

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 899**

51 Int. Cl.:

**C40B 30/04** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**B01L 7/00** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

**C12Q 1/6811** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2015 PCT/EP2015/065874**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2016 WO16008822**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2015 E 15744501 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 3169832**

54 Título: **Procedimiento para la identificación de complejos altamente afines a base de dos ligandos y un receptor**

30 Prioridad:

**16.07.2014 DE 102014213783**

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

**16.05.2019**

73 Titular/es:

**DYNABIND GMBH (100.0%)  
Tatzberg 47  
01307 Dresden, DE**

72 Inventor/es:

**REDDAVIDE, FRANCESCO;  
DE ANDRADE, HELENA;  
LIN, WEILIN;  
ZHANG, YIXIN y  
MELE, ELISA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 712 899 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la identificación de complejos altamente afines a base de dos ligandos y un receptor

Se propone un procedimiento para la identificación de complejos altamente afines a base de dos ligandos y un receptor. En el procedimiento se utilizan ligandos de una ligandoteca que en cada caso presentan un ADN o ARN de cadena sencilla. Dado que el ADN o ARN de una parte de los ligandos es complementario al ADN o ARN de otra parte de los ligandos, ambas partes de los ligandos pueden formar entre sí complejos binarios. La longitud de ADN o ARN puede ascender, en una forma de realización, a 3 a 10 bases o, en la forma de realización de acuerdo con la invención, a más de 10 bases. De acuerdo con la invención, están previstas una hibridación y disociación de los ADNs o ARNs de cadena sencilla de un modo dinámico, las cuales se alcanzan ya para la primera forma de realización a la temperatura ambiente y para la forma de realización de acuerdo con la invención requiere un circuito a base de calentamiento y enfriamiento. Además de ello, se propone un dispositivo microfluidoico para la llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención y una quimioteca dinámica, autoensamblante, que contiene complejos binarios de los ligandos respectivos.

Un reto esencial en el caso del uso de quimiotecas codificadas por ADN y quimiotecas de aptámeros de ADN/ARN para la detección de aglutinantes e inhibidores eficaces frente a diferentes proteínas diana de interés biomédico, es la mejora de la relación señal-perturbación en experimentos de selección con el fin de examinar moléculas con una elevada afinidad de unión de compuestos débiles o no ligantes.

Hasta ahora, en el estado de la técnica se realizaron la mayoría de las veces experimentos de selección paralelos con una rigurosidad de selección diferente, con el fin de optimizar las condiciones de selección frente a una proteína diana conocida. Así, por ejemplo, materiales de soporte sólidos se cargaron con diferentes cantidades de la proteína diana. Además de ello, se establecieron diferentes procedimientos de lavado, en los que se utilizaron tampones con diferentes fuerzas iónicas y detergentes.

Con el fin de llevar a cabo experimentos de selección paralelos, se han de llevar a cabo muchos experimentos adicionales para una proteína diana. Esto requiere mucho tiempo y es también costoso. Además, es muy difícil diseñar experimentos de selección paralelos con diferente rigurosidad en la selección, cuando las distribuciones de las afinidades de unión de toda la quimioteca son desconocidas para la proteína diana. Con el fin de seleccionar aglutinantes con una elevada afinidad, se han de aplicar condiciones de selección especiales. Según ello, es desventajoso el que se pueda concebir un experimento de selección riguroso y paralelo, una vez que se conoce que en la quimioteca se encuentran moléculas de unión altamente afines.

Por otra parte, también la caracterización de componentes de un experimento de selección realizado por vez primera (experimento de selección *de-novo*) requiere mucho tiempo y es costoso. Además, es difícil concebir un experimento de selección paralelo sin el conocimiento y las informaciones que resultan de una selección primaria previa.

La misión de la presente invención es, por consiguiente, la provisión de un procedimiento con el que sea posible de una manera sencilla, económica y altamente sensible una identificación de complejos ternarios altamente afines a base de dos ligandos y un receptor. Además, debería proporcionarse un dispositivo para llevar a cabo el procedimiento y una quimioteca autoensamblante para uso en el procedimiento.

El problema se resuelve mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1.

De acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento para la identificación sensible de complejos altamente afines a base de dos ligandos y un receptor, que comprende las siguientes etapas:

- a) interacción de una pluralidad de diferentes complejos a base de ligandos de una quimioteca con al menos un receptor en una solución, presentando los ligandos de la quimioteca un ADN o ARN de cadena sencilla con una longitud de bases mayor que 10 bases, que está unido de manera químicamente covalente a los ligandos, y en donde más de 10 bases del ADN o ARN de cadena sencilla de una primera parte de los ligandos son complementarias a bases del ADN o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos, y en donde los ligandos están complejados a través de hibridación del ADN o ARN para formar complejos de ligandos;
- b) incubación de la solución durante un determinado espacio de tiempo, formándose complejos a base de complejos de ligandos y el receptor;
- c) disociación de los complejos de ligandos para formar ligandos libres;
- d) re-hibridación de los ligandos libres para formar complejos de ligandos adicionales;
- e) incubación de la solución durante un espacio de tiempo determinado, formándose complejos adicionales a partir de los complejos de ligandos adicionales y el receptor;
- f) identificación de los complejos resultantes a base de complejos de ligandos y el receptor.

El procedimiento se caracteriza porque la incubación se realiza a una temperatura (etapa b), etapa d) y /o etapa e)) a la que la primera parte de los ligandos y la segunda parte de los ligandos están hibridadas en la solución para formar complejos de ligandos.

5 En presencia de un receptor, que en una combinación determinada a base de dos ligandos (complejo de ligandos binarios determinados a base de ligando 1 y ligando 2 a través de ADNdc o ARNdc) presenta una elevada afinidad, se forma un complejo de ligandos-receptor ternario altamente afín a partir de los dos ligandos y el receptor. Pares de ligandos altamente afines se agotan, por consiguiente, de la agrupación en pares de ligandos binarios y se enriquecen en forma de un complejo de pares de ligandos-receptor.

10 El inconveniente de procedimientos del estado de la técnica es que un determinado porcentaje de ligandos altamente afines se hibrida con ligandos poco a nada afines y, por consiguiente, está "capturado" en complejos de ligando poco afines. Este problema se resuelve mediante el procedimiento de acuerdo con la invención. Mediante una etapa del procedimiento en la que pares de ligandos se disocian de forma preestablecida, los ligandos altamente afines previamente "capturados" en el complejo de ligandos quedan "libres" de nuevo, con el fin de hibridarse en una etapa de hibridación adicional del procedimiento con otros ligandos altamente afines libres para formar nuevos complejos de ligandos. Los nuevos complejos de ligandos formados se encuentran de nuevo a disposición para la formación de complejos de ligandos-receptor. Como resultado de ello, por consiguiente, los ligandos altamente afines pueden transformarse de manera preestablecida - en el caso ideal de forma cuantitativa - en complejos de ligandos-receptor, lo cual determina una mayor cantidad de complejos de ligandos-receptor y, por consiguiente, aumenta la sensibilidad del procedimiento frente a procedimientos del estado de la técnica (relación señal-perturbación mejorada). De hecho, la frecuencia de la formación del par de ligandos altamente afín en el caso de un número de N pares de ligandos altamente afines teóricamente posibles en una ligandoteca puede aumentarse de manera ideal hasta un factor N (formación cuantitativa de complejos altamente afines, ningún ligando altamente afín unido a ligandos poco afines y, con ello, "capturado").

25 Los complejos de ligandos pueden disociarse, por ejemplo, mediante el aumento de la temperatura de la solución, en particular hasta una temperatura de 35 °C a 95 °C, preferiblemente de 50 °C a 95 °C, de manera particularmente preferida de 70 °C a 95 °C, en particular de 80 °C a 95 °C.

30 La disociación de los complejos de ligandos se lleva a cabo preferiblemente en una parte de la solución que está distanciada en el espacio del receptor, preferiblemente de modo que el receptor no se ve funcionalmente perjudicado por las condiciones que conducen a la disociación. La ventaja de esta forma de realización es que el efecto de la disociación no repercute negativamente sobre la función (biológica) del receptor. En particular, con ello, se protegen receptores frente a una desnaturalización térmica y/o inducida por el pH (p. ej., receptores que contienen proteínas o que se componen de las mismas).

35 Los ligandos libres pueden hibridarse (de nuevo) mediante reducción de la temperatura de la solución, en particular mediante reducción a una temperatura de 1 °C a 30 °C, preferiblemente de 5 °C a 28 °C, de manera particularmente preferida de 10 °C a 25 °C, en particular de 15 a 20 °C.

Las etapas c) a e) del procedimiento pueden repetirse al menos una vez o dos veces, preferiblemente al menos 3 o 4 veces, de manera particularmente preferida al menos 5 o 6 veces, en particular al menos 7 u 8 veces. Cuanto más frecuentemente se repitan las etapas, tanto más complejos de ligandos altamente afines son transferidos escalonadamente al complejo de ligandos-receptor (aumento de la sensibilidad).

40 En una forma de realización preferida, al menos 20 bases, preferiblemente al menos 40 bases, de manera particularmente preferida al menos 100 bases, en especial al menos 200 bases del ADN o ARN de cadena sencilla de una primera parte de los ligandos son complementarias al ADN o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos.

45 Se proporciona, además, una solución alternativa al problema de acuerdo con la invención, que se contenta sin etapas de calentamiento y enfriamiento.

A este respecto, se proporciona un procedimiento para la identificación sensible de complejos altamente afines a base de dos ligandos y un receptor, que comprende las siguientes etapas:

50 i) interacción de una pluralidad de diferentes complejos a base de ligandos de una quimioteca con al menos un receptor en una solución, en donde los ligandos de la quimioteca presentan un ADN o ARN de cadena sencilla, con una longitud de bases de más de 2 bases, que está unida de forma químicamente covalente a los ligandos, y en donde solo 2 a 10 bases del ARN o ARN de cadena sencilla de una primera parte de los ligandos son complementarias a bases del ADN o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos, y en donde los ligandos están complejados a través de hibridación del ADN o ARN para formar complejos de ligandos;

55 ii) incubación de la solución durante un espacio de tiempo determinado, formándose complejos a base de complejos de ligandos y el receptor; y

iii) identificación de los complejos resultantes a base de complejos de ligandos y el receptor.

El procedimiento se caracteriza porque la solución se incuba a una temperatura a la que entre la primera parte de los ligandos y la segunda parte de los ligandos se ajusta un equilibrio a base de hibridación a complejos de ligandos y disociación a ligandos libres (p. ej., temperatura ambiente, es decir, 15 °C a 30 °C). Con ello, se obtiene una hibridación y disociación dinámicas.

- 5 La diferencia con el procedimiento de acuerdo con la invención es que debido al número menor de bases complementarias entre las dos partes de los ligandos tiene lugar una asociación (a través de hibridación) y disociación de los ligandos ya a la temperatura ambiente (equilibrio dinámico). Mediante la presencia de un receptor se “extraen” pares de ligandos altamente afines del equilibrio dinámico y se transfieren al complejo de ligandos-receptor. Pares de ligandos altamente afines se agotan por lo tanto de la agrupación general de ligandos de la quimioteca y se enriquece el complejo de ligandos-receptor ternario, altamente afín. Mediante el equilibrio dinámico, pueden transformarse, por lo tanto, también sin calentamiento y enfriamiento, todos los pares de ligandos altamente afines (en el caso ideal de forma cuantitativa) en el complejo de receptor, lo cual aumenta la concentración de complejos de ligandos-receptor y, por consiguiente, se mejora la sensibilidad del método de detección. El inconveniente es, sin embargo, una afinidad en conjunto algo menor de los pares de ligandos al receptor en comparación con los pares de ligandos del procedimiento mencionado en primer lugar, dado que la estabilidad de los pares de ligandos mediante el menor número de bases complementarias es algo menor y, por consiguiente, en equilibrio, también el complejo ternario de ligandos-receptor está menos intensamente poblado.

- 20 En esta variante, solamente 3 a 9 bases, preferiblemente solo 4 a 8 bases, de manera particularmente preferida solo 5 a 7 bases del ADN o ARN de cadena sencilla de una primera parte de los ligandos pueden ser complementarias al ADN o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos.

En ambos procedimientos, la longitud del ADN o ARN de la primera parte de los ligandos y/o de la segunda parte de los ligandos puede ascender al menos a 20 bases, preferiblemente al menos a 40 bases, de manera particularmente preferida al menos a 100 bases, en particular al menos a 200 bases.

- 25 La primera y/o segunda parte de los ligandos puede suponer más del 20%, preferiblemente más del 30%, de manera particularmente preferida más del 40%, en particular el 50% de la cantidad total de los ligandos. La primera parte de los ligandos presenta preferiblemente L ligandos diferentes y la segunda parte de los ligandos presenta preferiblemente M ligandos diferentes, de modo que se forman diferentes complejos de ligandos binarios L·M. Para una ligandoteca con L·M complejos de ligandos binarios, puede enriquecerse un determinado complejo de ligandos altamente afín con una eficiencia elevada de al menos 1,5 a N veces, preferiblemente de 2 a  $N^{(1/2)}$  veces, en particular de 3 a 10 veces.

En una forma de realización preferida, la solución en al menos una de las etapas b), e) y ii) se incuba a una temperatura de 1 °C a 50 °C, preferiblemente de 5 °C a 37 °C, de manera particularmente preferida de 10 °C a 25 °C, en particular de 15 a 20 °C. En el caso de estos intervalos de temperaturas es ventajoso que aquí sean estables muchos tipos de receptores (en particular receptores de proteínas) y no se pierda su función de unir ligandos.

- 35 La solución puede incubarse en al menos una de las etapas b), e) y ii) durante un espacio de tiempo de 0,1 a 48 horas, preferiblemente de 0,2 a 24 horas, de manera particularmente preferida de 0,5 a 12 horas, en particular de 1 a 6 horas. Tiempos de incubación prolongados se han manifestado ventajosos, dado que la unión de los pares de ligandos al receptor puede ser favorecida ciertamente de forma termodinámica, pero, a pesar de ello, debe presentar una cinética lenta.

- 40 El receptor que se emplea en el procedimiento de acuerdo con la invención puede estar inmovilizado, preferiblemente sobre un sustrato elegido del grupo consistente en vidrio, material cerámico, biopolímero, sefarosa, polímero sintético e hidrogel. En particular, en este caso la solución con ligandos puede ser conducida en un circuito junto al receptor inmovilizado. Esta forma de realización es ventajosa cuando en el procedimiento la disociación de los complejos de ligandos se lleve a cabo en una parte de la solución que esté separada en el espacio del receptor, dado que con ello la disociación e hibridación de los ligandos puede discurrir ciertamente de manera separada en el espacio, pero a pesar de ello al mismo tiempo (p. ej., disociación en la lejanía al receptor, hibridación en la proximidad al receptor).

- 45 Preferiblemente, el receptor contiene una proteína, un ADN, un ARN, una célula y/o una molécula orgánica con una masa molecular  $\leq 200$  kDa, preferiblemente  $\leq 100$  kDa, de manera particularmente preferida  $\leq 10$  kDa, en particular  $\leq 3$  kDa, o puede componerse de los mismos.

Los ligandos empleados pueden contener una molécula elegida del grupo consistente en proteína, péptido, lípido, hidrato de carbono, ADNdc, ADNcs, ARNdc y ARNcs, aptámero, molécula orgánica con una masa molecular  $\leq 200$  kDa, preferiblemente  $\leq 100$  kDa, de manera particularmente preferida  $\leq 10$  kDa, en particular  $\leq 3$  kDa, o puede componerse de los mismos.

- 55 En una forma de realización preferida, los complejos a base de complejos de ligandos y el receptor son identificados a través de un procedimiento analítico. El procedimiento se elige preferiblemente del grupo que consiste en espectrometría de masas, HPLC, cromatografía de gases, espectroscopía IR y secuenciación de ADN, preferiblemente secuenciación de ADN de un código de barras de ADN o ARN.

Además, de preferencia, el ADN o ARN de cadena sencilla en el caso de la primera y/o segunda parte de los ligandos contiene una secuencia de bases que codifica el ligando unido de forma químicamente covalente (secuencia de bases como código de barras), en donde esta secuencia de bases está hibridada preferiblemente para formar una secuencia de bases complementaria de un ADN o ARN de cadena sencilla adicional. La ventaja del código de barras estriba en la identificación sencilla de ligandos unidos a complejo a través de la secuenciación de ADN o bien ARN. Es particularmente ventajoso que la secuencia de bases de los ligandos contenga hibridado un ADN o ARN de cadena sencilla complementario, que puede servir asimismo como código de barras. Si los dos ligandos del complejo de ligandos-receptor (ligando 1 y ligando 2) contienen un ADN o bien ARN de cadena sencilla, entonces éste puede ser ligado, p. ej., mediante la adición de una ligasa, obteniéndose un ADN o ARN de cadena sencilla que codifica la combinación específica de ligando 1 y 2. El código de barras (ligado) codifica en este caso, por lo tanto, no solo un ligando individual, sino dos ligandos que forman conjuntamente un complejo de ligandos altamente afín.

El

- i) ADN de cadena sencilla empleado en el procedimiento puede contener adenina, timina, guanina y/o citosina; y/o
- ii) ARN de cadena sencilla empleado en el procedimiento puede contener adenina, uracilo, guanina, citosina y/o inosina.

El procedimiento se caracteriza, en una forma de realización ventajosa, porque el ADN o ARN de cadena sencilla de los ligandos de la ligandoteca está hibridado por tramos a una secuencia de bases complementaria de un ADN o ARN de cadena sencilla adicional, en donde 2 a 10 bases del ADN o ARN de cadena sencilla adicional de una primera parte de los ligandos son complementarias a bases del ADN o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos y durante el procedimiento se unen a las bases complementarias (preferiblemente bajo la configuración de una forma Y, en particular, tal como se representa en la Fig. 6), en donde, durante el procedimiento, se añade una ligasa que liga de forma químicamente covalente el ADN o ARN de cadena sencilla adicional de la primera parte de los ligandos con el ADN o ARN de cadena sencilla adicional de la segunda parte de los ligandos.

Un ligamiento de los dos ADNs o ARNs adicionales tiene lugar, por consiguiente, solo cuando se produzca la hibridación de las bases respectivas, es decir, en el caso de que el complejo global sea lo suficientemente estable. Lo ventajoso de esta forma de realización es, sin embargo, que una formación del complejo que haya tenido lugar es "almacenada" por el ligamiento químicamente covalente de los dos ADNs o bien ARNs adicionales. Expresado de otra manera, los ADNs o bien ARNs adicionales ligados se acumulan durante el procedimiento, en el caso de que la base para un ligamiento fuera una formación estable del complejo global. De este modo, puede alcanzarse un aumento claro de la sensibilidad del procedimiento, toda vez que el ADN o ARN ligado, acumulado, puede continuar amplificándose a través de procedimientos conocidos (PCT, RT-PCR). Por consiguiente, de este modo pueden emplearse también concentraciones muy bajas de ligandos o bien identificarse ligandos altamente afines también en el caso de concentraciones de receptores muy bajas.

En el caso de la forma de realización arriba expuesta, el ADN o ARN de cadena sencilla de una primera parte de los ligandos

- i) puede presentar el ligando en su extremo 5' y puede presentar las bases, que son complementarias a las bases del ADN o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos, en su extremo 5', y las 2 a 10 bases del ADN o ARN de cadena sencilla adicional, que son complementarias a las bases del ADN o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos, pueden estar dispuestas en el extremo 3' del ADN o ARN de cadena sencilla adicional; o
- ii) puede presentar el ligando en su extremo 3' y puede presentar las bases, que son complementarias a las bases del ADN o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos, en su extremo 3', y las 2 a 10 bases del ADN o ARN de cadena sencilla adicional, que son complementarias a las bases del ADN o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos, pueden estar dispuestas en el extremo 5' del ADN o ARN de cadena sencilla adicional.

Mediante esta disposición específica de las bases complementarias respectivas se favorece la configuración de una estructura Y, lo cual aumenta de nuevo la eficiencia del ligamiento de los dos ADNs o ARNs de cadena sencilla adicionales mediante la ligasa.

Además, se proporciona un dispositivo microfluidico para llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención. El dispositivo comprende:

- a) un recipiente para el alojamiento de receptor inmovilizado, presentando el recipiente una entrada con válvula que sirve para la inyección de ligandos de una ligandoteca y para el aislamiento de complejos de ligandos-receptor y el recipiente presenta una entrada y una salida a una tubería para fluidos;

b) una tubería para fluidos que está unida con una entrada y una salida del recipiente y que presenta en un punto una salida con válvula;

c) un dispositivo calefactor que está dispuesto en una primera zona de la tubería para fluidos; y

5 d) una zona de refrigeración que se encuentra en una segunda zona, distinta de la primera, de la tubería para fluidos.

En el dispositivo microfluídico, el calentamiento de ligandos que se encuentran en solución y la selección de ligandos que están unidos al receptor inmovilizado, puede tener lugar de forma localmente separada entre sí y, por consiguiente, se puede impedir un deterioro térmico del receptor (p. ej., desnaturalización de proteínas). En este caso, el recipiente puede retener receptor inmovilizado e impedir que el receptor inmovilizado acceda a las tuberías para fluidos. Preferiblemente, el receptor presenta, por consiguiente, filtros que impiden el paso de receptor inmovilizado a la tubería para fluidos.

10

En una forma de ejecución preferida, la zona de refrigeración del dispositivo presenta un dispositivo de enfriamiento y/o está dispuesto en la zona de la salida con válvula.

15

El dispositivo puede presentar una bomba que está dispuesta de modo que puede bombear un líquido a través de la tubería para fluidos, en particular, el recipiente del dispositivo puede presentar filtros que impiden un paso de receptor inmovilizado a la tubería para fluidos.

El dispositivo microfluídico puede caracterizarse porque el recipiente y/o la tubería para fluidos contienen una quimioteca dinámica, autoensamblante de acuerdo con la invención (véase más adelante).

20

Se proporciona, además, una quimioteca que contiene ligandos que presentan más de un ADN o ARN de cadena sencilla con una longitud de bases de más de 2 bases que están unidas de forma químicamente covalente a un ligando. La quimioteca se caracteriza porque 2 a 10 bases del ADN o ARN de cadena sencilla de una primera parte de los ligandos son complementarias a bases del ADN o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos.

25

En este caso, solo 3 a 9 bases, preferiblemente solo 4 a 8 bases, de manera particularmente preferida solo 5 a 7 bases del ADN o ARN de cadena sencilla de una primera parte de los ligandos son complementarias al ADN o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos.

La longitud del ADN o ARN de la primera parte de los ligandos y/o de la segunda parte de los ligandos puede ascender al menos a 20 bases, de preferencia al menos a 40 bases, de manera particularmente preferida al menos a 100 bases, en particular al menos a 200 bases.

30

En una forma de ejecución preferida, la primera y/o segunda parte de los ligandos supone más del 20%, preferiblemente más del 30%, de manera particularmente preferida más del 40%, en particular el 50% de la cantidad total de los ligandos de la quimioteca. La primera parte de los ligandos L presenta preferiblemente L ligandos diferentes, y la segunda parte de los ligandos presenta preferiblemente L ligandos diferentes, de modo que la quimioteca presenta L<sup>2</sup> complejos de ligandos diferentes.

35

Los ligandos de la quimioteca pueden contener una molécula elegida del grupo consistente en proteína, péptido, lípido, hidrato de carbono, ADNdc, ADNcs, ARNdc y ARNcs, aptámero, molécula orgánica con una masa molecular ≤ 200 kDa, preferiblemente ≤ 100 kDa, de manera particularmente preferida ≤ 10 kDa, en particular ≤ 3 kDa, o puede componerse de los mismos.

El

40

i) ADN de cadena sencilla puede contener adenina, timina, guanina y/o citosina; y/o

ii) ARN de cadena sencilla puede contener adenina, uracilo, guanina, citosina y/o inosina.

La quimioteca se puede caracterizar porque el ADN o ARN de cadena sencilla de los ligandos de la quimioteca está hibridado en cada caso por tramos a una secuencia de bases complementaria de un ADN o ARN de cadena sencilla adicional, en donde 2 a 10 bases de un primer ADN o ARN de cadena sencilla adicional de una primera parte de los ligandos son complementarias a bases del segundo ADN o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos.

45

El ADN o ARN de cadena sencilla de una primera parte de los ligandos

50

i) que presenta el ligando en su extremo 5' puede presentar en su extremo 5' las bases, que son complementarias a las bases del ADN o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos, y las 2 a 10 bases del ADN o ARN de cadena sencilla adicional, que son complementarias a las bases del segundo ADN o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos, pueden estar dispuestas en el extremo 3' del ADN o ARN de cadena sencilla adicional; o

ii) que presenta el ligando en su extremo 3' puede presentar en su extremo 3' las bases, que son complementarias a las bases del ADN o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos, y las 2 a 10 bases del ADN o ARN de cadena sencilla adicional, que son complementarias a las bases del ADN (9) o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos, pueden estar dispuestas en el extremo 5' del ADN o ARN de cadena sencilla adicional.

Finalmente, se propone el uso de la quimioteca de acuerdo con la invención para la identificación selectiva y sensible de complejos de ligandos-receptor ternarios altamente afines.

Con ayuda de las siguientes Figuras se ha de explicar con mayor detalle el objeto de acuerdo con la invención, sin desear limitar éste a las formas de realización específicas aquí representadas.

La Figura 1 muestra una pluralidad de diferentes ligandos 2, 3, 4, 5, 6, 7 de una quimioteca y al menos un receptor 1. Los ligandos 2, 3, 4, 5, 6, 7 están unidos de forma químicamente covalente en cada caso a un ADN 8, 9 de cadena sencilla, presentando el ADN 8, 9 de cadena sencilla una longitud de bases de más de 10 bases. El ADN 8, 9 de cadena sencilla codifica en cada caso el ligando respectivo al que está unido, a través de su secuencia de bases. En este ejemplo de realización, 18 bases del ADN 8 de cadena sencilla de una primera parte de los ligandos 2, 6, 7 son complementarias al ADN 9 de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos 3, 4, 5 (véase la línea discontinua entre los ADNs 8, 9 de cadena sencilla). En este caso, solamente un par de ligandos determinado (formado por los ligandos de los números de referencia 2 y 3) se une con alta afinidad al receptor 1. Otros pares de ligandos (formados por los ligandos de los números de referencia 4, 5, 6, 7) se unen débilmente a nada en absoluto al receptor 1. Mediante el elevado número de bases complementarias entre los ADNs 8, 9 de cadena sencilla de dos ligandos 2, 3, 4, 5, 6, 7 se estabilizan los complejos de ligandos, lo cual determina una elevada sensibilidad en su empleo en un procedimiento de detección. Con el fin de alcanzar una dinámica de la hibridación y disociación, se requiere un calentamiento (disociación) y enfriamiento (reasociación o bien hibridación) permanentes, es decir, una aportación de energía.

La Figura 2 muestra una representación correspondiente a la Figura 1, con la diferencia de que en este ejemplo de realización solamente 6 bases del ADN de cadena sencilla de una primera parte de los ligandos son complementarias a bases del ADN o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos (por lo demás, las moléculas y las designaciones son idénticas a la Figura 1). Debido al número menor de bases complementarias, resulta la ventaja de que la asociación (hibridación) de dos ligandos ya es altamente dinámica a la temperatura ambiente (15 °C a 30 °C), es decir, tiene lugar una hibridación y disociación permanentes. La unión altamente afin al receptor presente en determinados pares de ligandos inhibe la disociación de estos pares de ligandos, con lo cual están más poblados complejos a base de receptor y pares de ligandos altamente afines, en el transcurso del tiempo "se acumulan" y en última instancia están más intensamente poblados en equilibrio. Lo ventajoso de esta forma de realización es que la dinámica de la asociación e hibridación tiene lugar a la temperatura ambiente, es decir, a diferencia de la forma de realización de la Figura 1, no tiene que aportarse energía térmica alguna. El inconveniente de esta forma de realización es una sensibilidad menor que en el caso de la forma de realización en la Figura 1, dado que el menor número de pares de bases (6 en lugar de 18) hace más inestable al complejo de los ligandos y, con ello, al complejo de los ligandos con el receptor, con lo cual éste está menos intensamente poblado en equilibrio que en la forma de realización en la Figura 1.

La Figura 3 pone de manifiesto, a través de una ecuación de la reacción, cómo se "acumulan" los pares de ligandos altamente afines como complejo con el receptor en el transcurso del tiempo (véase la primera flecha en la parte superior). Adicionalmente a las moléculas ya mencionadas de la Figura 1 y de la Figura 2, los pares de ligandos presentan todavía un ADN 10, 11 de cadena sencilla complementario al ADN de cadena sencilla unido de forma covalente a los ligandos (por lo demás, las moléculas y las designaciones son idénticas a la Figura 1). Este ADN 10, 11 de cadena sencilla adicional puede generarse, por ejemplo, a través de cebadores adecuados y de una reacción PCR. La flecha 12 inferior simboliza una reacción de ligamiento (p. ej., mediante la adición de una enzima ligasa), que conduce a que los ADNs 10, 11 de cadena sencilla adicionales se ligan uno a otro de forma químicamente covalente. La ventaja en este caso es que el trozo de ADN ligado codifica, en cada caso a través de su secuencia de bases, un par de ligandos específico que, por consiguiente, a través de la secuenciación de ADN puede ser identificado fácilmente.

La Figura 4 describe un dispositivo microfluídico de acuerdo con la invención. En un recipiente 14 se encuentra receptor inmovilizado que fue cargado al recipiente a través del orificio 15 con válvula. El recipiente 14 está unido en un lado y en el otro lado con una tubería, a través de la cual se puede conducir un líquido. La tubería se encuentra en una zona que puede ser caldeada. Un calentamiento puede tener lugar a través de un radiador IR como fuente de calor 13. El dispositivo presenta, además, y una zona de refrigeración 17. Opcionalmente, esta zona contiene un dispositivo de refrigeración. Además, la tubería, aquí en la zona de refrigeración 17, presenta una salida 16 con una válvula de la que puede extraerse líquido con ligando (libre) y puede aportarse para su análisis. Además, después de un determinado tiempo de incubación se puede extraer a través del orificio 15 receptor inmovilizado cargado con ligandos altamente afines.

La Figura 5 muestra el resultado de un experimento que confirma la eficacia del procedimiento de acuerdo con la invención. Como ligando se utilizó iminobiotina que en cada caso estaba unida de forma químicamente covalente a

ADNcs (=Im-ADNcs). El Im-ADNcs estaba dividido en partes iguales en una primera parte de Im-ADNcs1 y en una segunda parte de Im-ADNcs2, en donde el Im-ADNcs1 y el Im-ADNcs2, en función del experimento, presentaban un número diferente de bases complementarias entre sí (p. ej., 6 bases complementarias en el caso de "6-mero"). Im-ADNcs1 se acopló de forma químicamente covalente al colorante de fluorescencia Cy5 con el fin de posibilitar, por un lado, una detección y cuantificación de Im-ADNcs1 libre o bien el complejo binario libre a base de Im-ADNcs1 e Im-ADNcs2 sin receptor y, por otro lado, la detección del complejo ternario Im-ADNcs1·Im-ADNcs2·receptor. Como receptor se utilizó estreptavidina inmovilizada y como solución se utilizó un tampón acuoso con pH 9,2. La Figura muestra la relación de la cantidad de complejo de ligandos-receptor a ligandos no unidos a receptor ("unido/no unido" en el eje y) bajo relaciones competitivas, es decir, en presencia de ADNcs libre de iminobiotina (ADNcs) como ejemplo de un ligando no afín (véase, "de un brazo", "6-mero", "8-mero", y "21-mero" en el eje x) o bien relaciones no competitivas, es decir, sin la presencia de ADNcs competitivo ("21-mero sin comp." en el eje x).

A excepción del experimento no competitivo ("21-mero, no comp." en el eje x) el ADNcs libre de iminobiotina estaba presente en un exceso de 300 veces en la solución. En el experimento con la designación "de un brazo" (también un 6-mero) solo estaba presente Im-ADNcs1, es decir nada de Im-ADNcs2, de modo que no se pudieron formar complejos binarios de ligandos. El experimento "de un brazo" muestra, por consiguiente, la relación de unión para una iminobiotina monomérica a estreptavidina. En comparación directa con el experimento "6-mero" resulta claro que bajo las condiciones competitivas sometidas a ensayo, en el caso de iminobiotina dimérica (= complejo binario de ligandos) el equilibrio de unión está desplazado claramente en dirección al complejo de ligandos-receptor. Este efecto es todavía más claramente acusado mediante la mayor estabilización por la hibridación de 8 pares de bases en el experimento "8-mero". Si el número de bases complementarias continúa sin embargo aumentando (p. ej., aquí 21 bases complementarias en el experimento "21-mero"), entonces la cantidad de complejo de ligandos-receptor cae a un valor que corresponde aproximadamente al valor del experimento "de un brazo".

Esta observación se puede explicar debido a que el ADNcs unido a iminobiotina y marcado con Cy5 (Im-ADNcs1) es "capturado" en complejos binarios pocos afines con ADNcs libre de iminobiotina (ADNcs) y, por lo tanto, ya no se puede unir a ADNcs libre de Cy5 complementario, pero con contenido en iminobiotina (Im-ADNcs2). Este efecto se observa, por lo tanto, solo en el caso del experimento "21-mero", dado que aquí un complejo Im-ADNcs1·ADNcs formado es tan estable que a temperatura ambiente (sin aportación adicional de energía) ya no tiene lugar prácticamente disociación alguna de este complejo. En el caso de un número de bases complementarias de 6 y 8 bases ("6-mero" o bien "8-mero") este efecto ya no se manifiesta, dado que aquí la formación del complejo Im-ADNcs1·ADNcs no es estático, sino dinámico y, por consiguiente, en el caso de este número menor de bases complementarias se libera de nuevo un ADNcs unido a iminobiotina (Im-ADNcs1) "bloqueado" mediante ADNcs y puede reaccionar con otro ADNcs unido a iminobiotina (Im-ADNcs2) para formar un complejo binario altamente afín. Por consiguiente, en el caso de un número de pares de bases de 6 a 8 se alcanza a la temperatura ambiente una "acumulación" de complejos a base de receptor (aquí estreptavidina) y pares de ligandos altamente afines (aquí un par a base de dos moléculas de iminobiotina), con lo cual este procedimiento es superior en relación con la sensibilidad de un procedimiento estático. La sensibilidad puede aumentarse debido a que se utiliza un número de 21 pares de bases y se calienta (disociación) y enfría (hibridación) alternativamente, es decir, se aporta energía.

La Figura 6 muestra una forma Y que adopta el complejo global en una forma de realización preferida de la invención. El primer ligando 2 que está unido de forma químicamente covalente al primer ADN 8 de cadena sencilla, presenta un segmento 18 que codifica el primer ligando 2. El segundo ligando 3, que está unido de forma químicamente covalente al segundo ADN 9 de cadena sencilla, presenta un segmento 19 que codifica el segundo ligando 3. Aquí, seis bases del primer ADN 8 de cadena sencilla son complementarias a seis bases del segundo ADN 9 de cadena sencilla y pueden configurar durante el procedimiento pares de bases 20 (véanse las líneas entre los ADN 8, 9 de cadena sencilla). Además, en este ejemplo de realización, el primer ADN 8 de cadena sencilla se hibrida por tramos (aquí: en el extremo 3') con un primer ADN 10 de cadena sencilla adicional. El primer ADN 10 de cadena sencilla adicional se caracteriza porque contiene un "colgante" de dos a doce bases (aquí: cinco bases, localizadas en su extremo 3') que son complementarias a dos hasta doce bases del segundo ADN 9 de cadena sencilla (aquí: cinco bases) y que pueden configurar con las bases complementarias durante el procedimiento pares de bases 20 (véanse las líneas entre el primer ADN 10 de cadena sencilla adicional y el segundo ADN 9 de cadena sencilla).

Si el segundo ligando 3 está hibridado a través del segundo ADN 9 de cadena sencilla por zonas con un segundo ADN 11 adicional adecuado, entonces la formación del complejo global (aquí: en forma de Y) determina que el primer ADN 10 adicional sea conducido conjuntamente con el segundo ADN 11 adicional de modo que pueden ser ligados de forma químicamente covalente a través de la adición de una enzima ligasa. Si en el procedimiento se añade una enzima ligasa, entonces se consigue con ello que productos de ligamiento de los dos ADN 10, 11 adicionales de cadena sencilla, que codifican complejos de ligandos altamente afines, se acumulen en el transcurso del procedimiento. Con ello, aumenta la sensibilidad de su detección. Dado que en el caso del producto de acumulación se trata de ADN, éste puede todavía ser amplificado adicionalmente (p. ej., mediante PCR), con lo cual se puede aumentar de nuevo la sensibilidad del procedimiento. Además, una secuenciación del ADN ligado permite una rápida deducción de los dos ligandos 2, 3, dado que el ADN ligado presenta los segmentos 18, 19 que codifican los dos ligandos 2, 3.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la identificación sensible de complejos altamente afines a base de dos ligandos (2, 3, 4, 5, 6, 7) y un receptor (1), que comprende las siguientes etapas
- 5 a) interacción de una pluralidad de diferentes complejos a base de ligandos (2, 3, 4, 5, 6, 7) de una quimioteca con al menos un receptor (1) en una solución, presentando los ligandos (2, 3, 4, 5, 6, 7) de la quimioteca un ADN (8, 9) o ARN de cadena sencilla con una longitud de bases mayor que 10 bases, que está unido de manera químicamente covalente a los ligandos (2, 3, 4, 5, 6, 7), y en donde más de 10 bases del ADN (8) o ARN de cadena sencilla de una primera parte de los ligandos (2, 6, 7) son complementarias a bases del ADN (9) o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos (3, 4, 5), y en donde los ligandos están complejados a través de hibridación del ADN (8, 9) o ARN para formar complejos de ligandos;
- 10 b) incubación de la solución durante un determinado espacio de tiempo, formándose complejos a base de complejos de ligandos y el receptor (1);
- c) disociación de los complejos de ligandos para formar ligandos libres;
- d) re-hibridación de los ligandos libres para formar complejos de ligandos adicionales;
- 15 e) incubación de la solución durante un espacio de tiempo determinado, formándose complejos adicionales a partir de los complejos de ligandos adicionales y el receptor (1);
- f) identificación de los complejos resultantes a base de complejos de ligandos y el receptor (1),
- caracterizado por que se incuba a una temperatura a la que la primera parte de los ligandos (2, 6, 7) y la segunda parte de los ligandos (3, 4, 5) están hibridadas en la solución para formar complejos de ligandos.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que los complejos de ligandos se disocian mediante el aumento de la temperatura de la solución, en particular hasta una temperatura de 35 °C a 95 °C, preferiblemente de 50 °C a 95 °C, de manera particularmente preferida de 70 °C a 95 °C, en particular de 80 °C a 95 °C.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la disociación de los complejos de ligandos se lleva a cabo en una parte de la solución que está distanciada en el espacio del receptor, preferiblemente de modo que el receptor no se ve funcionalmente perjudicado por las condiciones que conducen a la disociación.
- 25 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que los ligandos libres se re-hibridan mediante reducción de la temperatura de la solución, en particular a una temperatura de 1 °C a 30 °C, preferiblemente de 5 °C a 28 °C, de manera particularmente preferida de 10 °C a 25 °C, en particular de 15 a 20 °C.
- 30 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que las etapas c) a e) se repiten al menos una vez o dos veces, preferiblemente al menos 3 o 4 veces, de manera particularmente preferida al menos 5 o 6 veces, en particular al menos 7 u 8 veces.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que al menos 20 bases, preferiblemente al menos 40 bases, de manera particularmente preferida al menos 100 bases, en especial al menos 200 bases del ADN (8) o ARN de cadena sencilla de una primera parte de los ligandos (2, 6, 7) son complementarias al ADN (9) o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos (3, 4, 5).
- 35 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la longitud del ADN (8) o ARN de la primera parte de los ligandos (2, 6, 7) y/o la longitud del ADN (9) o ARN de la segunda parte de los ligandos (3, 4, 5) asciende al menos a 20 bases, preferiblemente al menos a 40 bases, de manera particularmente preferida al menos a 100 bases, en particular al menos a 200 bases.
- 40 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la primera parte de los ligandos (2, 6, 7) presenta L ligandos (2, 6, 7) diferentes y la segunda parte de los ligandos (3, 4, 5) presenta M ligandos (3, 4, 5) diferentes, de modo que se forman diferentes complejos de ligandos L·M.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la solución en al menos una de las etapas b) y e)
- 45 (i) se incuba a una temperatura de 1 °C a 50 °C, preferiblemente de 5 °C a 37 °C, de manera particularmente preferida de 10 °C a 25 °C, en particular de 15 a 20 °C; y/o
- (ii) durante un espacio de tiempo de 0,1 a 48 horas, preferiblemente de 0,2 a 24 horas, de manera particularmente preferida de 0,5 a 12 horas, en particular de 1 a 6 horas.
- 50 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el receptor (1)

(i) se inmoviliza, preferiblemente sobre un sustrato elegido del grupo consistente en vidrio, material cerámico, biopolímero, sefarosa, polímero sintético e hidrogel; y/o

(ii) contiene una proteína, un ADN, un ARN, una célula y/o una molécula orgánica con una masa molecular  $\leq 200$  kDa, preferiblemente  $\leq 100$  kDa, de manera particularmente preferida  $\leq 10$  kDa, en particular  $\leq 3$  kDa, o se compone de los mismos.

- 5
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que los ligandos (2, 3, 4, 5, 6, 7) contienen una molécula elegida del grupo consistente en proteína, péptido, lípido, hidrato de carbono, ADNdc, ADNcs, ARNdc, ARNcs, aptámero, molécula orgánica con una masa molecular  $\leq 200$  kDa, preferiblemente  $\leq 100$  kDa, de manera particularmente preferida  $\leq 10$  kDa, en particular  $\leq 3$  kDa, o puede componerse de los mismos.
- 10
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que los complejos a base de complejos de ligandos y el receptor (1) se identifican a través de un procedimiento analítico, preferiblemente elegido del grupo que consiste en espectrometría de masas, HPLC, cromatografía de gases, espectroscopía IR y secuenciación de ADN, preferiblemente a través de secuenciación de ADN de un código de barras de ADN o ARN.
- 15
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el ADN (8) o ARN de cadena sencilla en el caso de la primera parte de los ligandos (2, 6, 7) y/o el ADN (9) o ARN de cadena sencilla en el caso de la segunda parte de los ligandos (3, 4, 5) contiene una secuencia de bases que codifica el ligando unido de forma químicamente covalente, en donde esta secuencia de bases está hibridada, preferiblemente al menos por tramos, para formar una secuencia de bases complementaria de un ADN o ARN de cadena sencilla adicional.
- 20
14. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el ADN (8, 9) o ARN de cadena sencilla de los ligandos (2, 3, 4, 5, 6, 7) de la ligandoteca está hibridado por tramos a una secuencia de bases complementaria de un ADN (10) o ARN de cadena sencilla adicional, en donde 2 a 10 bases del ADN (10) o ARN de cadena sencilla adicional de una primera parte de los ligandos (2, 6, 7) son complementarias a bases del ADN (9) o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos (3, 4, 5) y durante el procedimiento se unen a las bases complementarias, configurándose una forma Y, y en el que, durante el procedimiento, se añade una ligasa que liga de forma químicamente covalente el ADN (10) o ARN de cadena sencilla adicional de la primera parte de los ligandos (2, 6, 7) con el ADN o ARN de cadena sencilla adicional de la segunda parte de los ligandos (3, 4, 5).
- 25
15. Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado por que en el caso de un ADN (8) o ARN de cadena sencilla de una primera parte de los ligandos (2, 6, 7)
- 30
- i) que presenta el ligando (2, 6, 7) en su extremo 5', presenta las bases, que son complementarias a las bases del ADN (9) o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos (3, 4, 5), en su extremo 5', y las 2 a 10 bases del ADN (10) o ARN de cadena sencilla adicional, que son complementarias a las bases del ADN (9) o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos (3, 4, 5), pueden estar dispuestas en el extremo 3' del ADN o ARN de cadena sencilla adicional; o
- 35
- ii) presenta el ligando (2, 6, 7) en su extremo 3', presenta las bases, que son complementarias a las bases del ADN (9) o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos (3, 4, 5), en su extremo 3', y las 2 a 10 bases del ADN (10) o ARN de cadena sencilla adicional, que son complementarias a las bases del ADN (9) o ARN de cadena sencilla de una segunda parte de los ligandos (3, 4, 5), están dispuestas en el extremo 5' del ADN (10) o ARN de cadena sencilla adicional.

Figura 1

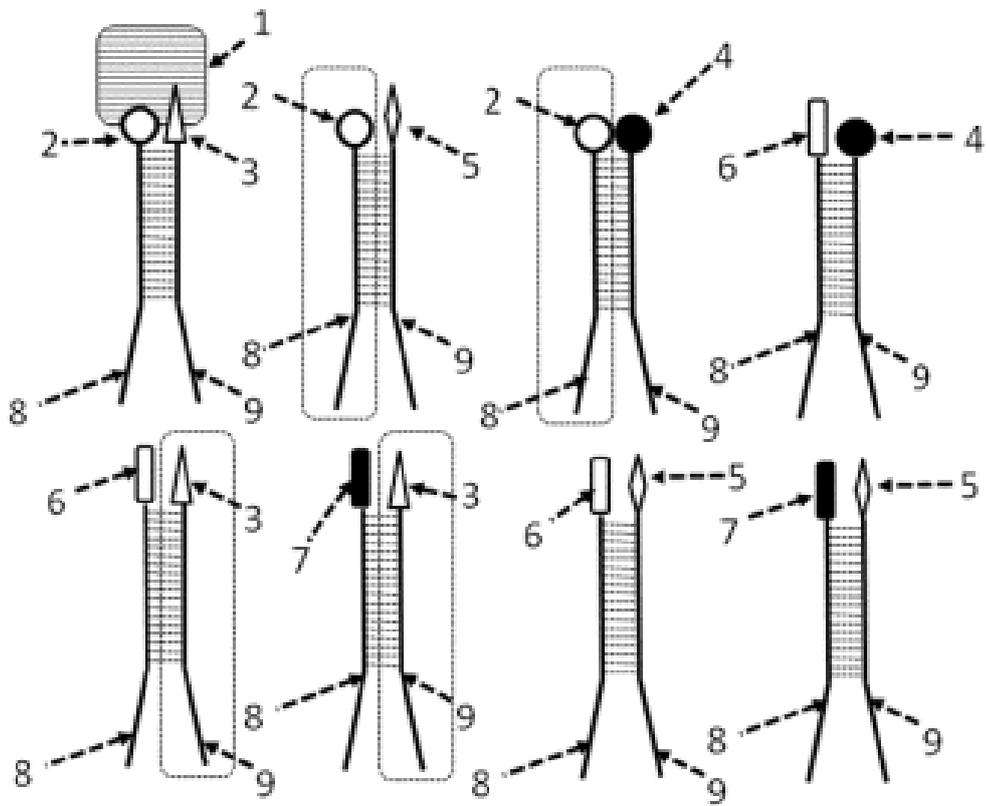


Figura 2

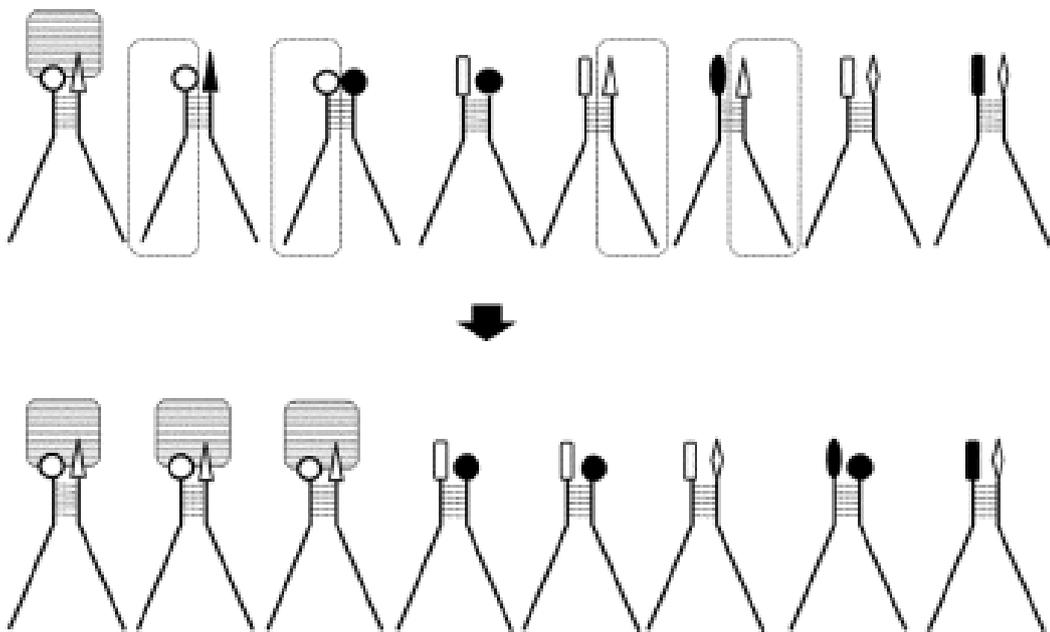


Figura 3

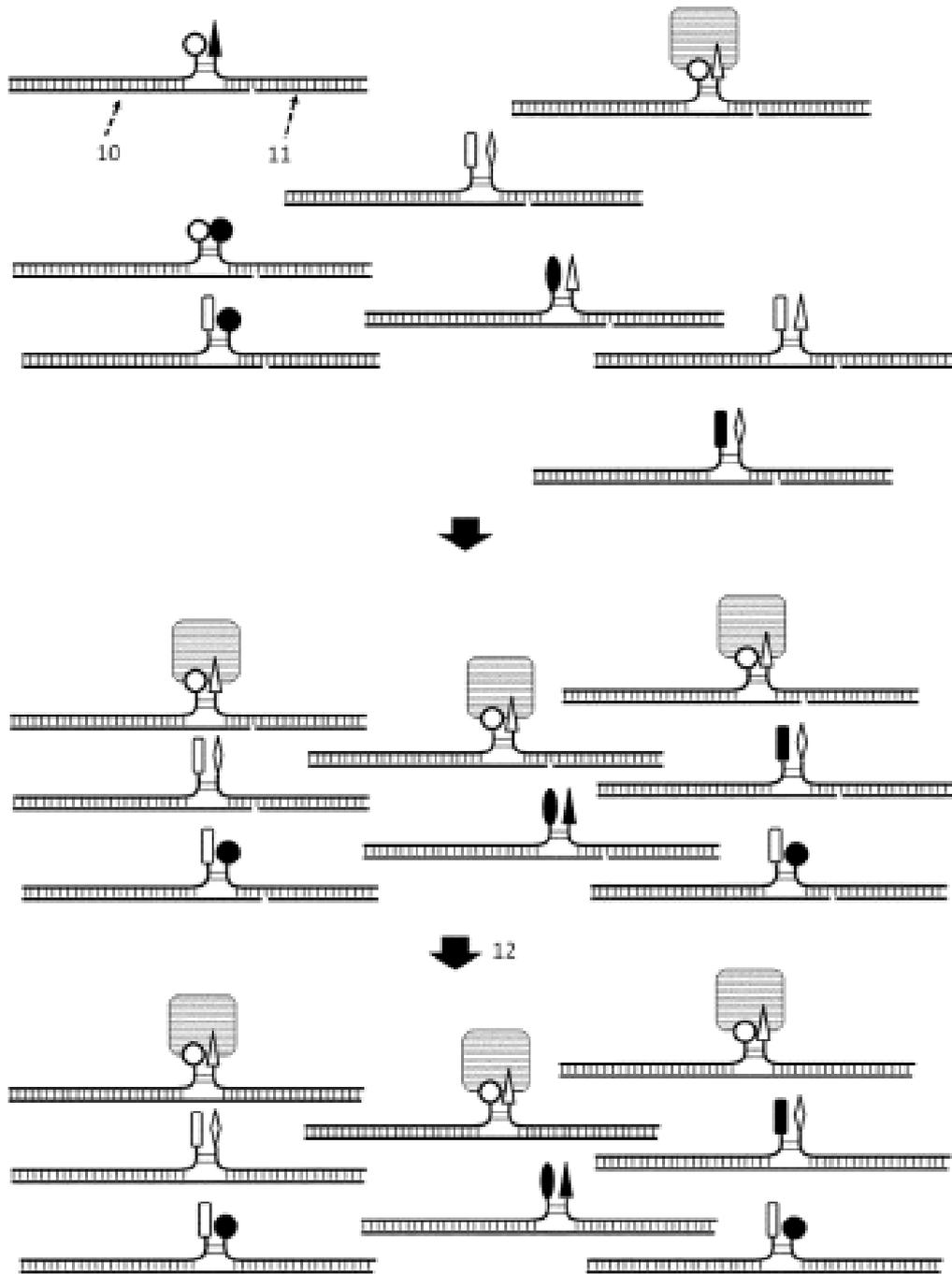


Figura 4

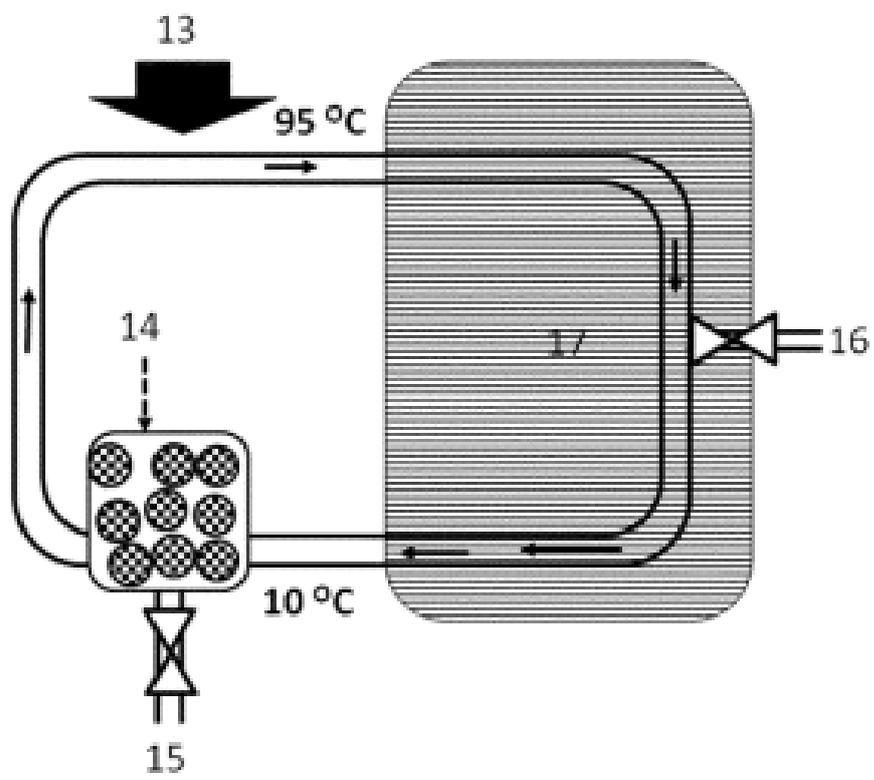


Figura 5

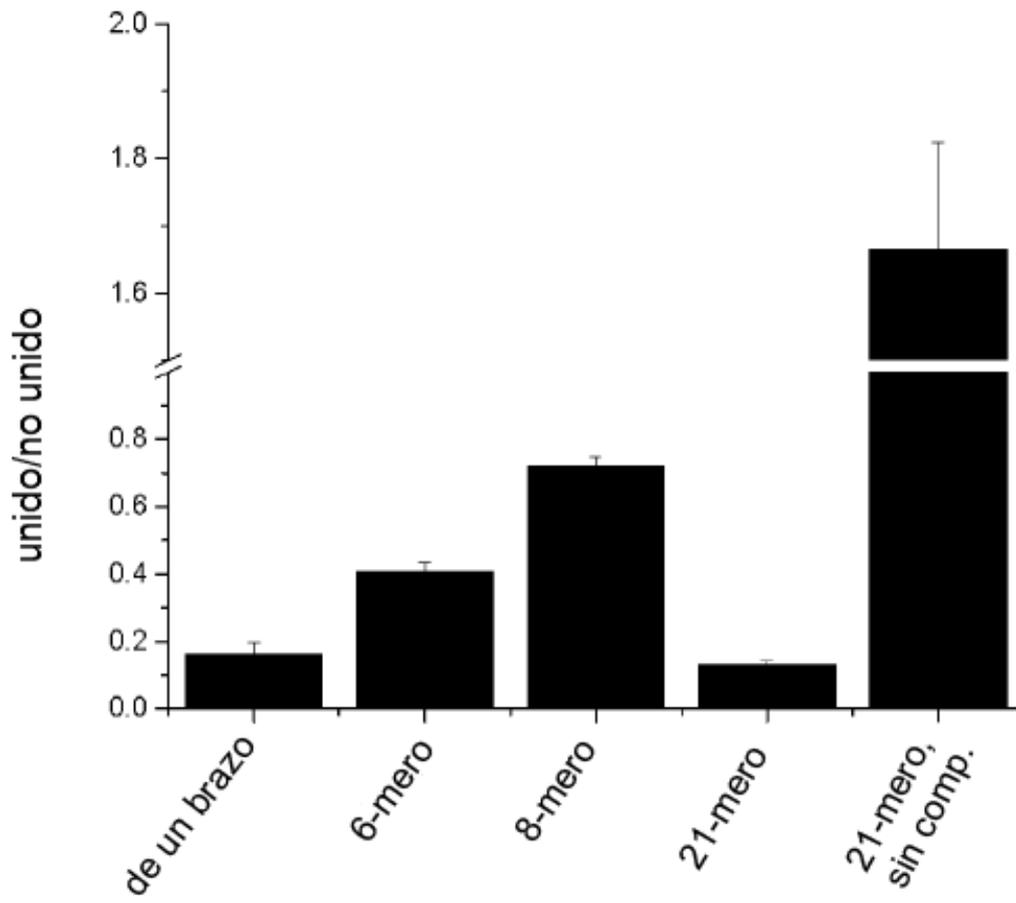


Figura 6

