibridación,
d) transferir las entidades funcionales de los bloques de construcción a los complejos bifuncionales nacientes a través de una reacción que implica el grupo reactivo del complejo bifuncional naciente,
e) extender enzimáticamente las regiones identificadoras de oligonucleótidos para obtener codones unidos a los complejos bifuncionales que ha recibido las entidades químicas.
f) separar los componentes de los productos de hibridación y recuperar los complejos,
g) repetir los pasos c) a f) una o más veces, como sea apropiado

31. El procedimiento de acuerdo con el artículo 30, en el que el anticodón es único.
32. El procedimiento de los artículos 30 y 31, en el que una combinación similar de nucleótidos de un anti-codón no aparece en otro bloque de construcción que lleva otra entidad funcional.
33. Un procedimiento para generar una biblioteca de complejos bifuncionales que comprende una parte de molécula de presentación y una parte codificante, dicho procedimiento comprendiendo las etapas de proporcionar en compartimentos separados complejos bifuncionales nacientes, cada uno comprendiendo un sitio de reacción química y un sitio de cebado para la adición enzimática de una marca y realizar en cualquier orden la reacción en cada compartimento entre el sitio de reacción química y uno o más reactivos, y la adición de una o más marcas respectivas que identifican el uno o más reactivos en el sitio de cebado usando uno o más enzimas.
34. El procedimiento de acuerdo con el artículo 33, en el que el contenido de dos o más compartimentos se agrupan juntos.
35. El procedimiento de los artículos 33 ó 34, en el que los complejos bifuncionales se someten a uno o más ciclos adicionales del procedimiento de acuerdo con los artículos 33 ó 34, usando los complejos bifuncionales como los complejos bifuncionales nacientes, para obtener una biblioteca de complejos bifuncionales, en el que cada miembro de la biblioteca comprende un reactivo específico del producto de la reacción y marcas respectivas que codifican la identidad de cada uno de los reactivos que han participado en la formación del producto de la reacción.
36. El procedimiento de acurdo con cualquier artículo anterior para generar una biblioteca de complejos bifuncionales, cada uno de los miembros comprendiendo una parte de molécula de presentación formada por la reacción que implica un sitio de reacción química y dos o más reactivos, y una parte codificante que comprende codones respectivos que codifican la identidad de los dos o más reactivos, que comprende las etapas de seleccionar un procedimiento de acuerdo con los artículos 30-32 ó 33-35 y usar la biblioteca prematura obtenida de complejos bifuncionales como un grupo de complejos bifuncionales nacientes diferentes en un procedimiento seleccionado del procedimiento de acuerdo con el artículo 30-32 y el procedimiento de acuerdo con el artículo 33-35.
37. Un procedimiento para identificar una molécula de presentación que tiene una propiedad preseleccionada, que comprende las etapas de:

i) someter a la biblioteca formada de acuerdo con cualquiera de los artículos 30 a 36 a una condición, en el que una molécula de presentación o un subconjunto de moléculas de presentación que tienen una propiedad predeterminada se divide del resto de la biblioteca, y
ii) identificar la(s) molécula(s) de presentación que tienen una propiedad preseleccionada decodificando la prte codificante del complejo.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Nuevolution A/S

<120> Codificación Enzimática

<130> P912PC00

<160> 166

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 1

Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 2
<211> 7
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISC
<222> (7)..(7)
<223> puede ser Gly or Ser (G o S)

<400> 2

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Xaa
1 5

<210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 3

Leu Val Pro Ala Gly Ser
1 5

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 4

Ile Glu Gly Arg
1

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221> base modificada
<222> (1)..(1)
<223> Oligonucleótido identificador marcado en 5' del amino-modificador C6, puede obtenerse de Glen research cat. Nº 10-1039-90

<400> 5
tcgtaacgac tgaatgacgt 20

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 6

Cys Phe Phe Lys Lys Lys
1 5

<210> 7
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221> base modificada
<222> (1)..(1)
<223> Etiquetado con biotina

<220>
<221> base modificada
<222> (25)..(25)
<223> tio-modificador marcado con C6 S-S (obtenible de Glen Research, cat # 10-1936-90)

<400> 7
tgcagacgtc attcagtcgt tacga 25

<210> 8
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 8
gcacacatgc atgagcacac g 21

<210> 9
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISC
<222> (27)..(32)
<223> N representa una nucleobase seleccionada entre A, G, T, y C.

<400> 9
cgtgtgtacg tactcgtgtg cgtgtgnnnn nntgacta 38

<210> 10
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC

<222> (27)..(32)
<223> n representa inosina

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (39)..(44)
<223> n representa una nucleobase seleccionada entre A, G, T y C.

<400> 10
cgtgtgtacg tactcgtgtg cgtgtgnnnn nntgactann nnnntgcaac 50

<210> 11
<211> 62
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC 50<222> (27)..(32)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (39)..(44)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC 60<222> (51)..(56)
<223> n representa una nucleobase seleccionada entre A, G, T y C.

<400> 11

cgtgtgtacg tactcgtgtg cgtgtgnnnn nntgactann nnnntgcaac nnnnnnactt 60

tg 62

<210> 12
<211> 91
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC 15
<222> (27)..(32)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC 20
<222> (39)..(44)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC 25
<222> (51)..(56)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC 30
<222> (63)..(68)
<223> n representa una nucleobase seleccionada entre A, G, T y C.

<400> 12

cgtgtgtacg tactcgtgtg cgtgtgnnnn nntgactann nnnntgcaac nnnnnnactt 60

tgnnnnnnga attcggcaat acgcattacc g 91

<210> 13
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 13
cgtgtgtacg tactcgtgtg cgtgtgtcga tgtgacta 38

<210> 14
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 14
gcacacatgc atgagcacac gcacacagct acactgat 38

<210> 15
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (27)..(32)
<223> n representa inosina (I)

<400> 15
cgtgtgtacg tactcgtgtg cgtgtgnnnn nntgactaca atcgtgcaac 50

<210> 16
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 16
gcacacatgc atgagcacac gcacacagct acactgatgt tagcacgttg 50

<210> 17
<211> 62
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (27)..(32)

<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (39)..(44)
<223> n representa inosina (I) 45

<400> 17

cgtgtgtacg tactcgtgtg cgtgtgnnnn nntgactann nnnntgcaac ctctgtactt 60

tg 62

<210> 18
<211> 62
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 18

gcacacatgc atgagcacac gcacacagct acactgatgt tagcacgttg gagacatgaa 60

ac 62

<210> 19
<211> 91
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (27)..(32)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (39)..(44)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (51)..(56)
<223> n representa inosina (I)

<400> 19

cgtgtgtacg tactcgtgtg cgtgtgnnnn nntgactann nnnntgcaac nnnnnnactt 60

tgtaagctga attcggcaat acgcattacc g 91

<210> 20
<211> 91
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 20

gcacacatgc atgagcacac gcacacagct acactgatgt tagcacgttg gagacatgaa 60

acattcgaca attcccgtta tgcgtaatgg c 91

<210> 21
<211> 91
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (27)..(32)
<223> n representa inosina (I) 50

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (39)..(44)
<223> n representa inosina (I) 55

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (51)..(56)
<223> n representa inosina (I) 60

<400> 21

cgtgtgtacg tactcgtgtg cgtgtgnnnn nntgactann nnnntgcaac nnnnnnactt 60

tgtaagctgt tatgggcaat acgcattacc g 91

<210> 22
<211> 71
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 22

gcacacagct acactgatgt tagcacgttg gagacatgaa acattcgaca attcccgtta 60

tgcgtaatgg c 71

<210> 23
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 23
gcacacagct acactgatgt tagcacgttg gagacatgaa acattcgac 49

<210> 24
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 24
acctcagctg tgtatcgagc g 21

<210> 25
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente
<400> 25
gcagtagcgg gcctcgtacg acctgttcgg ctactgccga gc 42

<210> 26
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 26
ccgcatcgc 9

<210> 27
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 27
tggagtcgac acatagctcg c 21

<210> 28
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 28
ggcgtagcgc atagcgcaat cgc 23

<210> 29
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> El residuo está ligado a un identificador con una secuencia PSN, en el que N = 5'-Amino-Modificador 5 (Glen research cat #10-1905-90), S = Espaciador C3 CPG (Glen research cat# 20-2913-01), P = PC Espaciador Fosforamidito (Glen researchcat# 10-4913-90)

<400> 29
acctcagctg tgtatcgagc ggcagcgtta tcgtcg 36

<210> 30

<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> El residuo está ligado a un identificador con una secuencia PSN, en el que N = 5'- Amino-Modificador 5 (Glen research cat#10-1905-90), S = Espaciador C3 CPG (Glen research cat# 20-2913-01), P = PC Espaciador Fosforamidito (Glen researchcat# 10-4913-90)

<400> 30
acctcagctg tgtatcgagc ggcagcagtg ccgtcg 36

<210> 31
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> El residuo está ligado a un identificador con una secuencia PSN, en el que N = 5'- Amino-Modificador 5 (Glen research cat#10-1905-90), S = Espaciador C3 CPG (Glen research cat# 20-2913-01), P = PC Espaciador Fosforamidito (Glen researchcat# 10-4913-90)

<400> 31
acctcagctg tgtatcgagc ggcagcgcac acgtcg 36

<210> 32
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> El residuo está ligado a un identificador con una secuencia PSN, en el que N = 5'- Amino-Modificador 5 (Glen research cat#10-1905-90), S = Espaciador C3 CPG (Glen research cat# 20-2913-01), P = PC Espaciador Fosforamidito (Glen researchcat# 10-4913-90)

<400> 32
acctcagctg tgtatcgagc ggcagcggat acgtcg 36

<210> 33
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5'

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (20)..(20)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90)

<400> 33
cgctcgatac acagctgagg 20

<210> 34
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5’

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (20)..(20)
<223> carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90) 60

<400> 34
cgctcgatac acagctgagg 20

<210> 35
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> biotina 5’

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (16)..(20)
<223> n representa inosina (I)

<400> 35
tgctgataac cgacgnnnnn gctgc 25

<210> 36
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 36
tcgagcggca gcca 14

<210> 37
<211> 7
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 37
gcagcca 7

<210> 38
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> biotina 5’

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (16)..(20)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (45)..(45)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90)) 5

<400> 38
tgctgataac cgacgnnnnn gctgccgctc gatacacagc tgagg45

<210> 39
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> biotina 5’

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (16)..(20)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (45)..(45)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90)

<400> 39
tgctgtgtgc cgacgnnnnn gctgccgctc gatacacagc tgagg 45

<210> 40
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> biotina 5’

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (16)..(20)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (45)..(45)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90)

<400> 40
tgctggcact cgacgnnnnn gctgccgctc gatacacagc tgagg 45

<210> 41
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> biotina 5’

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (16)..(20)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (45)..(45)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90)

<400> 41
tgctgtatcc cgacgnnnnn gctgccgctc gatacacagc tgagg 45

<210> 42
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1) .. (1)
<223> biotina 5’

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (16)..(20)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (46)..(46)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90)

<400> 42
tgctgcagcg cgacgnnnnn gctgccgctc gatacacagc tgagg 45

<210> 43
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1) .. (1)
<223> biotina 5'

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (16)..(20)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (45)..(45)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90)

<400> 43
tgctgaccag cgacgnnnnn gctgccgctc gatacacagc tgagg 45

<210> 44
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> biotina 5'

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (16)..(20)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (45)..(45)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90)

<400> 44
tgctggaaca cgacgnnnnn gctgccgctc gatacacagc tgagg 45

<210> 45
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC

<222> (1)..(1)
<223> biotina 5’

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (16)..(20)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (45)..(45)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90)

<400> 45
tgctgcaggt cgacgnnnnn gctgccgctc gatacacagc tgagg 45

<210> 46
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> biotina 5’

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (16)..(20)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (45)..(45)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90)

<400> 46
tgctggctcg cgacgnnnnn gctgccgctc gatacacagc tgagg 45

<210> 47
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> biotina 5’

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (16)..(20)
<223> n representa inosina (I) 40

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (46)..(46)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90) 45

<400> 47
tgctggatac cgacgnnnnn gctgccgctc gatacacagc tgagg45

<210> 48
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> biotina 5'

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (16)..(20)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (45)..(45)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90)

<400> 48
tgctgaggcc cgacgnnnnn gctgccgctc gatacacagc tgagg 45

<210> 49
<211> 69
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> biotina 5'

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (30)..(34)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (40)..(44)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (69)..(69)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90)

<400> 49

tttagatggc agattcgaca taactgctgn nnnncgacgn nnnngctgcc gctcgataca 60

cagctgagg 69

<210> 50
<211> 69
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> biotina 5'

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (30)..(34)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (40)..(44)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (69)..(69)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90) 5

<400> 50

tttagatggc agattcgact gtgctgctgn nnnncgacgn nnnngctgcc gctcgataca 60

cagctgagg 69

<210> 51
<211> 69
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> biotina 5'

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (30)..(34)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (40)..(44)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (69)..(69)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90)

<400> 51

tttagatggc agattcgacg cacttgctgn nnnncgacgn nnnngctgcc gctcgataca 60

cagctgagg 69

<210> 52
<211> 69
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> biotina 5'

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (30)..(34)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (40)..(44)
<223> n representa inosina (I) 5

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (69)..(69)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90) 10

<400> 52

tttagatggc agattcgact atcctgctgn nnnncgacgn nnnngctgcc gctcgataca 60

cagctgagg 69

<210> 53
<211> 69
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> biotina 5'

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (30)..(34)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (40)..(44)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (69)..(69)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90)

<400> 53

tttagatggc agattcgacc agcgtgctgn nnnncgacgn nnnngctgcc gctcgataca 60

cagctgagg 69

<210> 54
<211> 69
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> biotina 5’

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (30)..(34)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (40)..(44)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (69)..(69)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90)

<400> 54

tttagatggc agattcgaca ccagtgctgn nnnncgacgn nnnngctgcc gctcgataca 60

cagctgagg 69

<210> 55
<211> 69
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> biotina 5’

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (30)..(34)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (40)..(44)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (69)..(69)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90)

<400> 55

tttagatggc agattcgacg aacatgctgn nnnncgacgn nnnngctgcc gctcgataca 60

cagctgagg 69

<210> 56
<211> 69
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> biotina 5’

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (30)..(34)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (40)..(44)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (69)..(69)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90)

<400> 56

tttagatggc agattcgacc aggttgctgn nnnncgacgn nnnngctgcc gctcgataca 60

cagctgagg 69

<210> 57
<211> 69
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> 5’ biotina

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (30)..(34)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (40)..(44)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC

<222> (69)..(69)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90)

<400> 57

tttagatggc agattcgacg ctcgtgctgn nnnncgacgn nnnngctgcc gctcgataca 60

cagctgagg 69

<210> 58
<211> 69
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> biotina 5'

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (30)..(34)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (40)..(44)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (69)..(69)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90)

<400> 58

tttagatggc agattcgacg atactgctgn nnnncgacgn nnnngctgcc gctcgataca 60

cagctgagg 69

<210> 59
<211> 69
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1) .. (1)
<223> biotina 5'

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (30)..(34)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (40)..(44)
<223> n representa inosina (I)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (69)..(69)
<223> Carboxi dT (Glen research cat# 10-1035-90)

<400> 59

tttagatggc agattcgaca ggcctgctgn nnnncgacgn nnnngctgcc gctcgataca 60

cagctgagg 69

<210> 60
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> biotina CXS

<400> 60
tttagatgg cagat 15

<210> 61
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> biotina

<400> 61
aattccggaa catactagtc aacatga 27

<210> 62
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> grupo terminal 5'- amino (Glen Research catalog # 10-1905-90) unido por un Espaciador -PEG18 (Glen Research catalog # 10-1918-90) y un espaciador fotoescindible (Glen Research catalog#10-4913)

<400> 62
acctcagctg tgtatcgagc ggcagcggcc tcgtcg 36

<210> 63
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 63
tgtgcgacga ggccgctgc 19

<210> 64
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5’

<400> 64
cacaagtacg aacgtgcatc agag 24

<210> 65
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5’

<400> 65
tcctctctga tgcacgttcg tact 24

<210> 66
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5’

<400> 66
cacatagtct cctccacttc catg 24

<210> 67
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5’

<400> 67
tcctcatgga agtggaggag acta 24

<210> 68
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5'

<400> 68
cacatacatc gttccagata ccg 23

<210> 69
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5'

<400> 69
tcctcatgga agtggaggag acta 24

<210> 70
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5'

<400> 70
cacatccagt gcaagactga acag 24

<210> 71
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1) .. (1)
<223> fosfato 5'

<400> 71
tcctctgttc agtcttgcac tgga 24

<210> 72
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5'

<400> 72
cacaagcatc actactctgt ctgg24

<210> 73
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5'

<400> 73
tcctccagac agagtagtga tgct 24

<210> 74
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5'

<400> 74
aggacgagca ggacctggaa cctggtgcgt tcctccacca cgtctccg 48

<210> 75
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5'

<400> 75
gcaccaggtt ccaggtcctg ctcg 24

<210> 76
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5'

<400> 76
aggactcgac cactgcaggt ggagctccgt tcctccacca cgtctccg 48

<210> 77
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5'

<400> 77
ggagctccac ctgcagtggt cgag 24

<210> 78
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5'

<400> 78
aggacgtgct tcctctgctg caccaccggt tcctccacca cgtctccg 48

<210> 79
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5'

<400> 79
cggtggtgca gcagaggaag cacg 24

<210> 80
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5'

<400> 80
aggacctggt gtcgaggtga gcagcagcgt tcctccacca cgtctccg 48

<210> 81
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5'

<400> 81
gctgctgctc acctcgacac cagg 24

<210> 82
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5'

<400> 82
aggactcgac gaggtccatc ctggtcgcgt tcctccacca cgtctccg 48

<210> 83
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5'

<400> 83
gcgaccagga tggacctcgt cgag 24

<210> 84
<211> 20

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 84
cggagacgtg gtggaggaac 20

<210> 85
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 85
acctcagctg tgtatcgag 19

<210> 86
<211> 88
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5'

<400> 86

cggcagctgc ctcgtcgcac atccagtgca agactgaata gaggactcga cgaggtccat 60

cctggtcgcg ttcctccacc acgtctcc 88

<210> 87
<211> 87
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> fosfato 5'

<400> 87

cggcaggcct cgtcgcacat ccagtgcaag actgaacaga ggacctcgac gaggtccatc 60

ctggtcgcgt tcctccacca cgtctcc 87

<210> 88
<211> 90
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (23)..(23)
<223> n representa c, g, t o a

<400> 88

cggcctcgtc gcacatcatt gcnacgactg aacaggagga ctcgacgagg tccatcctgt 60

ctgccggttc tctcaccaca ccagtctctc 90

<210> 89
<211> 88
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 89

cggcagcggt ctcgtcgcac atccagtgca agactaacag aggacctcga cgagttccat 60

cctggtcgcg ttcctccacc acgtctcc 88

<210> 90
<211> 82
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 90

cgggcctcgt cgcacatcca gtgcaagact gaacagagga ctcgacgagg tccatcctgg 60

tcgcgttcct ccaccacgtt cc 82

<210> 91
<211> 83
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 91

cggcagcggc ctcgtcgaca agcatcacta ctctgtctgg aggatcgagg tccatcctgg 60

tcgcgttcct ccaccacgtc tcc 83

<210> 92
<211> 88
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 92

cggcagcggc ctcgtcgcac atccagtgca agactgaaca gaggactcga cgaggtccat 60

cctggtcgcg ttcctccacc acgtctcc 88

<210> 93
<211> 87
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 93

cggcagcggc ctcgtcgcac atccagtgca agattgaaca gaggactcga cgaggtccat 60

cctggtcgcg ttcctccacc acgtctc 87

<210> 94
<211> 87
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 94

cggcagcggc ctcgtcgcac ttcagtgcaa gactgaacag aggactcgat gaaggtccat 60

cctggtcgcg ttcctccacc acgtctc 87

<210> 95
<211> 86
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 95

cggcagcggc ctcgtcgcac atccaggcaa gactgaacag aggactcgac gaggtccatc 60

ctggtcgcgt tcctccacca cgtctc 86

<210> 96
<211> 87
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (26)..(26)
<223> n representa a, c, g o t

<400> 96

cggcagcggc ctcgtcgcac atagtnccct ccacttccat gaggactcga cgaggtccat 60

cctggtcgcg ttcctccacc acgtctc 87

<210> 97
<211> 87
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 97

cggcagcggc ctcgtcgcac atccagtgca agactgaaca gaggactcga cgaggtccat 60

cctggtcgcg ttcctccacc acgtctc 87

<210> 98
<211> 86
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 98

cggcagcggc ctcgttgcac atcagtgcaa gactgaacag aggactcgac gaggtccatc 60

ctggtcgcgt tcctccacca cgtctc 86

<210> 99
<211> 85
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 99

cggcagcggc ctcgtcgcac atcagtgcaa gactgaacag aggctcgacg aggtccatcc 60

tggtcgcgtt cctccaccac gtctc 85

<210> 100
<211> 86
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 100

cggcagcggc ctcgtcgcac atcagtgcaa gactgaacag aggactcgac gaggtccatc 60

ctggtcgcgt tcctccacca cgtctc 86

<210> 101
<211> 87
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 101

cggcagcggc ctcgtcgcac atccagtgca agactgaaca gaggactcga cgaggtccat 60

cctggtcgcg ttcctccacc acgtctc 87

<210> 102
<211> 86
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 102

cggcagcggc ctcgtcgcac atcagtgcaa gactgaacag aggactcgac gaggtccatc 60

ctggtcgcgt tcctccacca cgtctc 86

<210> 103
<211> 87
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 103

cggcagcggc ctcgtcgcac atccagtgca agactgaaca gaggactcga cgaggtccat 60

cctggtcgcg ttcctccacc acgtctc 87

<210> 104
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> 5' amino C6 (Glen Research catalogue # 10-1906-90)

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (21)..(21)
<223> Biotina 3'

<400> 104
cgatggtacg tccaggtcgc a 21

<210> 105
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (20)..(20)
<223> Amino-C2-dT-3'-PO4 (Glen research catalogue #10-1037-90)

<400> 105
gcgacctgga gcatccatcg 20

<210> 106
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 106
cgatggtacg tccaggtcgca 21

<210> 107
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 107
atcgtgctgc gacct 15

<210> 108
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 108
gcacgatatg tacgatacac tga 23

<210> 109
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 109
gtgccattca gtgt 14

<210> 110
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 110
atggcactta atggttgtaa tgc 23

<210> 111

<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 111
tgtatgcgca ttac 14

<210> 112
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 112
gcatacaaat cgataatgca c 21

<210> 113
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 113
cgatggtacg tccaggtcgc a 21

<210> 114
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 114
gtgcattatc gatttgtatg c 21

<210> 115
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> 5' del amino-modificador C6 (Glen research cat# 10-1916-90) apropiado para la union de entidades funcionales, tales como péptidos, peque´ñas moléculas o polímeros

<400> 115
ctatgcggac tgactggtac 20

<210> 116
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> 5' del amino-modificador C6 (Glen research cat# 10-1916-90) apropiado para la union de entidades funcionales, tales como péptidos, peque´ñas moléculas o polímeros

<400> 116
ctatgatgct taggcggtac 20

<210> 117
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> 5' del amino-modificador C6 (Glen research cat# 10-1916-90) apropiado para la union de entidades funcionales, tales como péptidos, peque´ñas moléculas o polímeros

<400> 117
ctatgtaccg tacgtggtac 20

<210> 118
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> 5' del amino-modificador C6 (Glen research cat# 10-1916-90) apropiado para la union de entidades funcionales, tales como péptidos, peque´ñas moléculas o polímeros

<400> 118
ctatgaatgc tagctggtac 20

<210> 119
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> 5' del amino-modificador C6 (Glen research cat# 10-1916-90) apropiado para la union de entidades funcionales, tales como péptidos, peque´ñas moléculas o polímeros

<400> 119
ctatggattg cgcgtggtac 20

<210> 120
<211> 20
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> 5' del amino-modificador C6 (Glen research cat# 10-1916-90) apropiado para la union de entidades funcionales, tales como péptidos, peque´ñas moléculas o polímeros

<400> 120
ctatgccact attagggtac 20

<210> 121
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> unido a ligador fotoescindible (Glen research cat#10-4913-90) which is linked to 5'-biotin (Glen research Cat#10-1953-95)

<400> 121
tataggatcc gtaccagtca gtccgcatag gaattctagt 40

<210> 122
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> unido a ligador fotoescindible (Glen research cat#10-4913-90) which is linked to 5'-biotin (Glen research Cat#10-1953-95)

<400> 122
tataggatcc gtaccgccta agcatcatag gaattctagt 40

<210> 123
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> unido a ligador fotoescindible (Glen research cat#10-4913-90) which is linked to 5'-biotin (Glen research Cat#10-1953-95)

<400> 123
tataggatcc gtaccacgta cggtacatag gaattctagt 40

<210> 124

<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> unido a ligador fotoescindible (Glen research cat#10-4913-90) which is linked to 5'-biotin (Glen research Cat#10-1953-95)

<400> 124
tataggatcc gtaccagcta gcattcatag gaattctagt 40

<210> 125
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> unido a ligador fotoescindible (Glen research cat#10-4913-90) which is linked to 5'-biotin (Glen research Cat#10-1953-95)

<400> 125
tataggatcc gtaccacgcg caatccatag gaattctagt 40

<210> 126
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> unido a ligador fotoescindible (Glen research cat#10-4913-90) which is linked to 5'-biotin (Glen research Cat#10-1953-95)

<400> 126
tataggatcc gtaccctaat agtggcatag gaattctagt 40

<210> 127
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> unido a ligador fotoescindible (Glen research cat#10-4913-90) which is linked to 5'-biotin (Glen research Cat#10-1953-95)

<400> 127
tataggatcc gtacc 15

<210> 128
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 128
actagaattc ctatg 15

<210> 129
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 129

Gly Arg Gly Asp Ser Pro Cys
1 5

<210> 130
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 130

Gly Arg Ala Asp Ser Pro Cys
1 5

<210> 131
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 131

Gly Arg Gly Glu Ser Pro Cys
1 5

<210> 132
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 132

Gly Asp Gly Arg Ser Pro Cys
1 5

<210> 133
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 133

Cys Lys Lys Lys
1

<210> 134
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 134

Cys Phe Phe Lys Lys Lys
1 5

<210> 135
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> 5' del amino-modificador C6 (Glen research cat# 10-1039-90) adecuado para la union a entidades funcionales, tales como péptidos, pequeñas moléculas o polímeros

<400> 135
ctatgcggac tgactggtac 20

<210> 136
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> 5' del amino-modificador C6 (Glen research cat# 10-1039-90) adecuado para la union a entidades funcionales, tales como péptidos, pequeñas moléculas o polímeros

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (7)..(14)
<223> n representa G, A, T o C 10

<400> 136
ctatgannnn nnnncggtac 20

<210> 137
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(3)
<223> fosforotioato

<400> 137
tataggatcc gtaccagtca gtccgcatag gaattctagt 40

<210> 138
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(3)
<223> fosforotioato

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (17)..(24)
<223> n representa A, T, C o G.

<400> 138
tataggatcc gtaccgnnnn nnnntcatag gaattctagt 40

<210> 139
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(3)
<223> fosforotioato

<400> 139
tataggatcc gtacc 15

<210> 140
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 140
actagaattc ctatg 15

<210> 141
<211> 71

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (47)..(51)
<223> n representa inosina (I)

<400> 141

acctcagctg tgtatcgagc ggcagccccc ccgtcgcccc ccagcannnn ngtcgaatct 60

gccatctaaa a 71

<210> 142
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 142
cctgtagcat cactccatgt tgaacgtaga tgcaagtacc ttttagatgg cagattcgac 60

<210> 143
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 143
cgctcgatac acagctgagt 20

<210> 144
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (46)..(50)
<223> n representa inosina (I)

<400> 144

acctcagctg tgtatcgagc ggcagccccc cgtcgccccc cagcannnnn gtcgaatctg 60

ccatctaaaa 70

<210> 145
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 145
cctgtagcat cactccatgt ttttagatgg cagattcgac 40

<210> 146
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 146
cgctcgatac acagctgagt t 21

<210> 147
<211> 71
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 147
acctcagctg tgtatcgagc ggcagccccc ccgtcgcccc ccagcacccc cgtcgaatct 60

gccatctaaa a 71

<210> 148
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 148
cctgtagcat cactccatgt tgaacgtaga tgcaagtacc ttttagatgg cagattcgac 60

<210> 149
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 149
cgctcgatac acagctgagg t 21

<210> 150
<211> 71
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 150
acctcagctg tgtatcgagc ggcagccccc ccgtcgcccc ccagcacccc cgtcgaatct 60

gccatctaaa a 71

<210> 151

<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 151
cctgtagcat cactccatgt tttagatggc agattcgac 39

<210> 152
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 152
cgctcgatac acagctgagg t 21 35

<210> 153
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> espaciador fotoescindible (Glen Research Products cat# 10-4913), unido a LH193 ({[(4-metoxi-fenil)-difenil-metil]-amino}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etílico del éster 2-ciano-etílico de ácido diisopropil-fosforamidoso

<400> 153
cagcttggac accacgtcat ac 22

<210> 154
<211> 84
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 154

gctagagacg tggtggagga agtcttccta gaagctggat atcaccacat ctctagcagc 60

tagtatgacg tggtgtccaa gctg 84

<210> 155
<211> 84
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 155

gctagagacg tggtggagga agtcttccta gaagctggat atcaggtctt ctgtcttctt 60

ccgtatgacg tggtgtccaa gctg 84

<210> 156
<211> 84
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 156
gctagagacg tggtggagga agtcttccta gaagctggat atcttcagtt ctcgactcct 60

gagtatgacg tggtgtccaa gctg 84

<210> 157
<211> 84
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 157
gctagagacg tggtggagga agtcttccta gaagctggat atctgacgtg ttgacgtaca 60

cagtatgacg tggtgtccaa gctg 84

<210> 158
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 158
gtcagagacg tggtggagga a 21

<210> 159
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<220>
<221>CARACTERÍSTICA MISC
<222> (1)..(1)
<223> 6-FAM-

<400> 159
tccagcttct aggaagac 18

<210> 160
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 160

Met Gly Asx Asn Phe Gln
1 5

<210> 161
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 161
cagcttggac accacgtcat ac 22

<210> 162
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 162
gtcatactag ctgctagaga tgtggtgata 30

<210> 163
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 163
catacggaag aagacagaag acctgata 28

<210> 164
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 164
tcatactcag gagtcgagaa ctgaagata 29

<210> 165
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 165
catactgtgt acgtcaacac gtcagata 28

<210> 166
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Producida artificialmente

<400> 166

tcgtaacgac tgaatgacgt ctgct 25

Reivindicaciones

1. Un procedimiento de división y mezcla para obtener uno o más complejos bifuncionales comprendiendo cada uno una parte de molécula de presentación y una parte codificante que comprende un oligonucleótido,
en el que un complejo bifuncional naciente que comprende un sitio de reacción química y un sitio de cebado adecuados para la adición enzimática de una marca se hace reaccionar en el sitio de reacción química con uno o más reactivos, y
en el que la(s) marca(s) respectiva(s) que identifican el(los) reactivo(s) se proporcionan en el sitio de cebado usando uno o más enzimas.

2. Un procedimiento de división y mezcla para sintetizar uno o más complejos bifuncionales comprendiendo cada uno una molécula de presentación y un identificador de oligonucleótidos,
dicha molécula de presentación estando ligada por medio de un resto de enlace al identificador de oligonucleótidos,
dicho procedimiento incluyendo las etapas de

a) proporcionar un complejo bifuncional naciente que comprende un sitio de reacción química y un sitio de cebados adecuados para la adición enzimática de una marca de oligonucleótidos,
b) hacer reaccionar el sitio de reacción química con uno o más reactivos, y
c) hacer reaccionar el sitio de cebado enzimáticamente con una o más marcas de oligonucleótidos que identifican el uno o más reactivos,

en el que dos marcas de oligonucleótidos a ser ligados juntos se mantienen juntos por un oligonucleótido complementario que complementa los extremos de los dos oligonucleótidos.

3. Un procedimiento para sintetizar una biblioteca de complejos bifuncionales diferentes repitiendo el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para la síntesis de dichos complejos bifuncionales diferentes, dicho procedimiento comprendiendo la(s) etapa(s) de hacer reaccionar diferentes reactivos con el sitio de reacción química, o con un complejo bifuncional naciente sintetizado en una ronda de síntesis anterior.

4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicha biblioteca contiene de 10^5 a 10^6 complejos bifuncionales diferentes, o de 10^5 a 10^8 complejos bifuncionales diferentes, o de 10^5 a 10^{10} complejos bifuncionales diferentes, o de 10^5 a 10^{14} complejos bifuncionales diferentes.

5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el oligonucleótido identificador de los complejos bifuncionales son de cadena doble, en el que dicha forma de cadena doble se obtiene por un proceso de extensión usando un cebador y una polimerasa capaz de extender dicho cebador.

6. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que se realiza una única ronda de selección frente a una diana específica, o en el que se realizan varias rondas de selección frente a una diana específica.

7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la diana se selecciona del grupo consistente de una proteína, un péptido, un carbohidrato, un polisacárido, una glicoproteína, una hormona, un receptor, un antígeno, un anticuerpo, un virus, un sustrato, un metabolito, un análogo del estado de transición, un cofactor, un inhibidor, un fármaco, un tinte, un nutriente, un factor de crecimiento, una célula y un tejido.

8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7, en el que la biblioteca se divide y se seleccionan uno o más complejos bifuncionales, en el que las moléculas de presentación seleccionadas de dichos complejos bifuncionales tienen una afinidad para dicha diana.

9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, en el que el oligonucleótido identificador de las moléculas sintetizadas o seleccionadas se amplifican usando PCR.

10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que los oligonucleótidos identificadores que identifican las moléculas de presentación seleccionadas y/o amplificadas se secuencian.

11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que se usan uno o más reactivos para la síntesis de la molécula de presentación.

12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que la reacción entre el uno o más reactivos tiene lugar posteriormente a la adición de una o más marcas, tras la adición de una o más marcas, o simultáneamente a la adición de una o más marcas.

13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que se retira un grupo protector que protege el sitio de reacción química y/o el(los) reactivo(s) a ser reaccionado antes de la reacción.

14. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que los oligonucleótidos identificadores de los complejos bifuncionales sintetizados, antes de una etapa de selección, se convierten a forma de cadena doble usando una polimerasa.

15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que al menos algunas reacciones de reactivos tienen lugar en un solvente orgánico.

16. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que las marcas de oligonucleótidos empleadas se sintetizan por química de fosforamidita estándar.

17. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la diana se inmoviliza.

Figura 1.

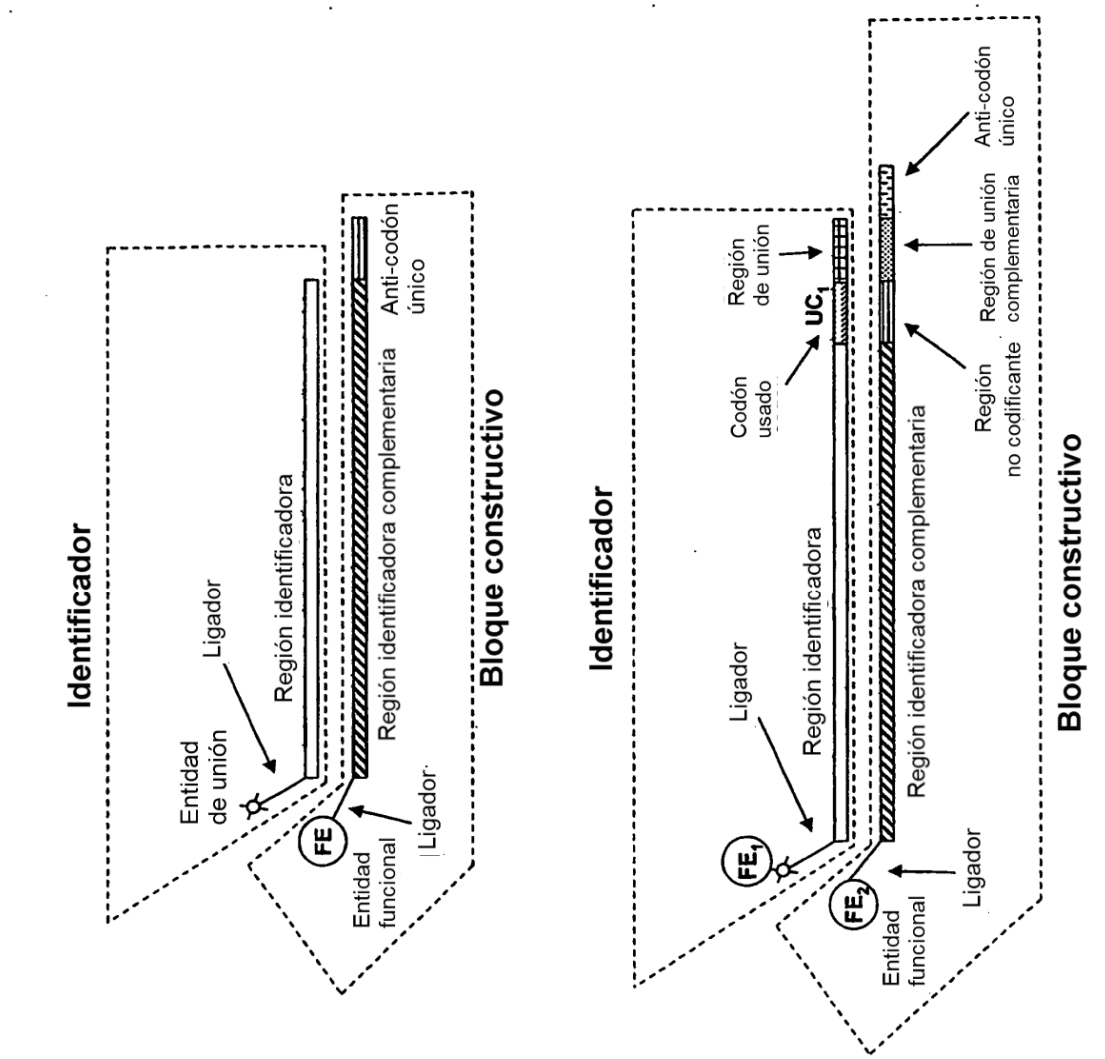

A
Identificador
Entidad de unión
Ligador
Región identificadora
FE
Entidad funcional
Ligador
Región identificadora complementaria
Anti-codón único
Bloque constructivo
B
Identificador
Ligador
Región identificadora
FE1
FE2
Entidad funcional
Codón usado
UC1
Región de unión
Región no codificante
Región identificadora complementaria
Región de unión complementaria
Anti-codón único
Ligador
Bloque constructivo

Figura 2.

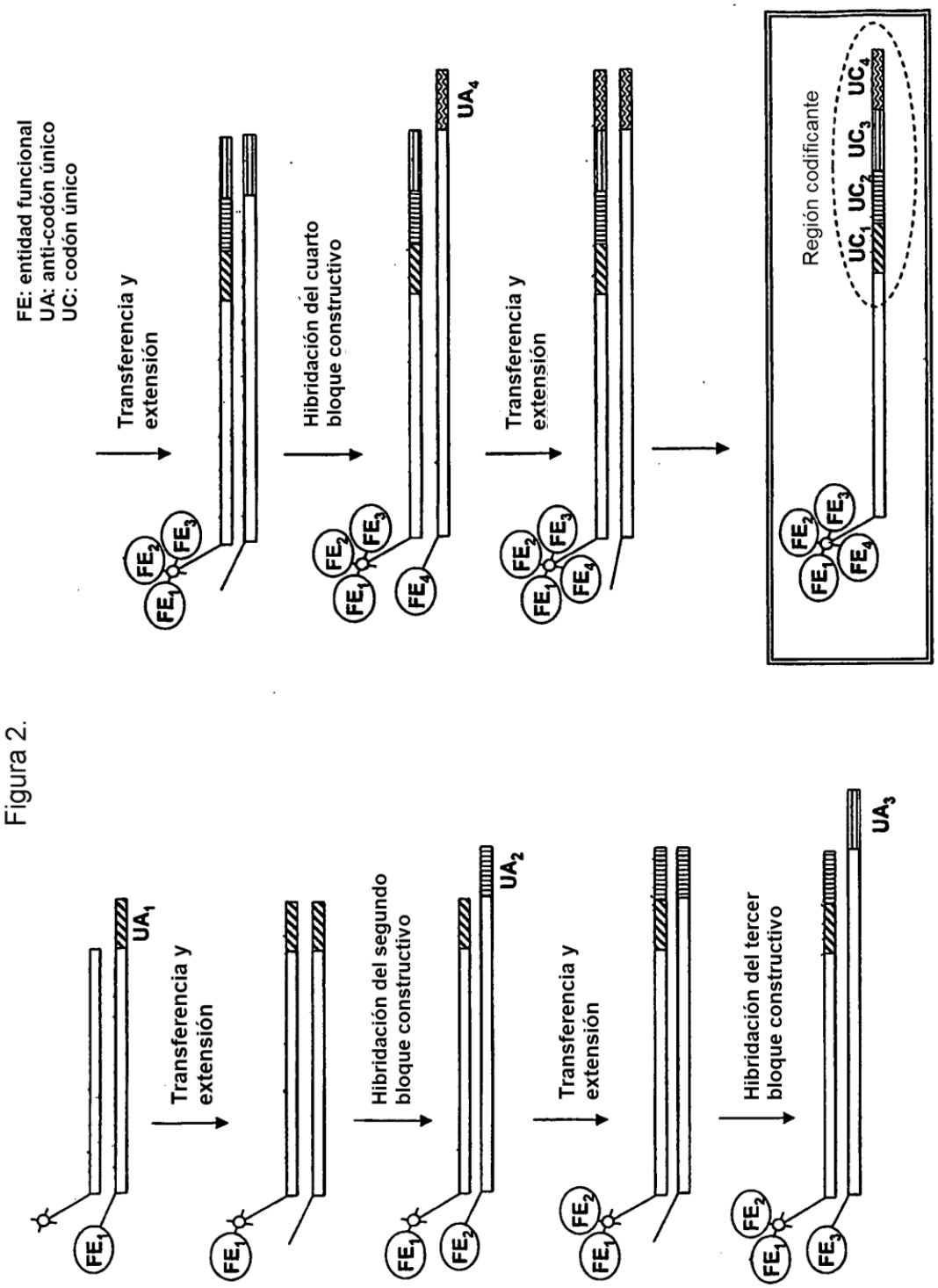

FE: entidad funcional
UA: anti-codón único
UC: codón único
Transferencia y extensión
Hibridación del cuarto bloque constructivo
Transferencia y extensión
Región codificante
Transferencia y extensión
Hibridación del segundo bloque constructivo
Transferencia y extensión
Hibridación del tercer bloque constructivo

Figura 3.

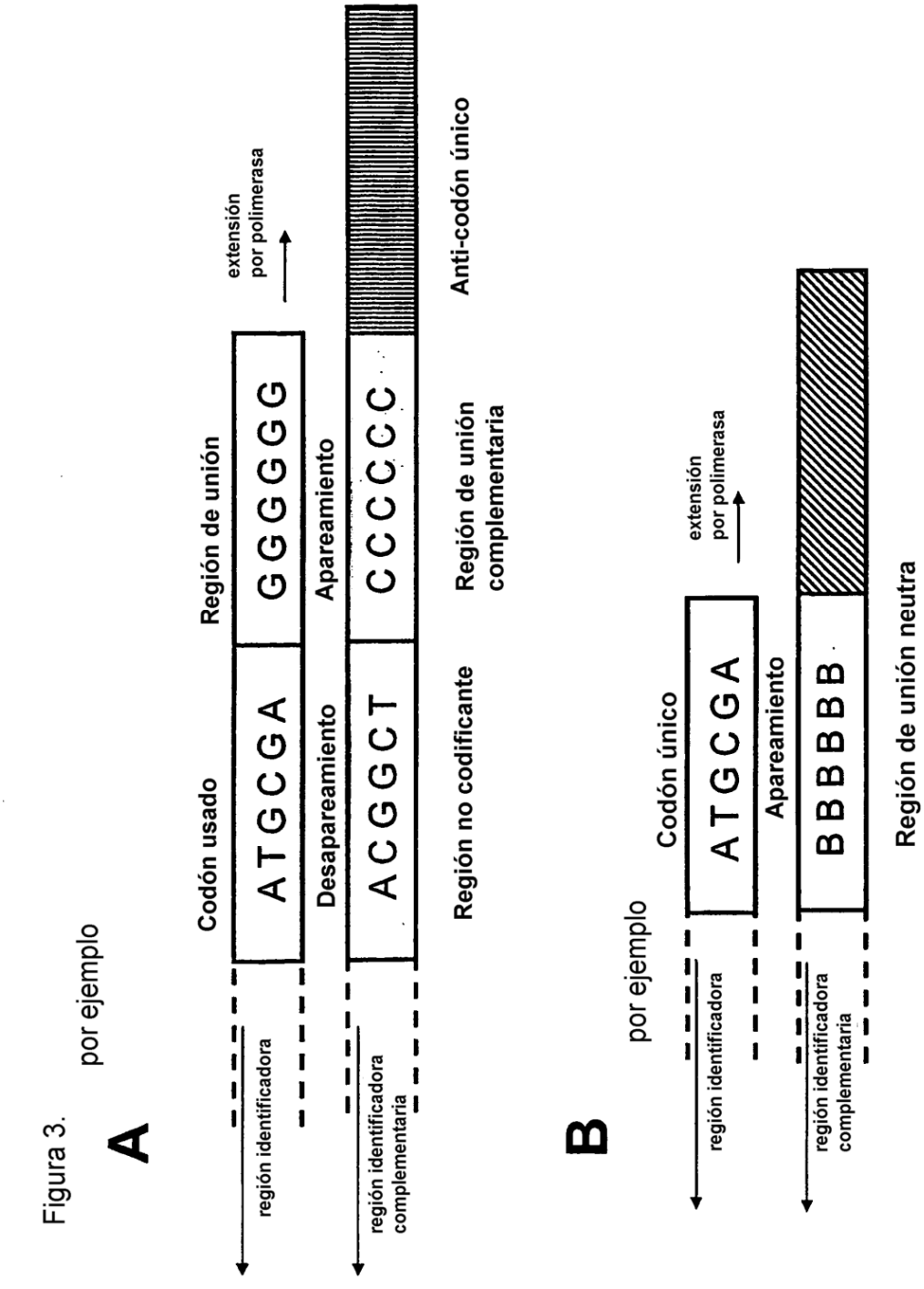

A
por ejemplo
Codón usado
Región de unión
A T G C G A
G G G G G G
extensión por polimerasa
Desapareamiento
Apareamiento
A C G G G C T
C C C C C C
región identificadora
región identificadora complementaria
Región no codificante
Región de unión complementaria
Anti-codón único
B
por ejemplo
Codón único
A T G C G A
extensión por polimerasa
Apareamiento
B B B B B B
región identificadora
región identificadora complementaria
Región de unión neutra

Figura 4.

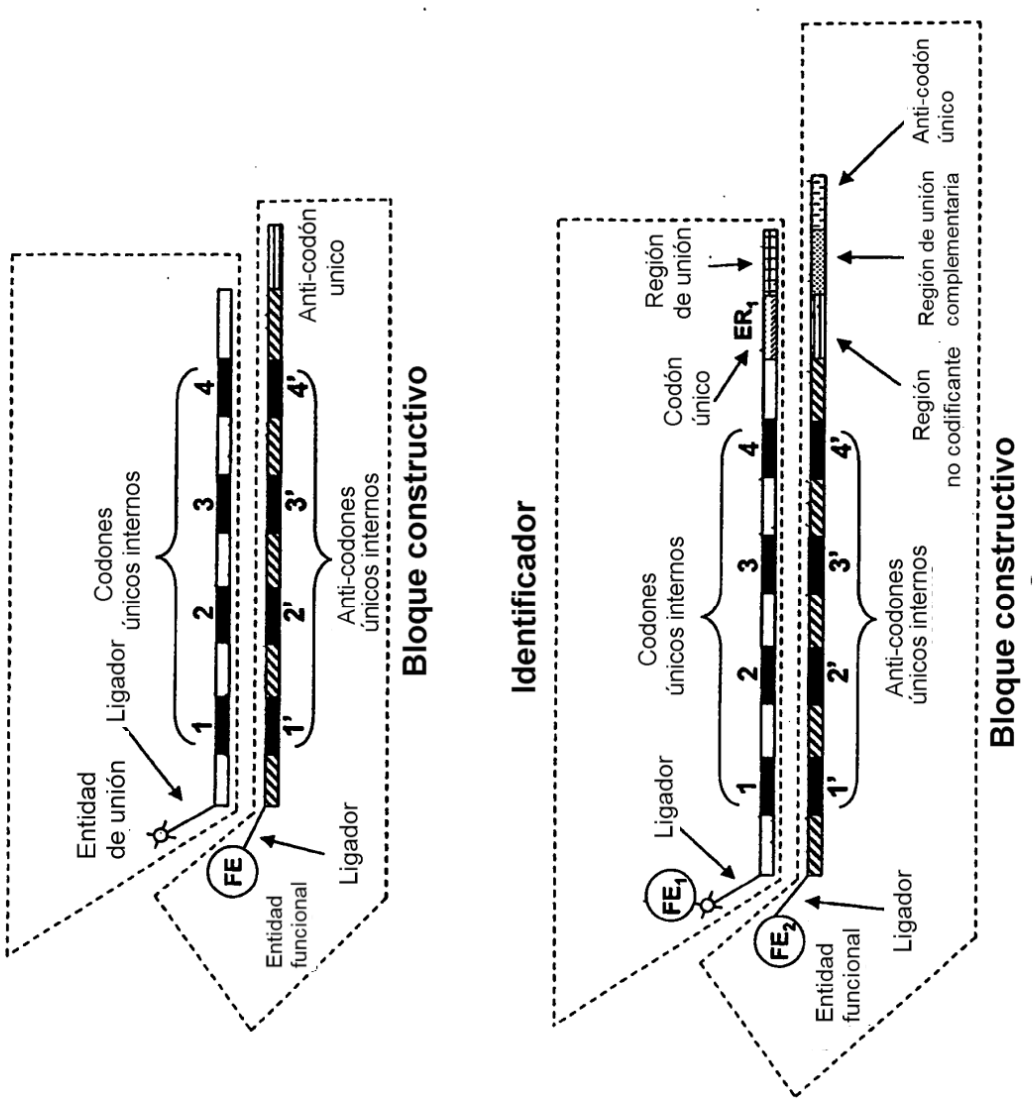

A
Identificador
Entidad de unión
Ligador
Codones únicos internos
1
2
3
4
1'
2'
3'
4'
Anti-codón unico
Anti-codones únicos internos
Bloque constructivo
FE
Entidad funcional
Ligador
B
Identificador
Codones únicos internos
Codón único
Región de unión
ER1
Anti-codón único
Región de unión complementaria
Región no codificante
Ligador
FE1
FE2
Entidad funcional
Ligador
Anti-codones únicos internos
Bloque constructivo

Figura 5.

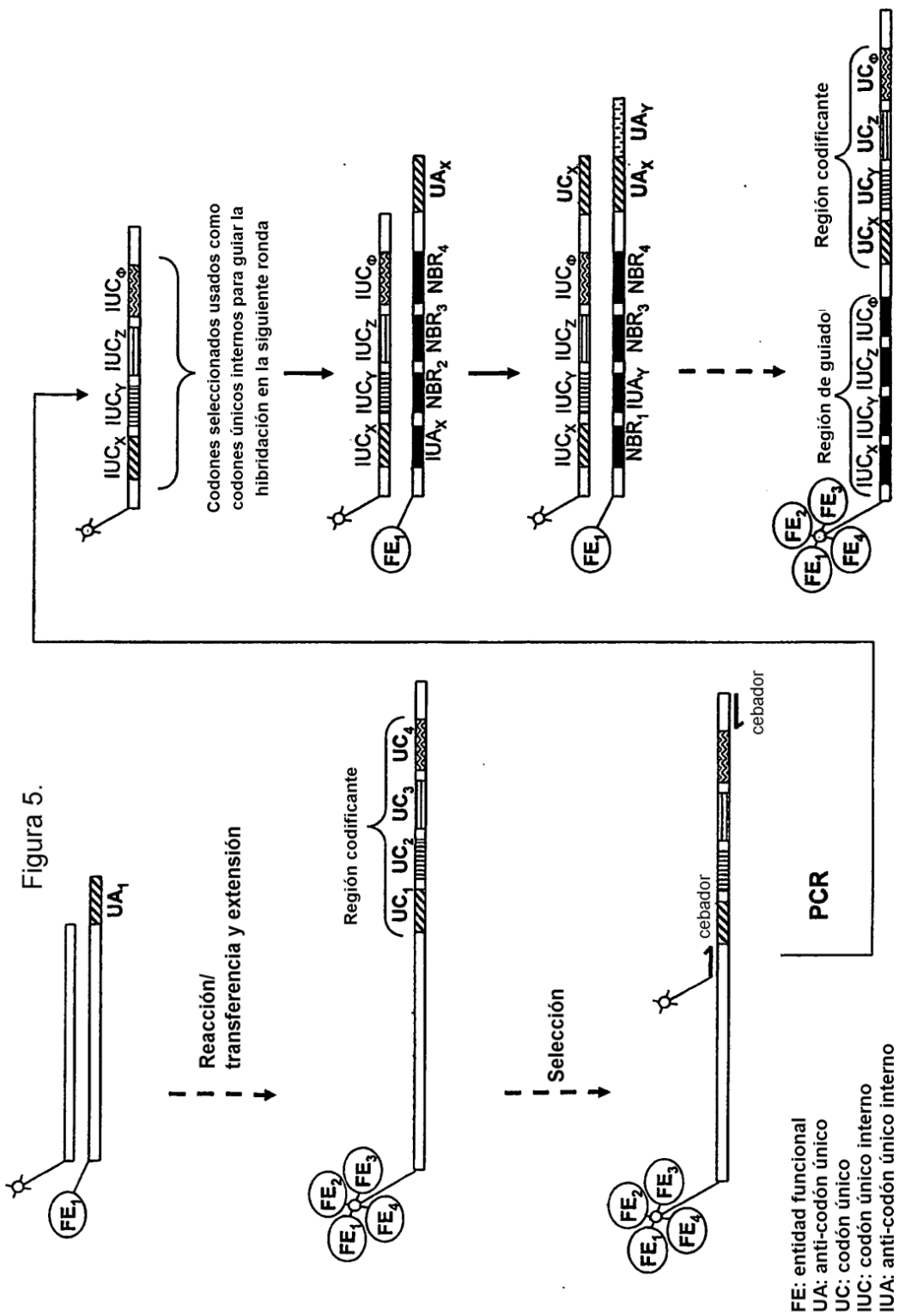

Reacción/
transferencia y extensión
Región codificante
Selección
cebador
PCR
Codones seleccionados usados como codones únicos internos para guiar la hibridación en la siguiente ronda
Región de guiado
Región codificante
FE: entidad funcional
UA: anti-codón único
UC: codón único
IUC: codón único interno
IUA: anti-codón único interno
NBR: región de unión neutra

Figura 6.

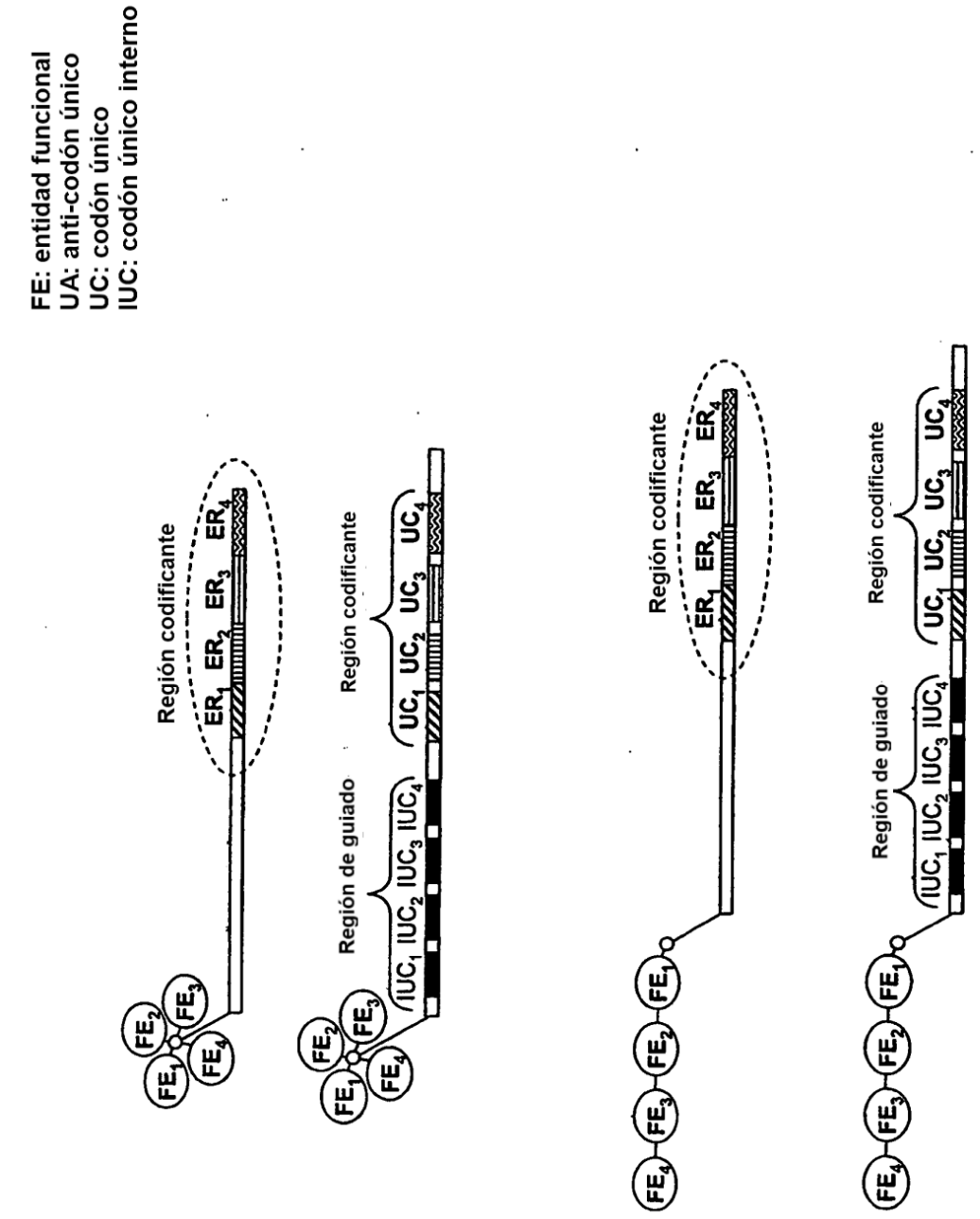

FE: entidad funcional
UA: anti-codón único
UC: codón único
IUC: codón único interno
A
Región codificante
ER1 ER2 ER3 ER4
FE1 FE2 FE3 FE4
Región de guiado
Región codificante
IUC1 IUC2 IUC3 IUC4
UC1 UC2 UC3 UC4
B
Región codificante
ER1 ER2 ER3 ER4
FE1 FE2 FE3 FE4
Región de guiado
Región codificante
IUC1 IUC2 IUC3 IUC4
UC1 UC2 UC3 UC4

Figura 7.

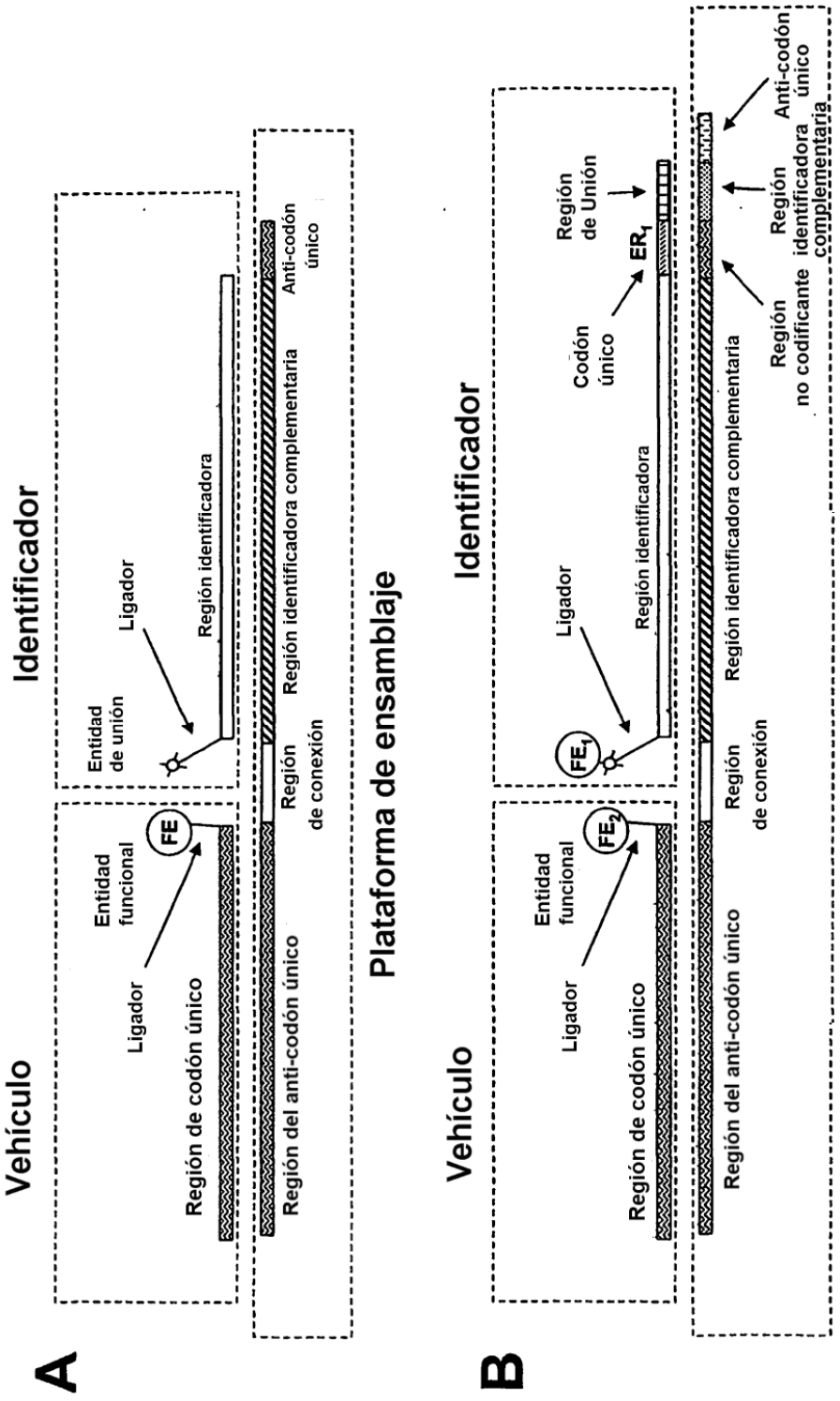
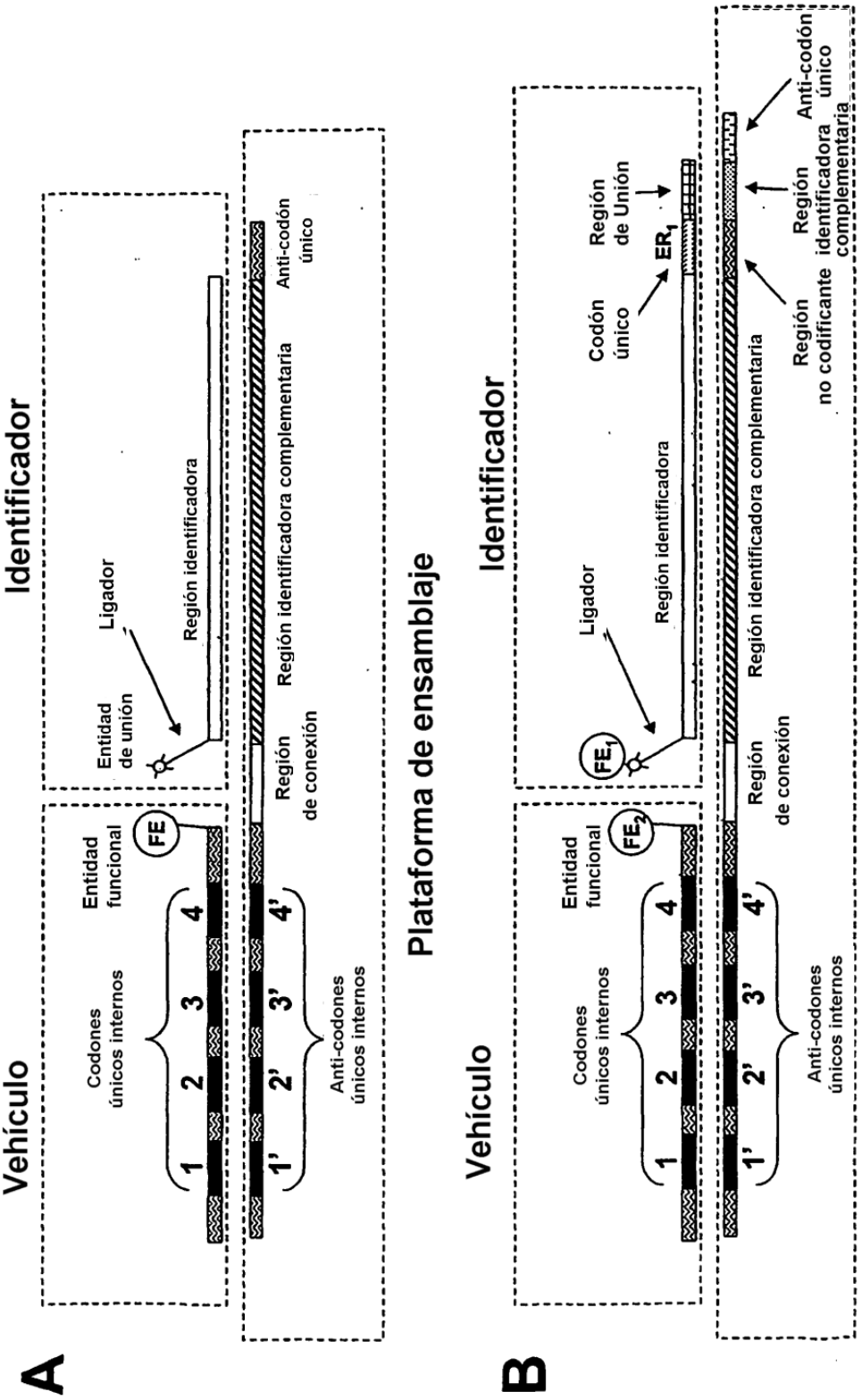
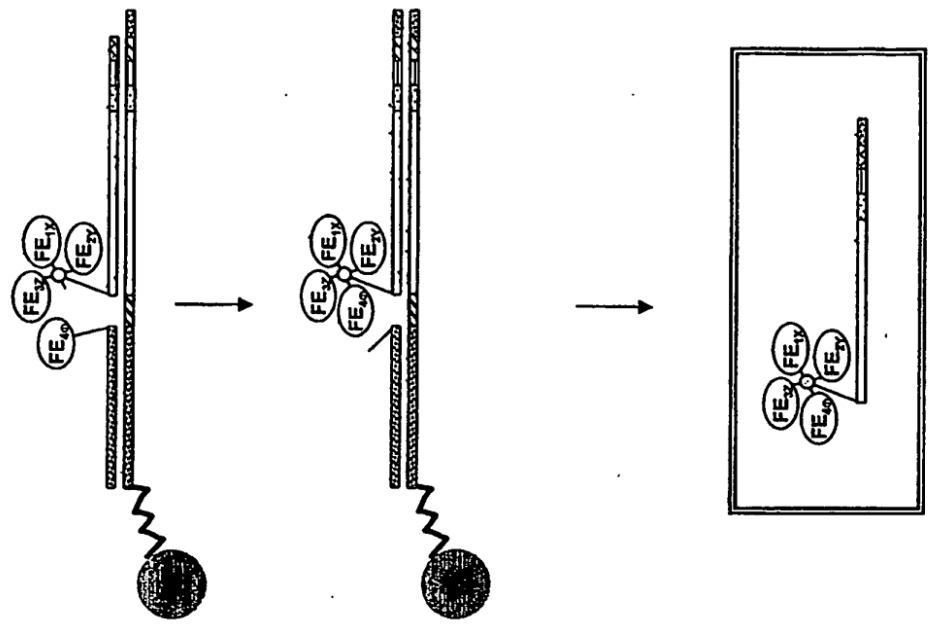

A
Vehículo
Identificador
Entidad funcional
FE
Ligador
Región de codón único
Entidad de unión
Ligador
Región identificadora
Región del anti-codón único
Región de conexión
Región identificadora complementaria
Anti-codón único
Plataforma de ensamblaje
B
Vehículo
Identificador
Entidad funcional
FE2
Ligador
Región de codón único
FE1
Ligador
Región identificadora
Codón único
Región de Unión
ER1
Región del anti-codón único
Región de conexión
Región identificadora complementaria
Región no codificante
Región identificadora complementaria
Anti-codón único
Plataforma de ensamblaje

Figura 8.


A
Vehículo
Identificador
Entidad de unión
Ligador
Región identificadora
Codones únicos internos
Entidad funcional
FE
1
2
3
4
Región de conexión
Región identificadora complementaria
Anti-codón único
1'
2'
3'
4'
Anti-codones únicos internos
Plataforma de ensamblaje
B
Vehículo
Identificador
Ligador
FE1
Región identificadora
Codón único
Región de Unión
ER1
Codones únicos internos
Entidad funcional
FE2
Región identificadora complementaria
Región no codificante
Región identificadora complementaria
Anti-codón único
Región de conexión
Anti-codones únicos internos
Plataforma de ensamblaje



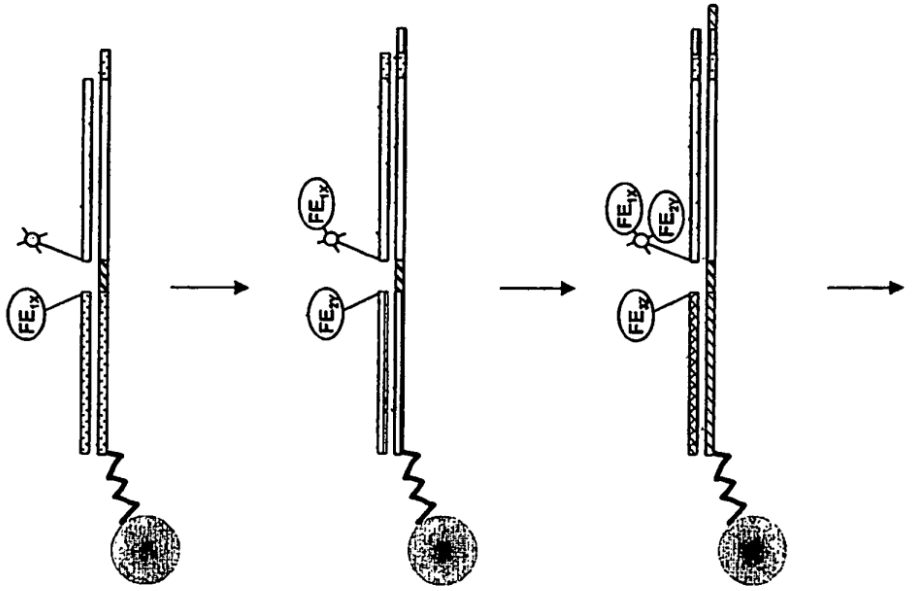


Figura 9.

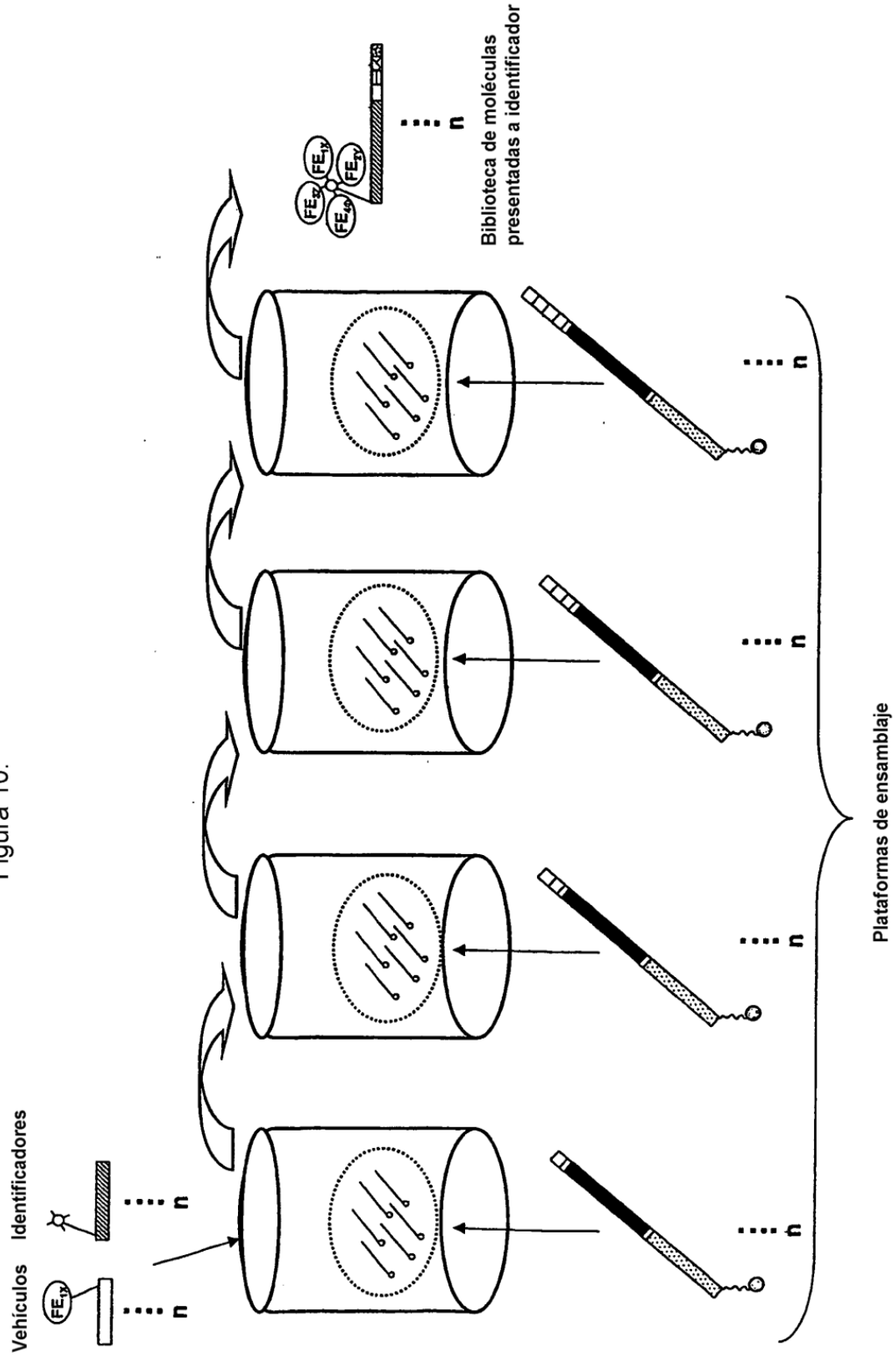
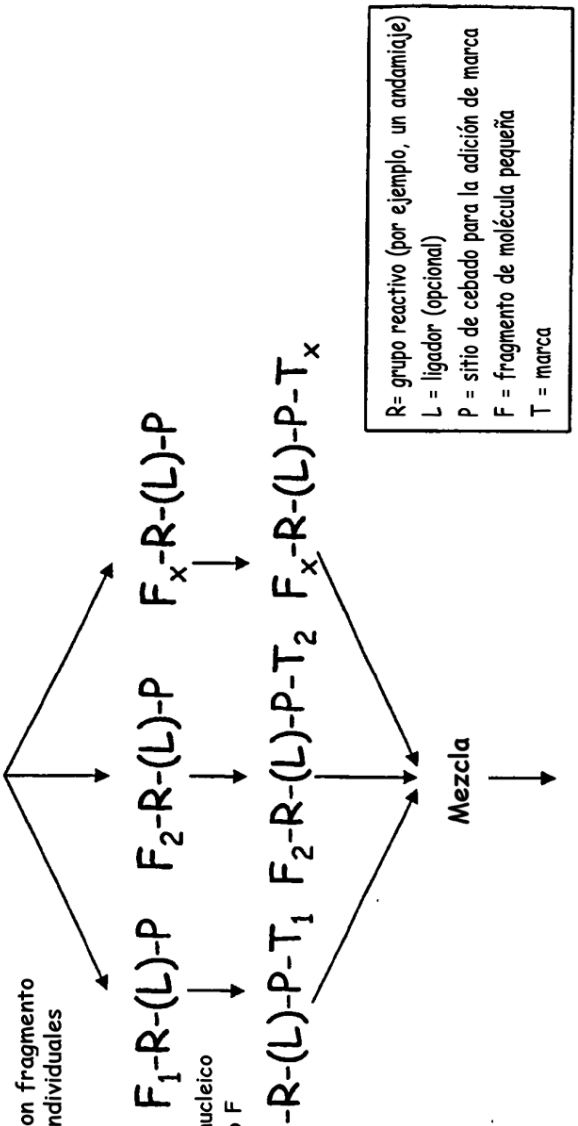

Vehículos
Identificadores
Biblioteca de moléculas presentadas a identificador
Plataformas de ensamblaje
n

Figura 10.

Fig. 11


Síntesis paralela alterna de biblioteca combinatoria
R-(L)-P
Dividir y hacer reaccionar con fragmento F de moléculas pequeñas individuales
F1-R-(L)-P
F2-R-(L)-P
Fx-R-(L)-P
Añadir la marca T de ácido nucleico informativa del reactivo F
F1-R-(L)-P-T1
F2-R-(L)-P-T2
Fx-R-(L)-P-Tx
Mezcla
Repetir el ciclo de división-reacción n veces
R= grupo reactivo (por ejemplo, un andamiaje)
L = ligador (opcional)
P = sitio de cebado para la adición de marca
F = fragmento de molécula pequeña
T = marca

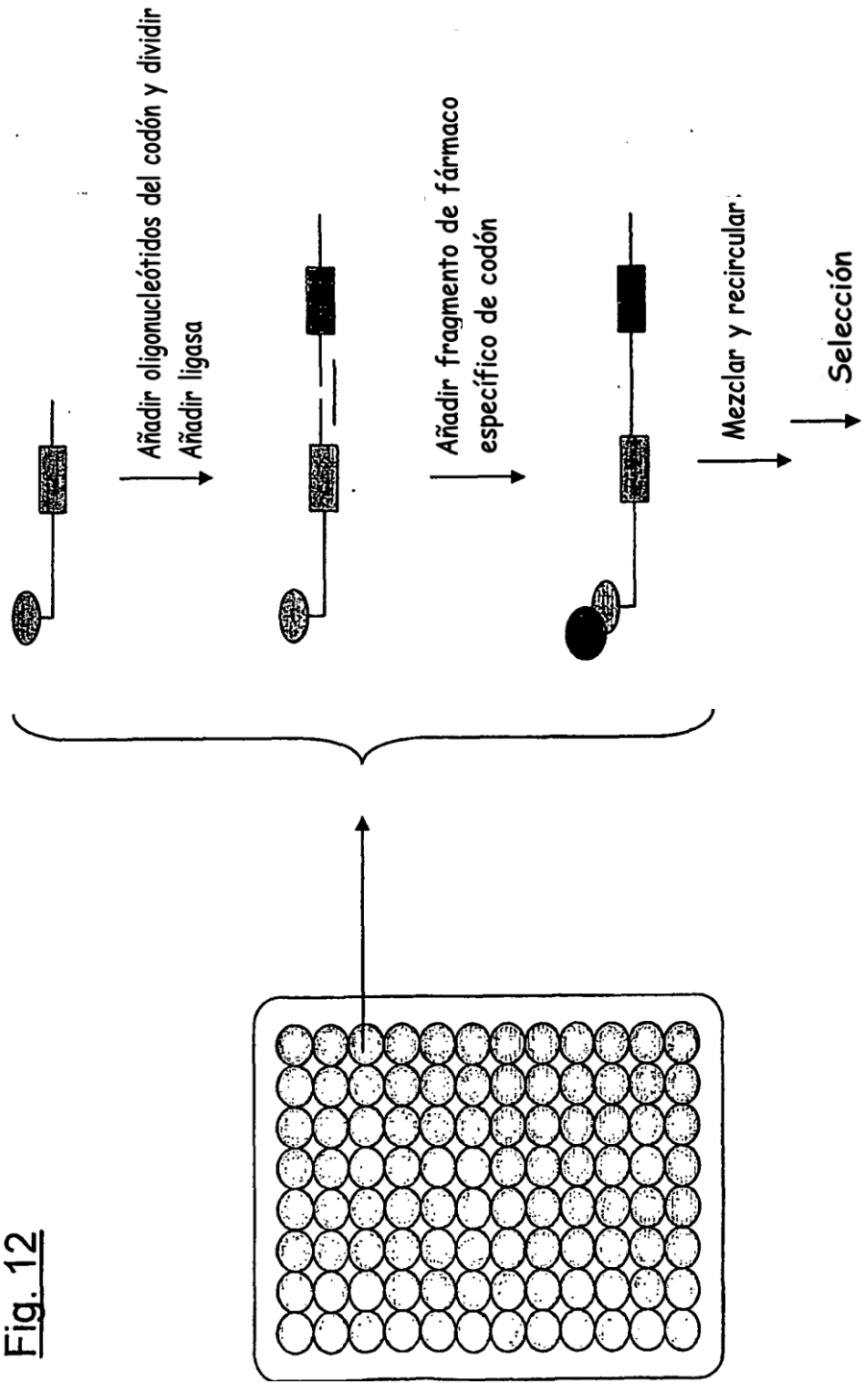

Añadir oligonucleótidos del codón y dividir
Añadir ligasa
Añadir fragmento de fármaco específico de codón
Mezclar y recircular
Selección

Fig. 12

Fig. 13

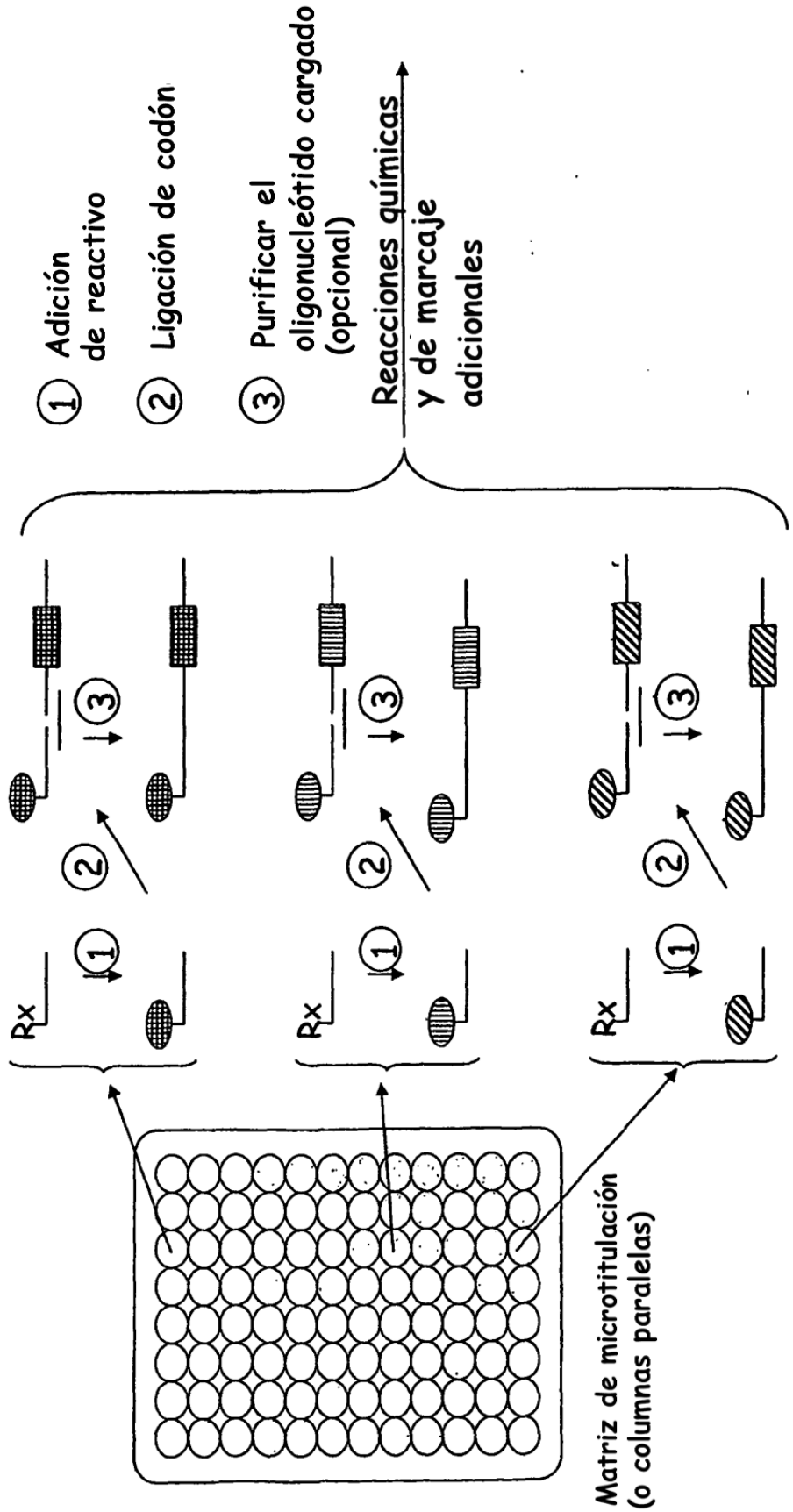

① Adición de reactivo
② Ligación de codón
③ Purificar el oligonucleótido cargado (opcional)
Reacciones químicas y de marcaje adicionales
Rx
Matriz de microtitulación (o columnas paralelas)

Fig. 14

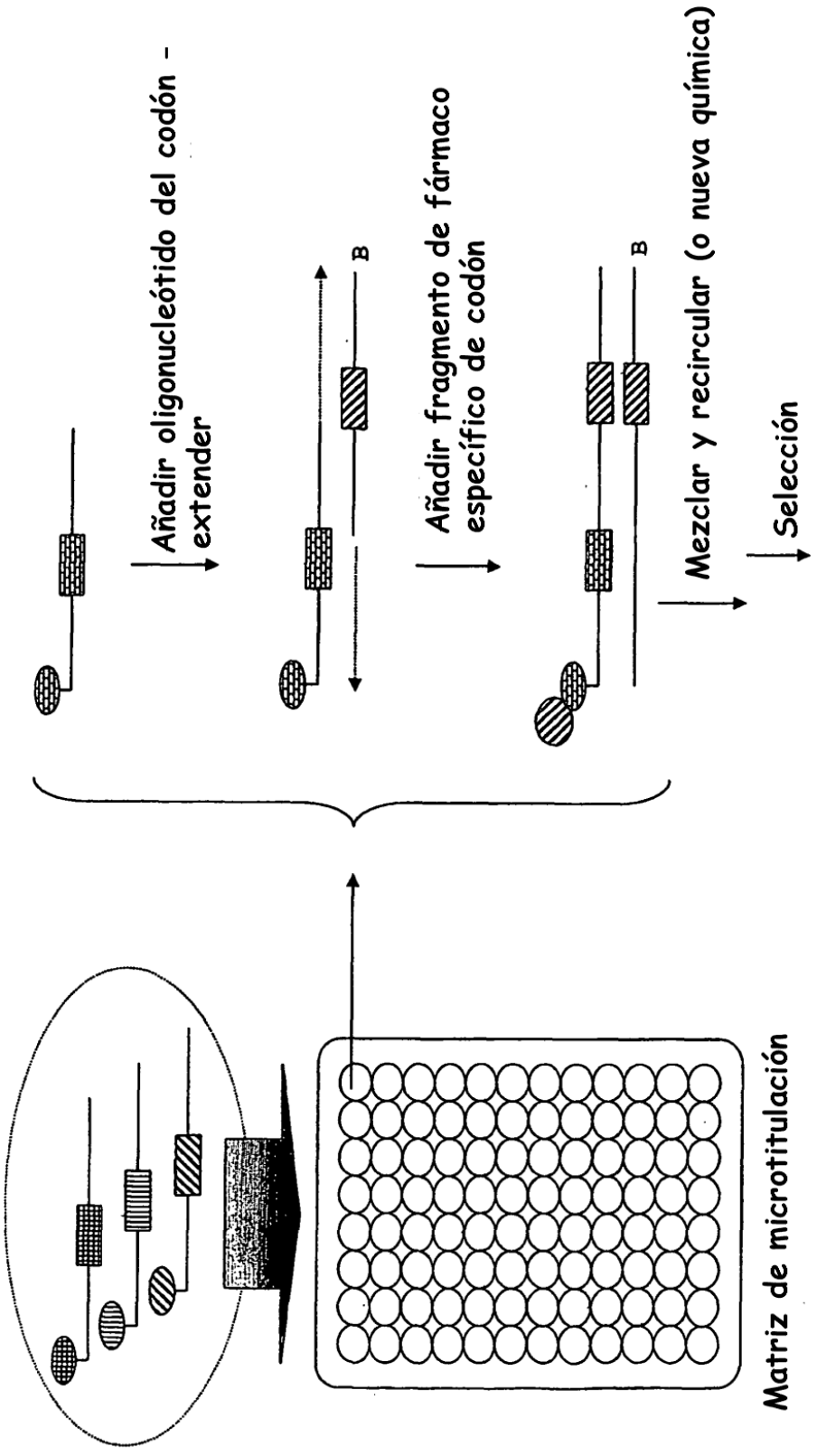

Añadir oligonucleótido del codón - extender
Añadir fragmento de fármaco específico de codón
Mezclar y recircular (o nueva química)
Selección
B
B
Matriz de microtitulación

Fig. 15 **Codificación única**

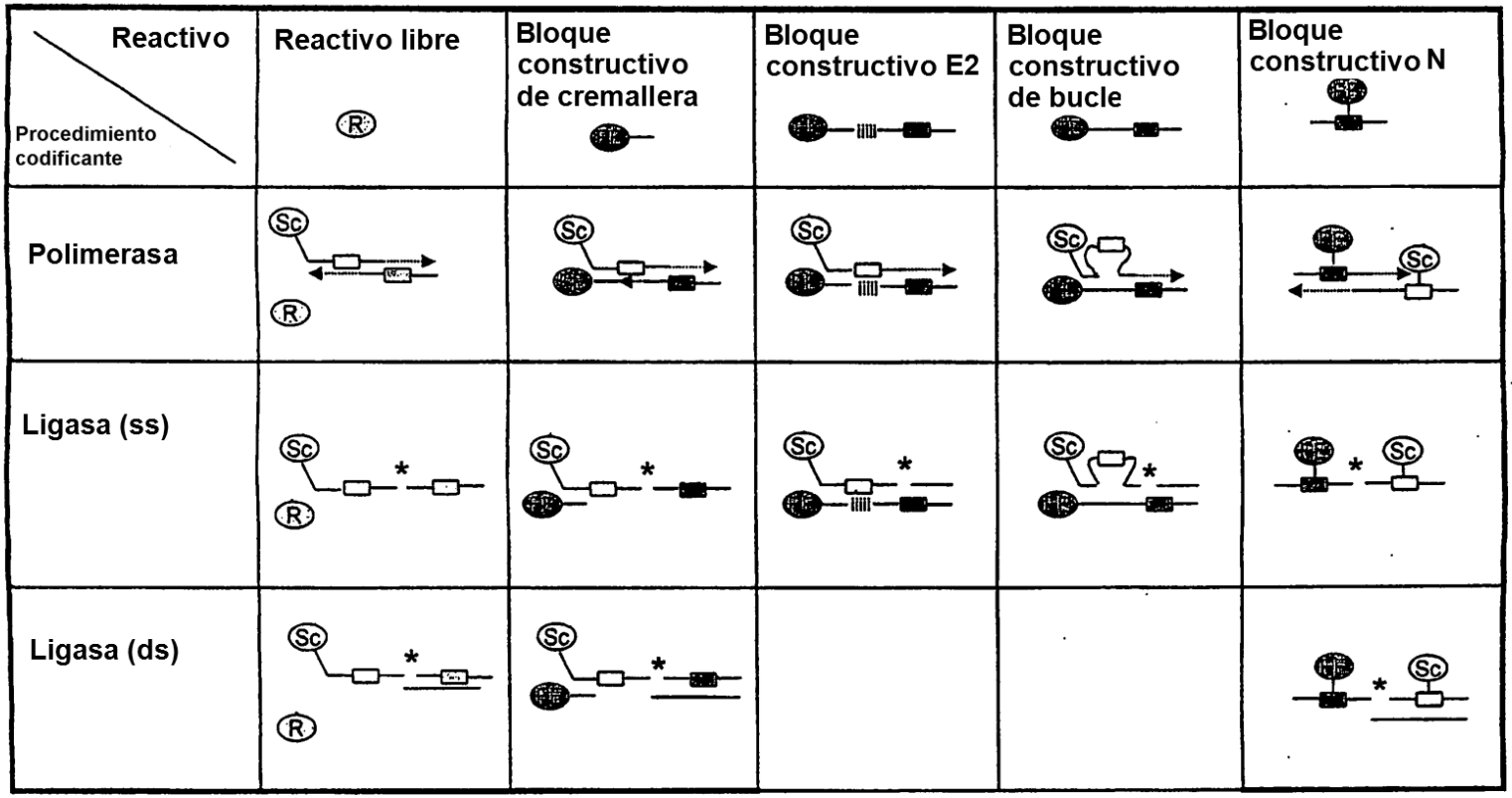


Fig. 16

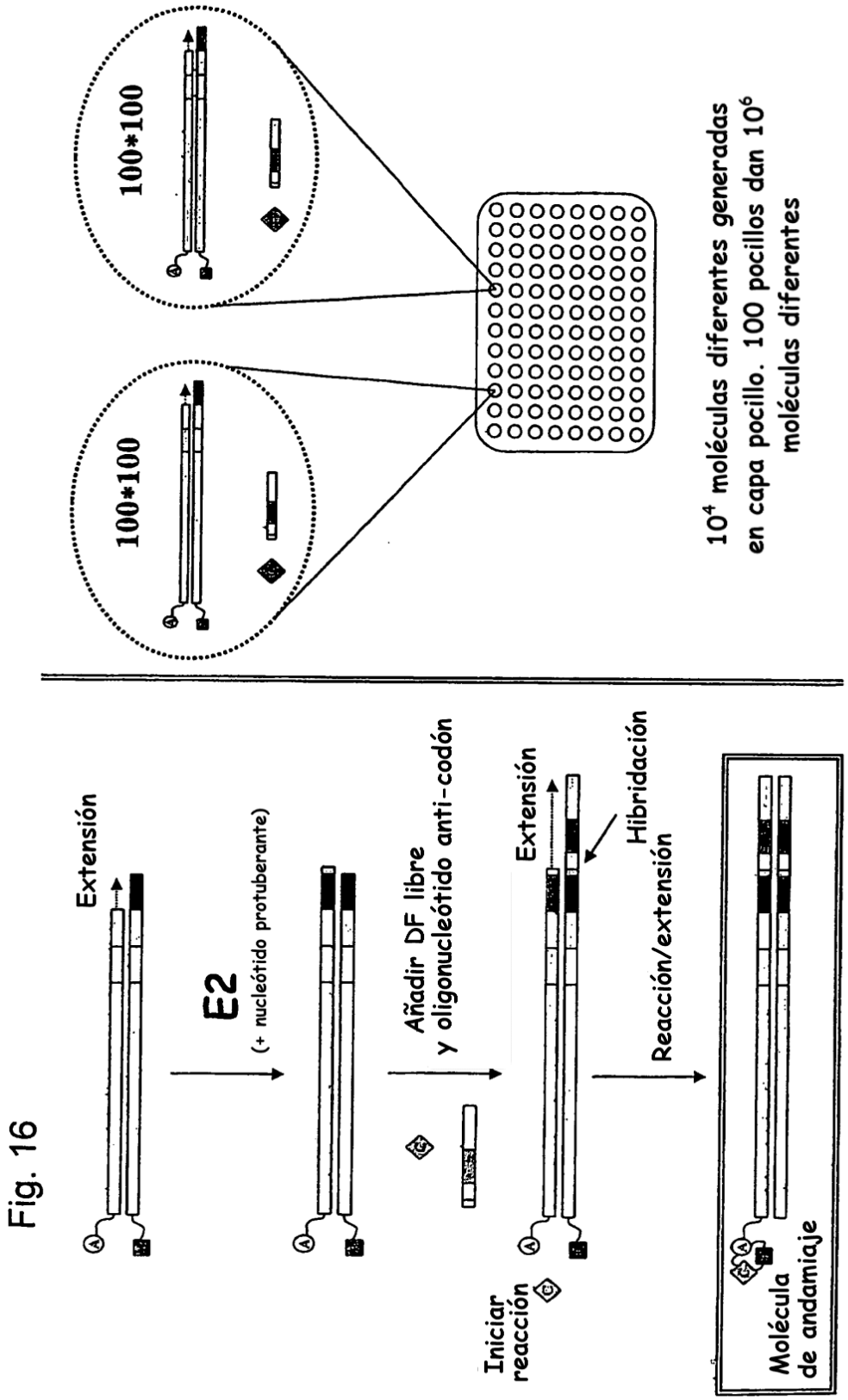
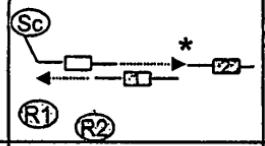
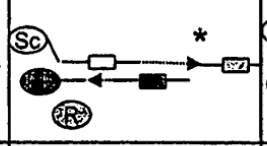
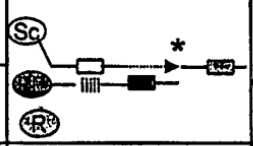
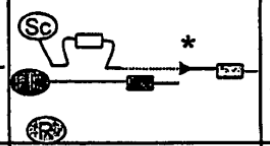
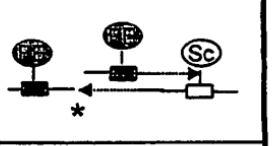
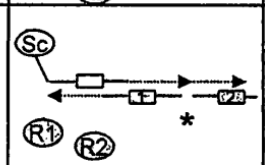
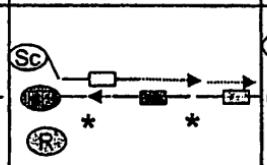
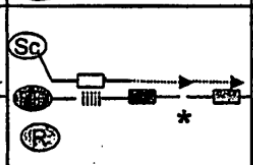
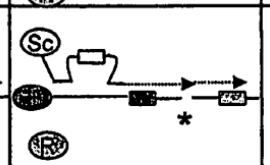
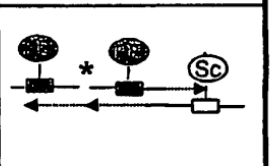
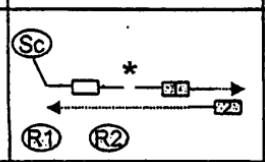
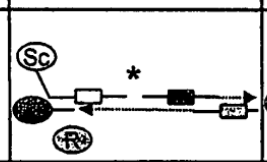
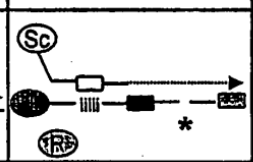
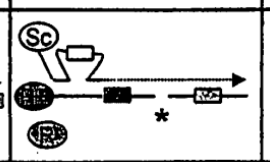
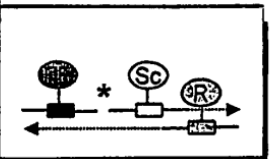
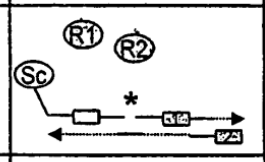
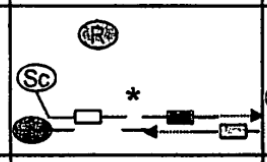
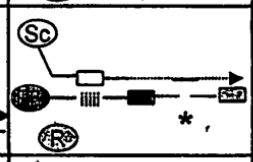
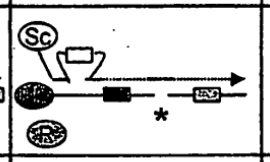
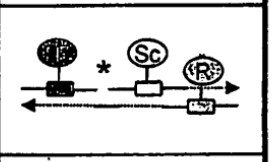
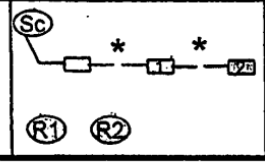
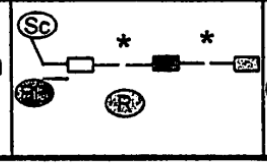
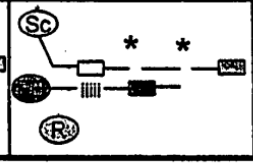
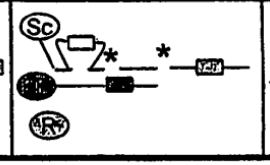
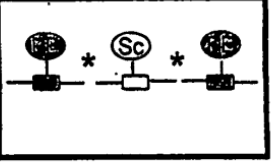

100*100
100*100
10^4 moléculas diferentes generadas en capa pocillo. 100 pocillos dan 10^6 moléculas diferentes
Extensión
E2
(+ nucleótido protuberante)
Añadir DF libre y oligonucleótido anti-codón
Extensión
Hibridación
Reacción/extensión
Iniciar reacción
Molécula de andamiaje

Fig. 17 **Codificación doble**

Reactivo / Procedimiento codificante	Reactivo libre	Bloque constructivo de cremallera	Bloque constructivo E2	Bloque constructivo de bucle	Bloque constructivo N
Extensión por polimerasa, luego ligación monocatenaria[1]					
Extensión por polimerasa, luego ligación bicatenaria[1]					
Ligación monocatenaria[1], luego extensión por polimerasa					
Ligación bicatenaria[1], luego extensión por polimerasa					
Ligación, luego ligación[2]					

[1]Ligación enzimática o química [2]Ligación enzimática o química mono o bicatenaria

Fig. 18

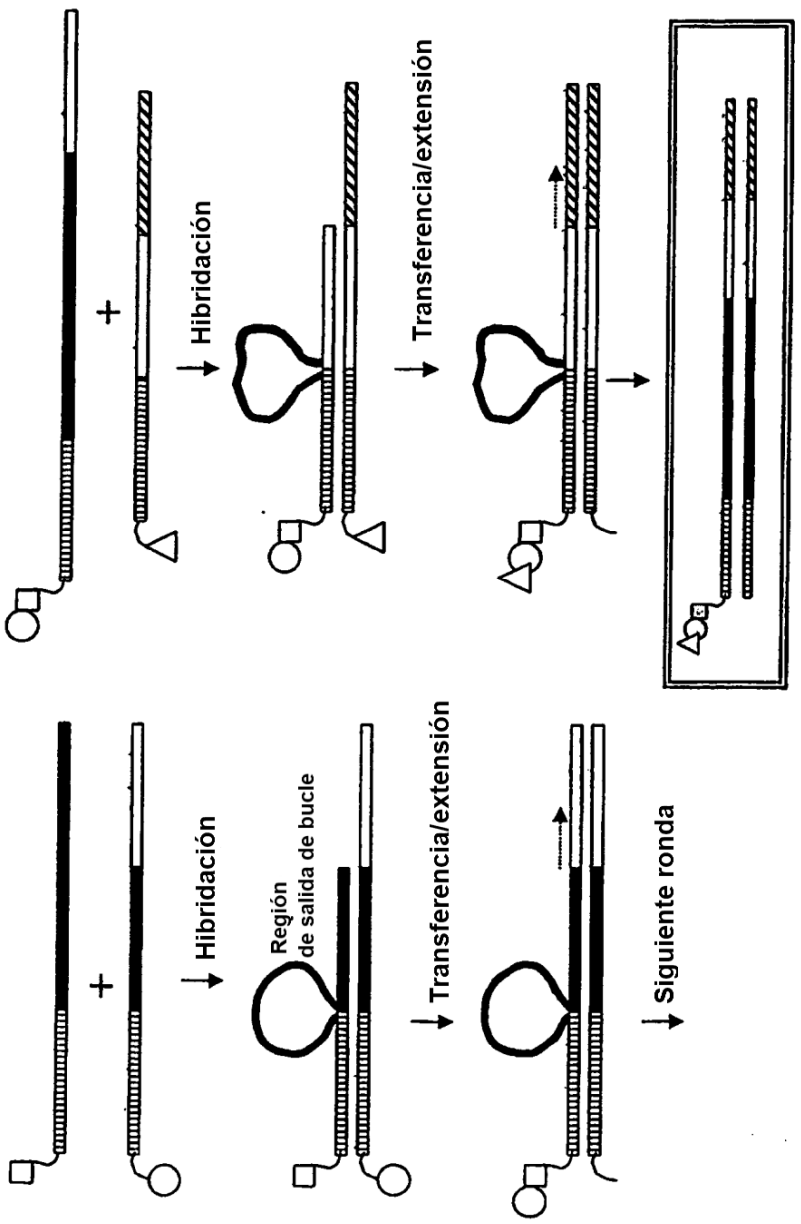

Hibridación
Transferencia/extensión
Hibridación
Región
de salida de bucle
Transferencia/extensión
Siguiente ronda

Fig. 19

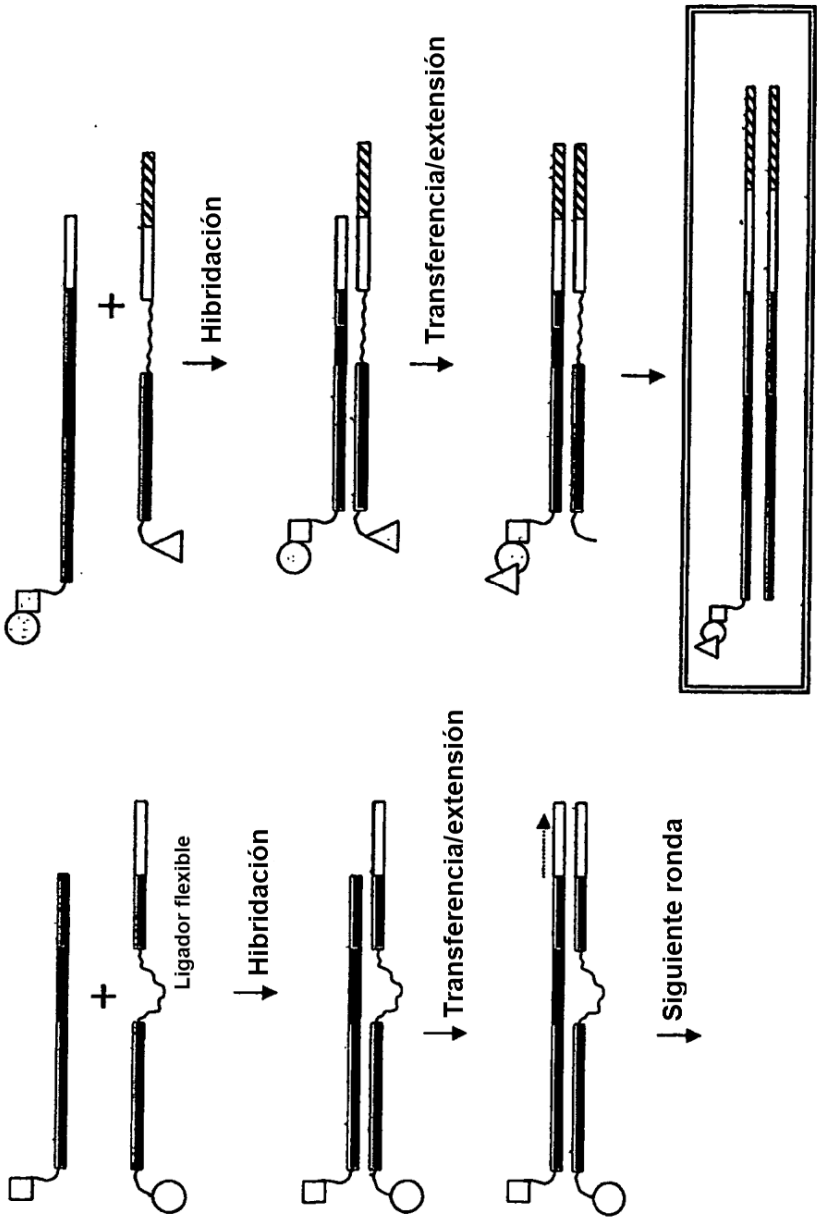

Ligador flexible
Hibridación
Transferencia/extensión
Siguiente ronda
Hibridación
Transferencia/extensión

Fig. 20

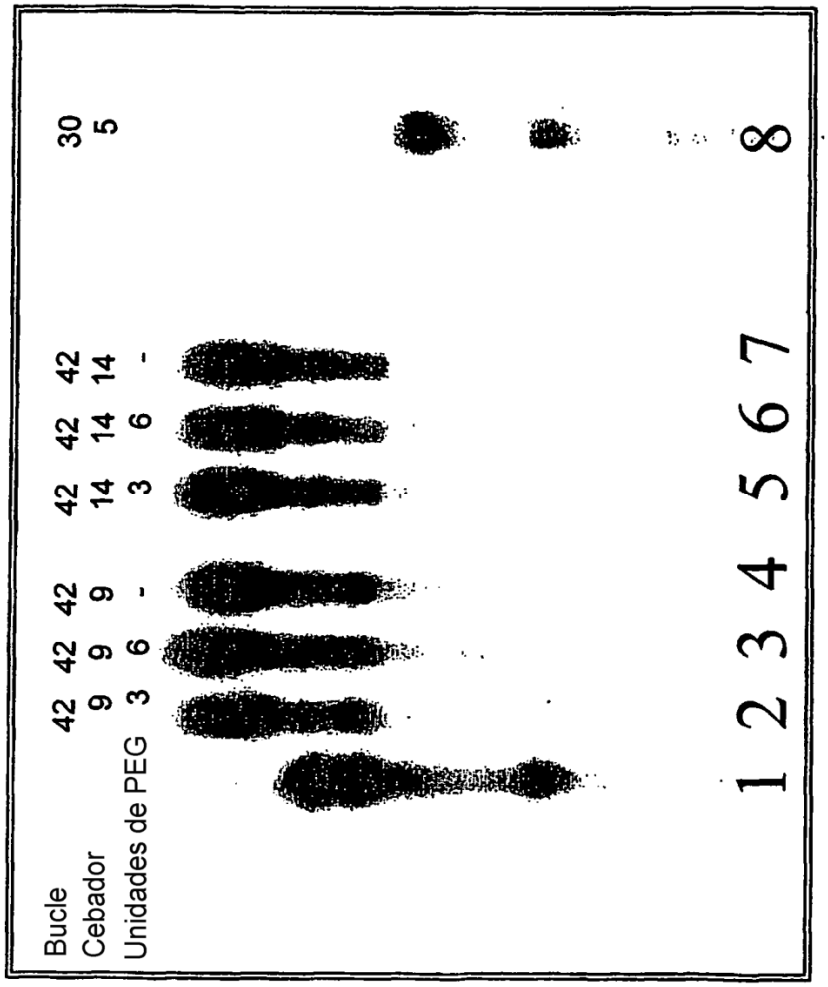

Bucle
Cebador
Unidades de PEG
42 42 42 42 42 42 42 30
9 9 9 14 14 14 5
3 6 - 3 6 - 8
1 2 3 4 5 6 7

Fig. 21

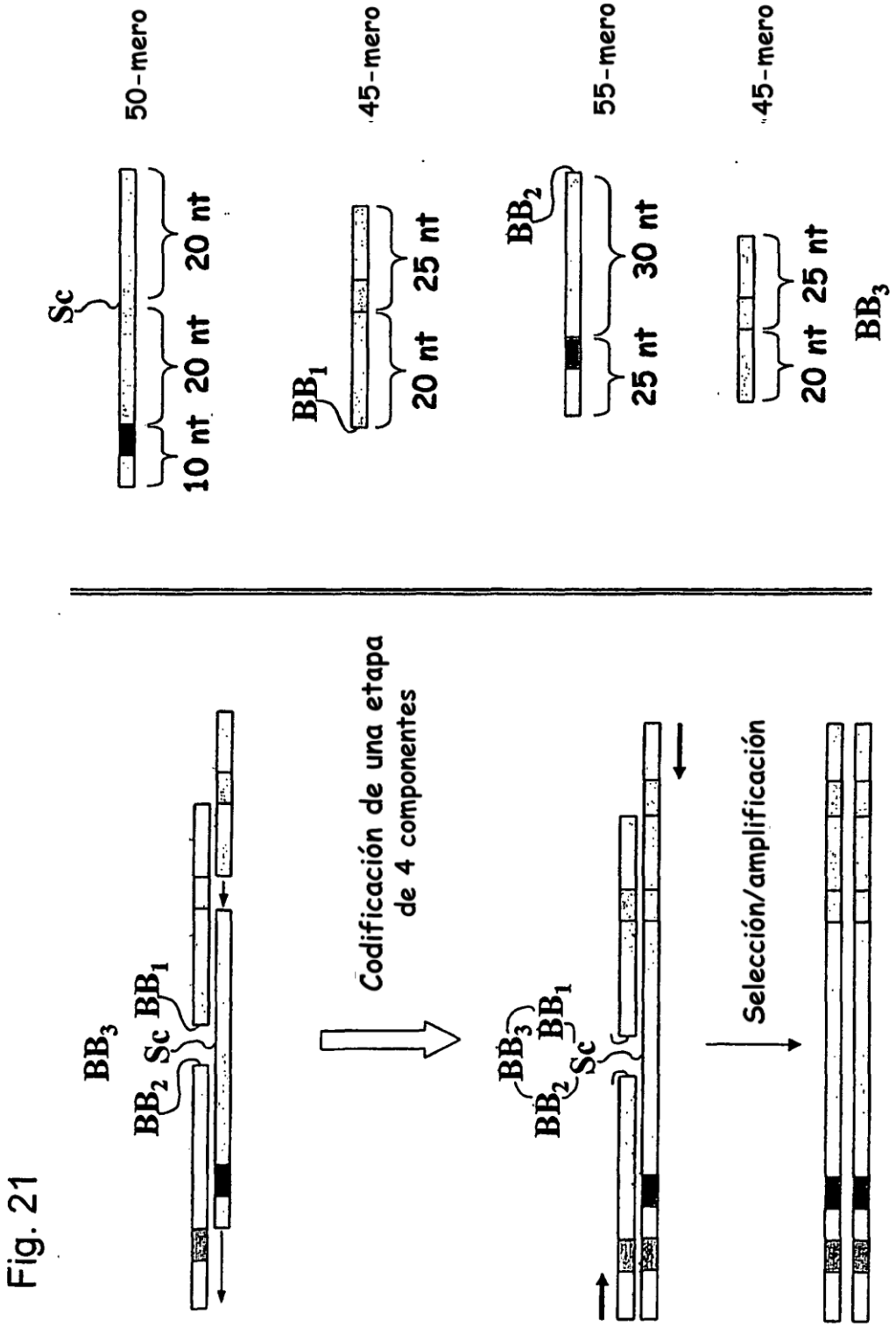

Sc
50-mero
10 nt 20 nt 20 nt
BB1
45-mero
20 nt 25 nt
BB2
55-mero
25 nt 30 nt
45-mero
20 nt 25 nt
BB3
BB3
BB2 Sc BB1
Codificación de una etapa
de 4 componentes
BB3
BB2 Sc BB1
Selección/amplificación

Fig. 22

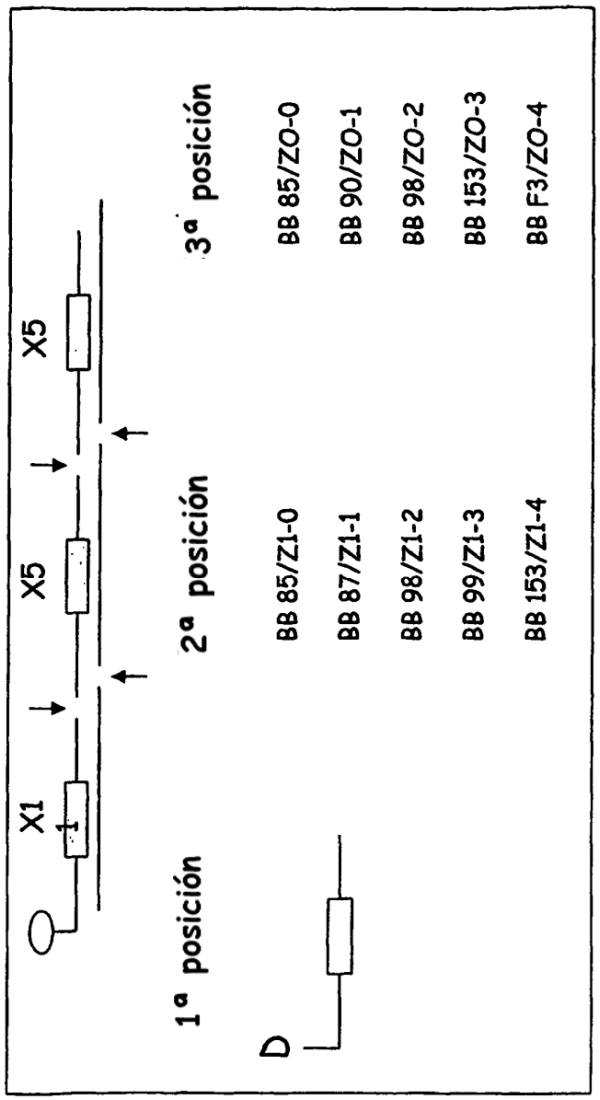

X1
X5
X5
1ª posición
2ª posición
3ª posición
D
BB 85/Z1-0
BB 87/Z1-1
BB 98/Z1-2
BB 99/Z1-3
BB 153/Z1-4
BB 85/ZO-0
BB 90/ZO-1
BB 98/ZO-2
BB 153/ZO-3
BB F3/ZO-4
BB85
BB87
BB90
BB98
BB99
BB153
BB-F3

Fig. 23

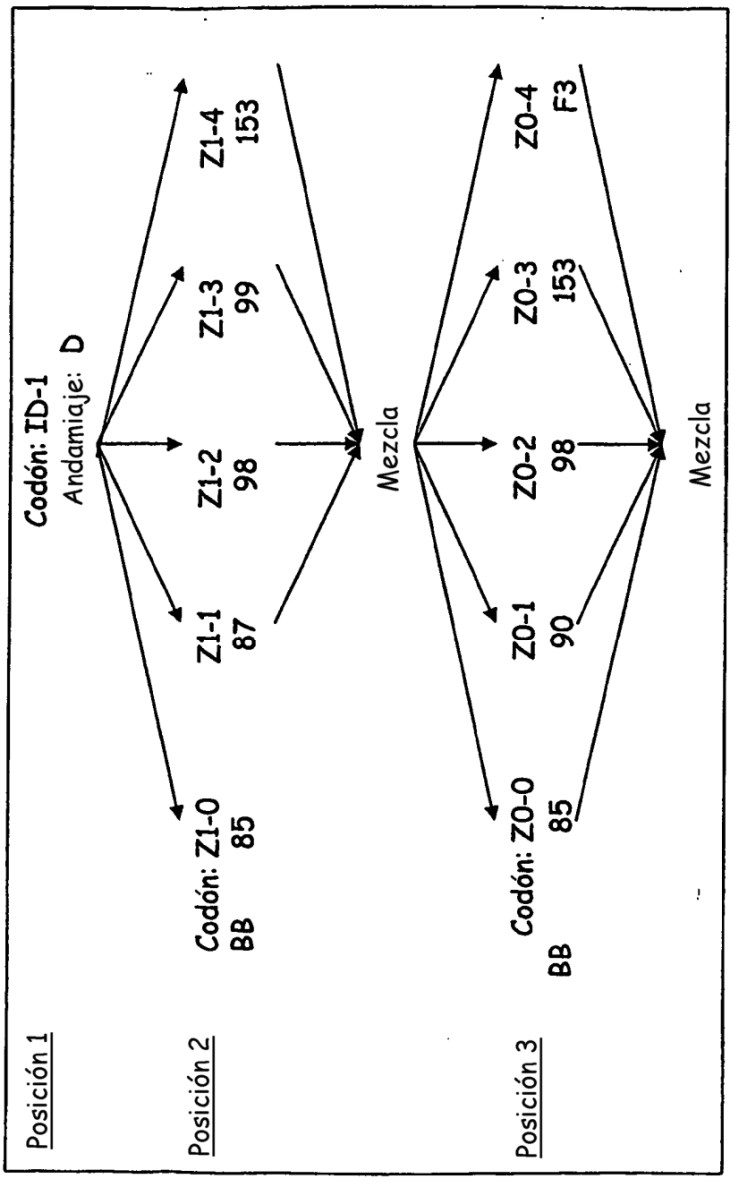

Posición 1
Codón: ID-1
Andamiaje: D
Posición 2
Codón: Z1-0
BB
85
Z1-1
87
Z1-2
98
Z1-3
99
Z1-4
153
Mezcla
Posición 3
Codón: Z0-0
BB
85
Z0-1
90
Z0-2
98
Z0-3
153
Z0-4
F3
Mezcla

Fig. 24

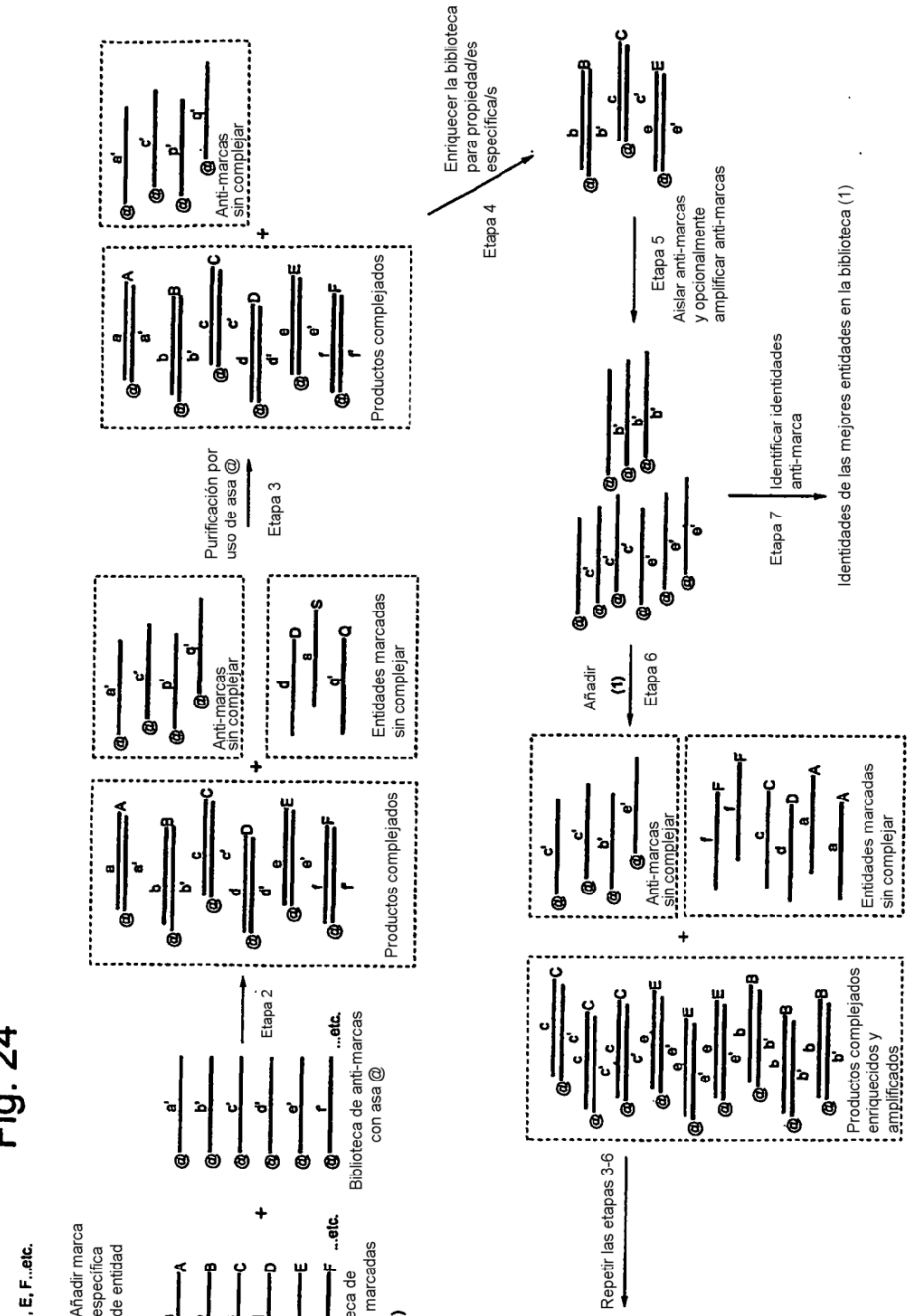

A, B, C, D, E, F...etc.
Etapa 1
Añadir marca específica de entidad
Biblioteca de entidades marcadas (1)
Etapa 2
Biblioteca de anti-marcas con asa @
Productos complejados
Anti-marcas sin complejar
Entidades marcadas sin complejar
Purificación por uso de asa @
Etapa 3
Productos complejados
Anti-marcas sin complejar
Enriquecer la biblioteca para propiedad/es específica/s
Etapa 4
Etapa 5
Aislar anti-marcas y opcionalmente amplificar anti-marcas
Añadir (1)
Etapa 6
Etapa 7
Identificar identidades anti-marca
Identidades de las mejores entidades en la biblioteca (1)
Repetir las etapas 3-6
Productos complejados enriquecidos y amplificados
Anti-marcas sin complejar
Entidades marcadas sin complejar

Fig. 25

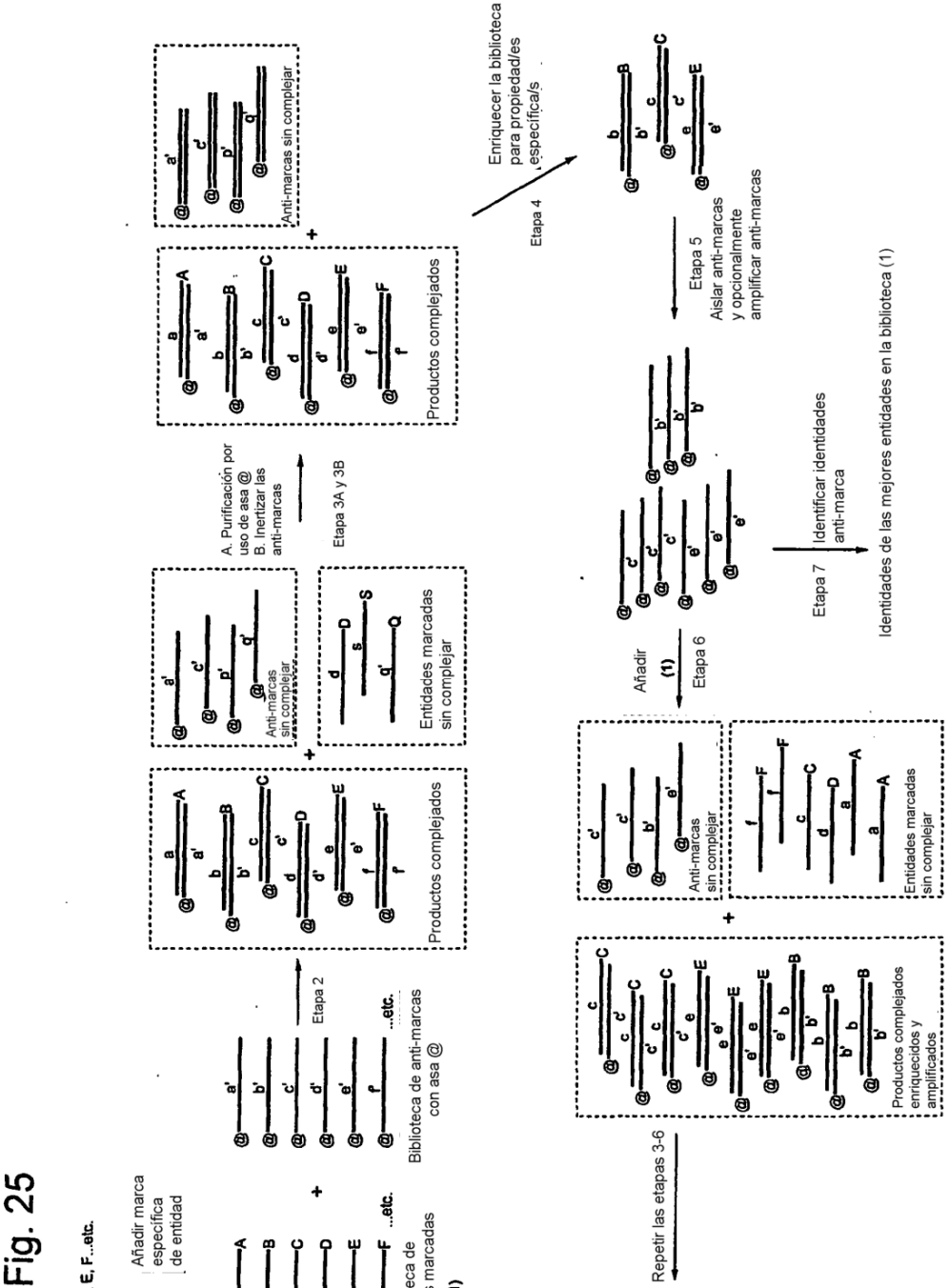

A, B, C, D, E, F...etc.
Etapa 1
Añadir marca específica de entidad
Biblioteca de entidades marcadas (1)
Biblioteca de anti-marcas con asa @
Etapa 2
Productos complejados
Anti-marcas sin complejar
Entidades marcadas sin complejar
A. Purificación por uso de asa @
B. Inertizar las anti-marcas
Etapa 3A y 3B
Productos complejados
Anti-marcas sin complejar
Enriquecer la biblioteca para propiedad/es específica/s
Etapa 4
Etapa 5
Aislar anti-marcas y opcionalmente amplificar anti-marcas
Añadir (1)
Etapa 6
Anti-marcas sin complejar
Entidades marcadas sin complejar
Etapa 7
Identificar identidades anti-marca
Identidades de las mejores entidades en la biblioteca (1)
Productos complejados enriquecidos y amplificados
Repetir las etapas 3-6

Fig. 26

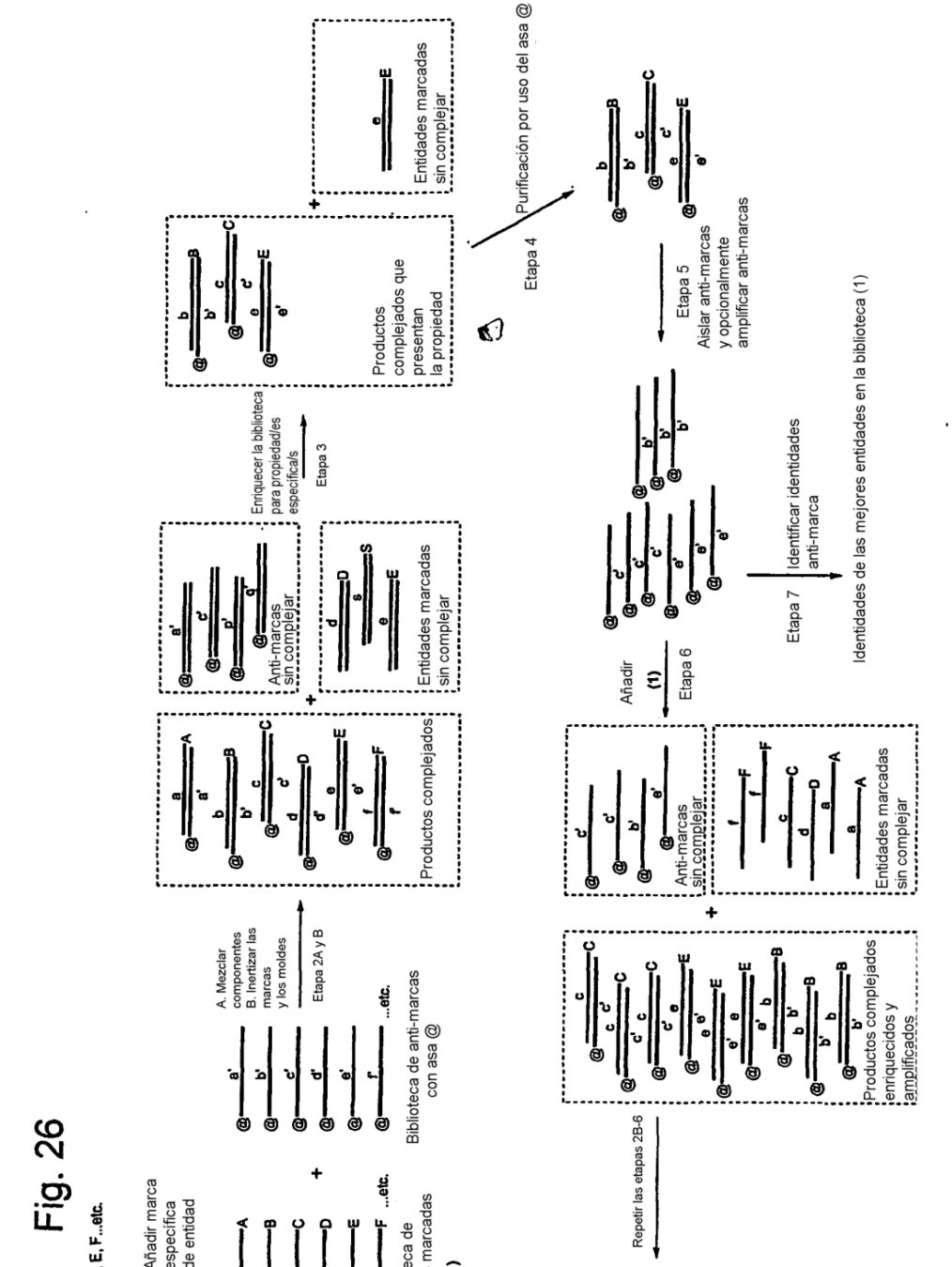

A, B, C, D, E, F...etc.
Etapa 1
Añadir marca específica de entidad
Biblioteca de entidades marcadas (1)
A. Mezclar componentes
B. Inertizar las marcas y los moldes
Etapa 2A y B
Biblioteca de anti-marcas con asa @
Productos complejados
Anti-marcas sin complejar
Entidades marcadas sin complejar
Enriquecer la biblioteca para propiedad/es específica/s
Etapa 3
Productos complejados que presentan la propiedad
Entidades marcadas sin complejar
Purificación por uso del asa @
Etapa 4
Etapa 5
Aislar anti-marcas y opcionalmente amplificar anti-marcas
Añadir (1)
Etapa 6
Etapa 7
Identificar identidades anti-marca
Identidades de las mejores entidades en la biblioteca (1)
Anti-marcas sin complejar
Entidades marcadas sin complejar
Productos complejados enriquecidos y amplificados
Repetir las etapas 2B-6

Fig. 27

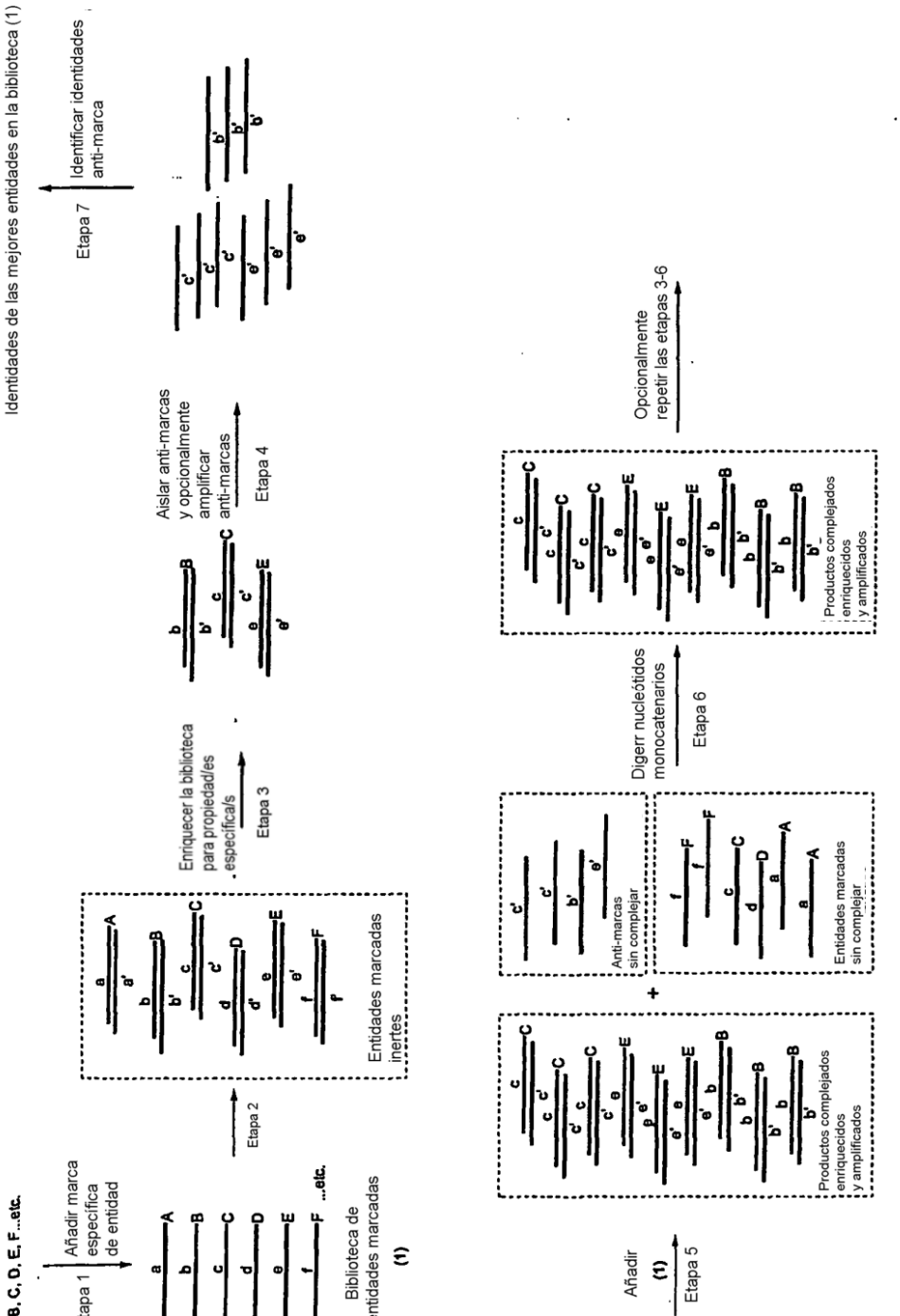

A, B, C, D, E, F...etc.
Etapa 1
Añadir marca específica de entidad
Biblioteca de entidades marcadas (1)
Etapa 2
Entidades marcadas inertes
Enriquecer la biblioteca para propiedad/es específica/s
Etapa 3
Aislar anti-marcas y opcionalmente amplificar anti-marcas
Etapa 4
Identidades de las mejores entidades en la biblioteca (1)
Etapa 7
Identificar identidades anti-marca
Opcionalmente repetir las etapas 3-6
Productos complejados enriquecidos y amplificados
Digerr nucleótidos monocatenarios
Etapa 6
Anti-marcas sin complejar
Entidades marcadas sin complejar
Añadir (1)
Etapa 5

Fig. 28

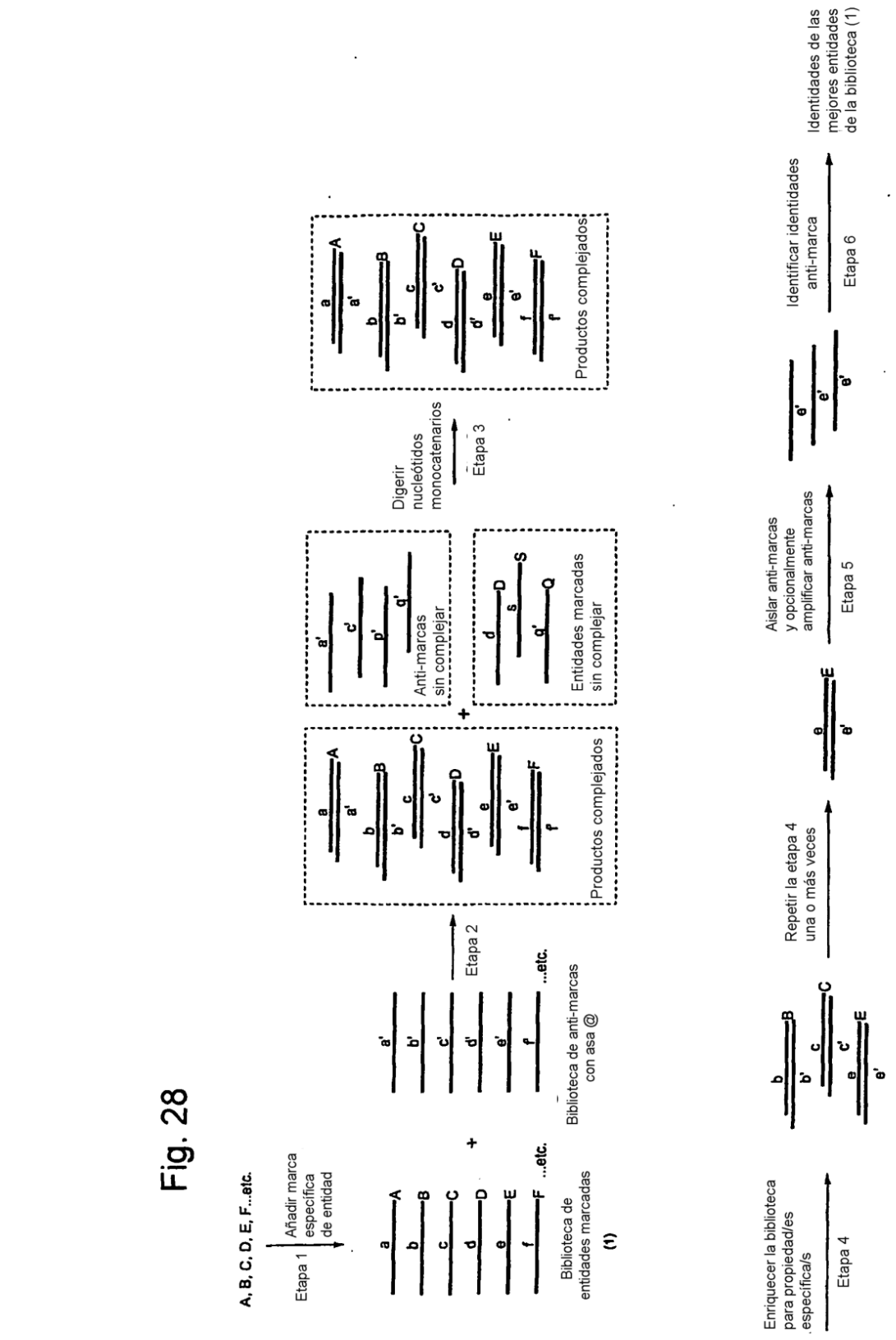

A, B, C, D, E, F...etc.
Etapa 1
Añadir marca específica de entidad
Biblioteca de entidades marcadas (1)
Biblioteca de anti-marcas con asa @
Etapa 2
Productos complejados
Anti-marcas sin complejar
Entidades marcadas sin complejar
Digerir nucleótidos monocatenarios
Etapa 3
Productos complejados
Aislar anti-marcas y opcionalmente amplificar anti-marcas
Etapa 5
Identificar identidades anti-marca
Etapa 6
Identidades de las mejores entidades de la biblioteca (1)
Repetir la etapa 4 una o más veces
Enriquecer la biblioteca para propiedad/es específica/s
Etapa 4

Fig. 29

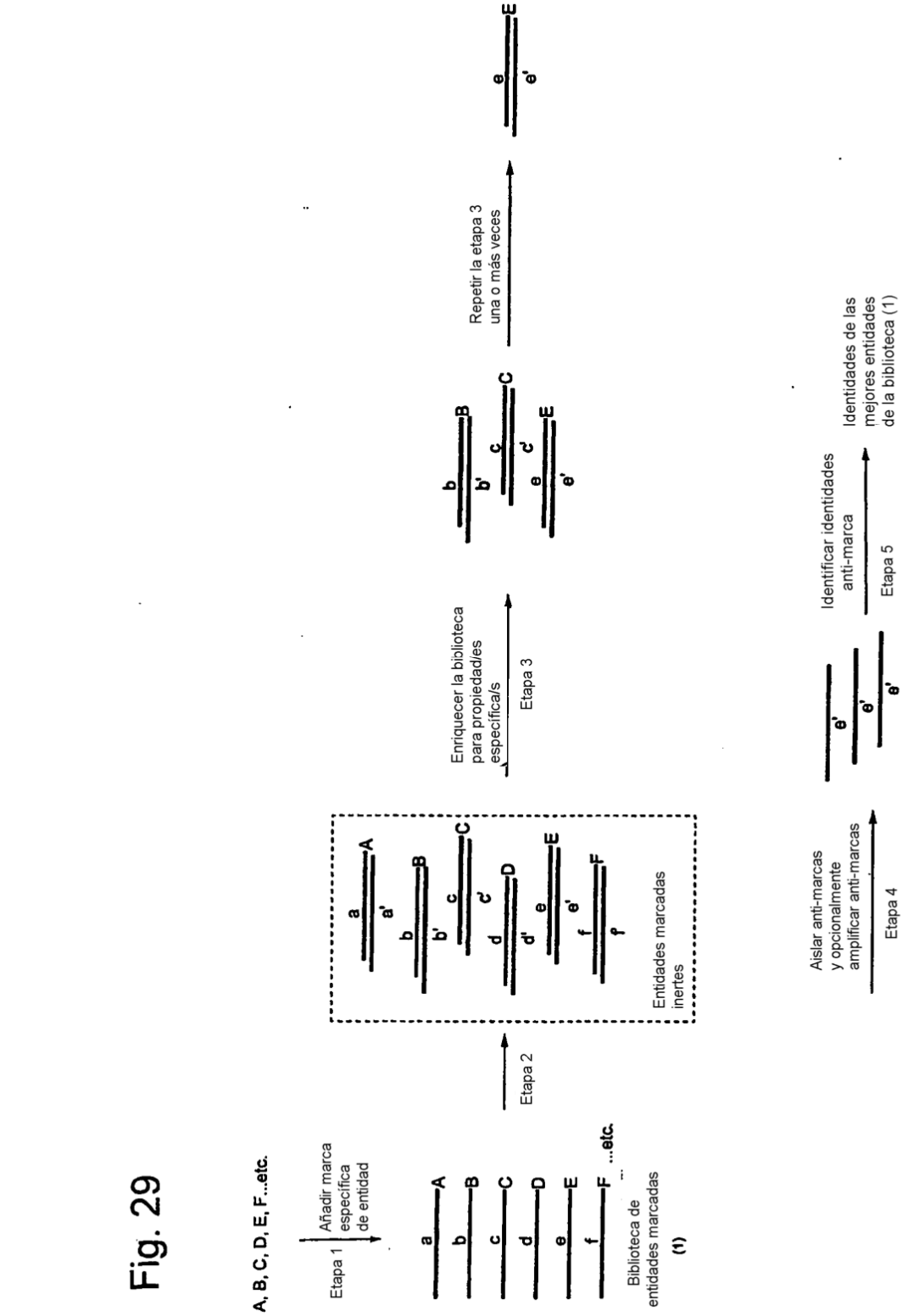

A, B, C, D, E, F...etc.
Etapa 1
Añadir marca específica de entidad
Biblioteca de entidades marcadas (1)
Etapa 2
Entidades marcadas inertes
Enriquecer la biblioteca para propiedad/es específica/s
Etapa 3
Repetir la etapa 3 una o más veces
Aislar anti-marcas y opcionalmente amplificar anti-marcas
Etapa 4
Identificar identidades anti-marca
Etapa 5
Identidades de las mejores entidades de la biblioteca (1)

Fig. 30

A, B, C, D, E, F...etc.
Etapa 1
Añadir marca específica de entidad
a A
b B
c C
d D
e E
f F
...etc.
Biblioteca de entidades marcadas (1)
Enriquecer la biblioteca para propiedad/es específica/s
Etapa 2
b B
c C
e E
Opcionalmente repetir la etapa 2
e E
Generar anti-marcas
e E
e'
Aislar anti-marcas y opcionalmente amplificar anti-marcas
Etapa 4
e'
e'
e'
Identificar identidades anti-marca
Etapa 5
Identidades de las mejores entidades en la biblioteca (1)

Fig. 31

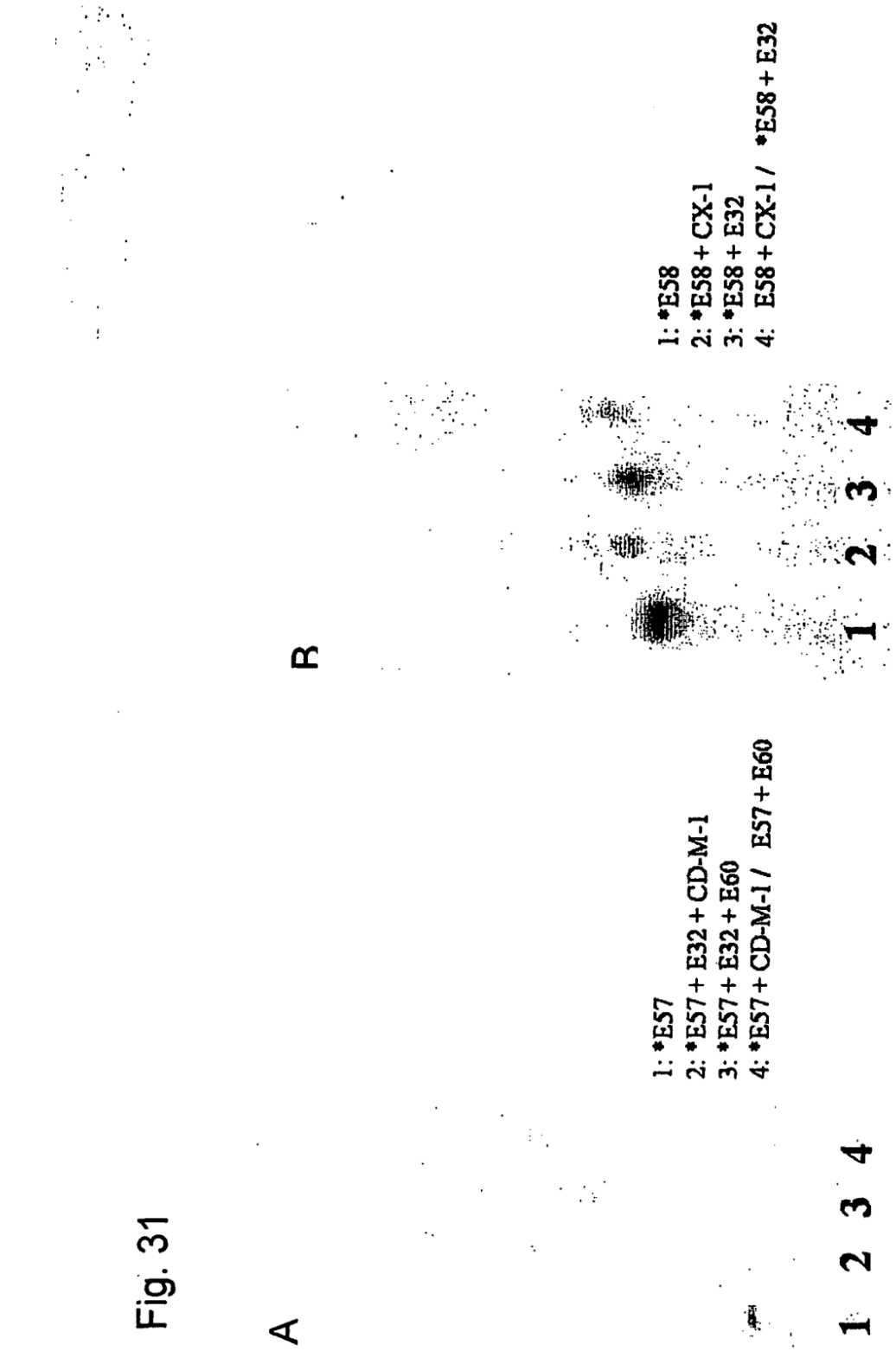

A
1: *E57
2: *E57 + E32 + CD-M-1
3: *E57 + E32 + E60
4: *E57 + CD-M-1 / E57 + E60
1 2 3 4
R
1: *E58
2: *E58 + CX-1
3: *E58 + E32
4: E58 + CX-1 / *E58 + E32
1 2 3 4

Fig. 32

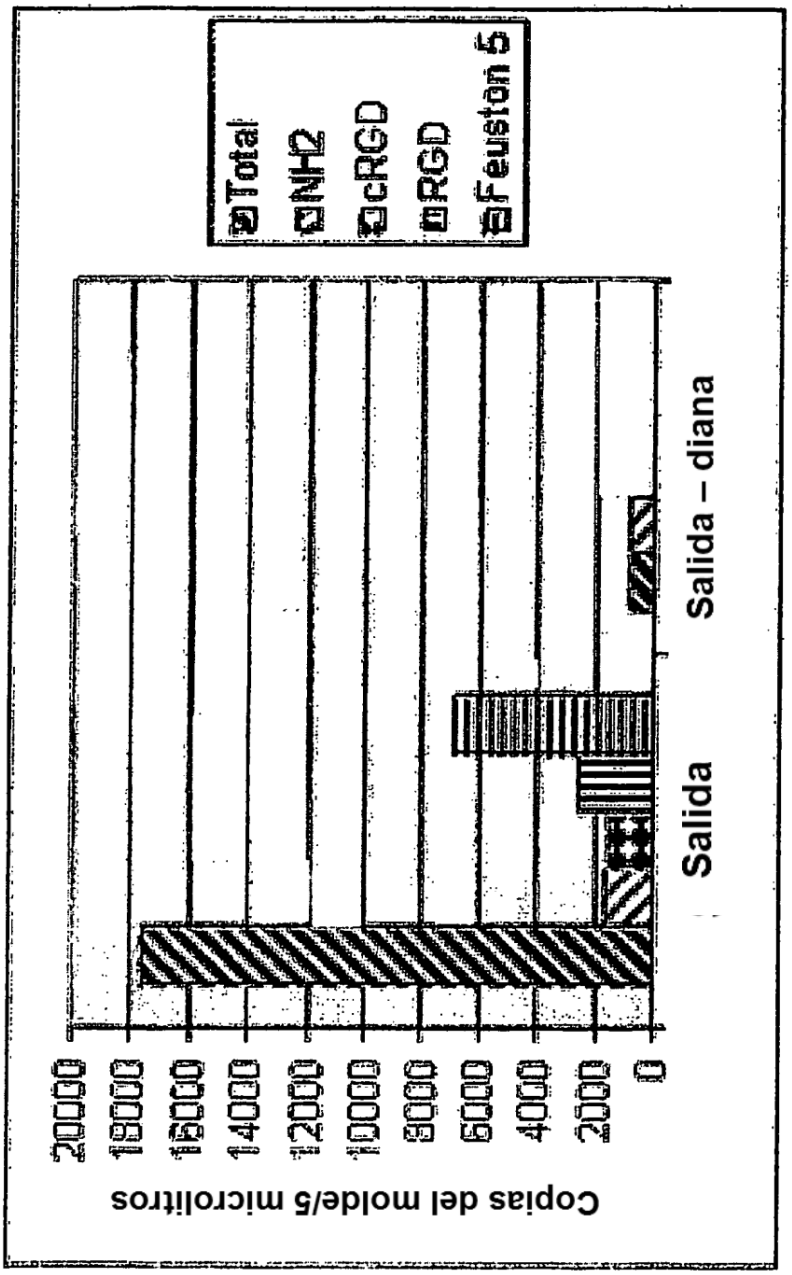
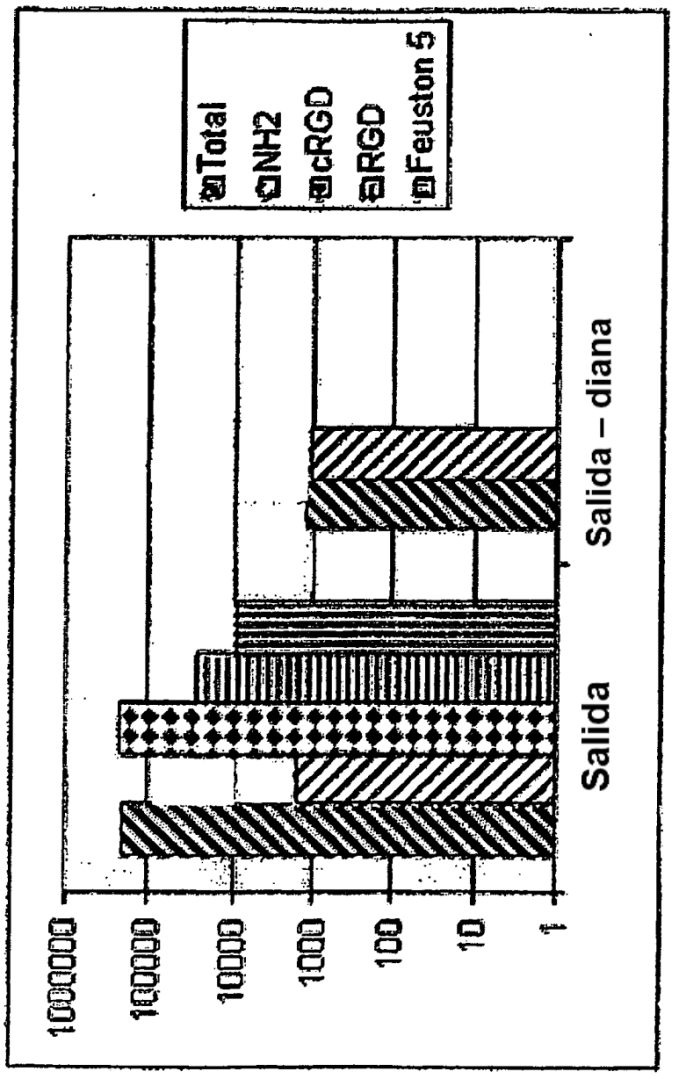

Copias del molde/5 microlitros
20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Salida
Salida – diana
Total
NH2
cRGD
RGD
Feuston 5

Fig. 33


Total
NH2
cRGD
RGD
Feuston 5
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
Salida
Salida – diana