(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 732 054**

(51) Int. CI.:

C12N 15/10 (2006.01)
B01J 19/00 (2006.01)
C40B 50/14 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2015 PCT/US2015/013382**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15116739**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2015 E 15743623 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 3099799**

(54) Título: **Matrices de monolitos con compuestos de reconocimiento unidos**

(30) Prioridad:

28.01.2014 US 201461932747 P
02.06.2014 US 201462006845 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.11.2019

(73) Titular/es:

DICE MOLECULES SV. LLC (100.0%)
1455 Adams Drive
Menlo Park, CA 94025, US

(72) Inventor/es:

HARBURY, PEHR;
PAIDHUNGAT, MADAN y
PRINCE, ROBIN

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

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

Matrices de monolitos con compuestos de reconocimiento unidos

En la presente descripción se proporcionan matrices que incluyen monolitos con compuestos de reconocimiento unidos que se unen selectivamente a oligonucleótidos complementarios unidos operativamente a un sitio de reacción química o a un ligando.

Antecedentes de la invención

Los soportes de polímeros reticulados han sido útiles en catálisis, separaciones y síntesis en fase sólida. Los soportes de polímeros reticulados se proporcionaron inicialmente como partículas porosas homogéneas, que se usaron típicamente en procesos de flujo continuo, lo que incluye, entre otros, cromatografía. Sin embargo, existe una serie de problemas importantes con respecto al uso de sorbentes particulados: el intercambio lento entre el flujo convectivo y la unión al soporte sólido, lo que conduce a una resolución deficiente, gran volumen vacío entre las partículas empaquetadas, presiones de retroceso altas y capacidad de unión dinámica baja, particularmente en el caso de las macromoléculas. Las limitaciones anteriores han restringido el uso de partículas porosas homogéneas como soportes funcionalizados con moléculas de reconocimiento unidas que pueden unirse a diversos ligandos.

Más recientemente, se han desarrollado materiales monolíticos porosos (Arrua, y otros, Materials (2009) 2 2429-2466; Svec y otros, Monolith Materials, J. of Chromatography Library, vol. 67, Svec y otros, (Eds..); Wu y otros, J. Chromatography A (2008) 369-392). Estos polímeros macroporosos heterogéneos tienen una estructura porosa rígida que se forma durante la preparación y se mantiene usualmente en cualquier solvente o en estado seco e imparte una calidad similar a esponja al monolito. Es importante destacar que los problemas de grandes volúmenes vacíos (es decir, permeabilidad alta), intercambio lento (es decir, tasas bajas de transferencia de masa) de macromoléculas, resolución deficiente y presiones de retroceso altas, se mitigan en dichos materiales monolíticos donde el flujo de fluido es a través de los poros del monolito. Actualmente, los monolitos se han usado principalmente para separaciones cromatográficas, con relativamente poca atención dedicada a la preparación de monolitos funcionalizados con moléculas de reconocimiento unidas (particularmente, ADN) para la unión de ligandos y su uso, por ejemplo, en matrices.

El documento US-A-2006/0099626 describe un dispositivo y un método para sintetizar bibliotecas químicas combinatorias con plantillas de ácidos nucleicos.

En consecuencia, lo que se necesita son monolitos que incluyan compuestos de reconocimiento unidos y matrices de estos monolitos. Dichos monolitos y las matrices de estos serán útiles, entre otros, en la unión de ligandos.

Resumen

La presente invención proporciona una matriz y una matriz de hibridación para la partición preparativa de una biblioteca de compuestos químicos programada con ácidos nucleicos como se define en las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra una división dirigida por ADN de una biblioteca de fragmentos ilustrativa. La familia degenerada de etiquetas de ácido nucleico en este ejemplo se compone por secuencias de nucleótidos de 20 pares de bases encadenados, que son constantes (C_1-C_5) o variables (a_1-j_4). Las letras a_1 a j_4 en las regiones variables de los fragmentos de ADN denotan secuencias de 20 nucleótidos diferentes con propiedades de hibridación ortogonales. Para llevar a cabo la primera división, la familia degenerada de fragmentos se pasa sobre un conjunto de diez resinas de afinidad diferentes que muestran las secuencias $a_1{}^c$-$j_1{}^c$, que son complementarias a las secuencias a_1-j_1 en la primera región variable (una resina de afinidad ilustrativa se representa por el círculo). El resultado son diez subgrupos de la familia original de fragmentos. Cada subgrupo de etiquetas de ácido nucleico se hace reaccionar después con un monómero químico diferente para permitir el acoplamiento del monómero químico diferente en el sitio de reacción química de cada etiqueta de ácido nucleico. Después los subgrupos vuelven a combinarse y la biblioteca se divide en un nuevo conjunto de subgrupos basados en las secuencias a_2-j_2, etcétera.

La Fig. 2 muestra una reacción de acoplamiento químico ilustrativa en el sitio de reacción química de una etiqueta de ácido nucleico. Una etiqueta de ácido nucleico que comprende un sitio de reacción química se trata con el éster NHS de FMOC-alanina en DMF. El grupo protector FMOC se elimina con piperidina para proporcionar una alanina acoplada al sitio de reacción química de la etiqueta de ácido nucleico. El proceso puede repetirse muchas veces, y con una variedad de aminoácidos en etapas sucesivas para producir una biblioteca de polipéptidos diferentes.

Las Fig. 3A-3D ilustran un método de síntesis química basada en partición mediante el uso de una serie de columnas para generar una biblioteca de compuestos químicos diferentes.

La Fig. 4 ilustra una matriz de hibridación ilustrativa con A11, D11, T1, D12 y A12 de izquierda a derecha. La cara frontal está en la parte superior, y la parte superior del dispositivo está a la izquierda.

La Fig. 5 ilustra una matriz de transferencia ilustrativa con D01, T1 y D02 de izquierda a derecha. La cara frontal está en la parte superior, y la parte superior del dispositivo está a la izquierda.

Descripción detallada

Definiciones

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos científicos en la presente descripción tienen el mismo significado que el que se conoce por el experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En el caso de que exista una pluralidad de definiciones para un término, aquellos que se encuentran en esta sección prevalecen a menos que se declare de cualquier otra manera.

Debe destacarse que, como se usa en la presente y en las reivindicaciones anexadas, las formas del singular “un" "una" y “el/la" incluyen referencias del plural a menos que el contexto lo establezca claramente de cualquier otra manera. De este modo, por ejemplo, la referencia a "una etiqueta" incluye una pluralidad de dichas etiquetas, y la referencia a "el compuesto" incluye la referencia a uno o más compuestos y equivalentes de estos conocidos por los expertos en la técnica, etcétera.

Se observa, además, que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base antecedente para el uso de dicha terminología exclusiva como "solamente", "solo" y similares en relación con la narración de los elementos de la reivindicación, o el uso de una limitación "negativa".

"Alquilo", como se usa en la presente, significa cualquier alquilo saturado o insaturado, ramificado o no ramificado, ciclado o sus combinaciones, que tiene típicamente 1-10 átomos de carbono, lo que incluye metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, t-butilo, pentilo, ciclopentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, isohexilo, ciclohexilo, que puede sustituirse opcionalmente con metilo.

"Alquileno", como se usa en la presente, significa cualquier alquileno ramificado o no ramificado, ciclado o sus combinaciones, que tiene típicamente 1-10 átomos de carbono, lo que incluye metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, t-butilo, pentilo, ciclopentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, isohexilo, ciclohexilo, que puede sustituirse opcionalmente con metilo.

"Población amplificadora de compuestos", como se usa en la presente, se refiere a una población creciente de compuestos sintetizados de acuerdo con las secuencias de hibridación encadenadas de las etiquetas de ácido nucleico producidas por los métodos repetitivos descritos en la presente descripción.

"Anticuerpo", como se usa en la presente, se refiere a una proteína que comprende uno o más polipéptidos codificados sustancial o parcialmente por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina, por ejemplo, un fragmento que contiene una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés). Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, epsilon y mu, así como también múltiples genes de la región variable de las inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras se clasifican típicamente como, por ejemplo, kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican típicamente como, por ejemplo, gamma, mu, alfa, delta, o epsilon, las que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) típica comprende un tetrámero. En la naturaleza, cada tetrámero se compone de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas respectivamente. Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como una serie de fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. De este modo, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo más abajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir F(ab)'2 (fragmento de enlace de antígeno) y Fc (fragmento cristalizable, o fragmento de enlace del complemento). F(ab)'2 es un dímero de Fab, que a su vez es una cadena ligera unida a VH-CH1 por un enlace disulfuro. El F(ab)'2 puede reducirse en condiciones moderadas para romper el enlace disulfuro en la región de la bisagra, lo que convierte de esta manera el dímero $(Fab')_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra. La porción Fc de la molécula de anticuerpo corresponde en gran parte a la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, y es responsable de la función efectora del anticuerpo (ver, Fundamental Immunology, 4ª edición. WE Paul, ed., Raven Press, NY (1998), para una descripción más detallada de los fragmentos de anticuerpos). Mientras que diversos fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que dichos fragmentos Fab' o Fc pueden sintetizarse de novo ya sea químicamente o mediante el uso de una metodología de ADN recombinante, presentación de péptidos o similares. Por lo tanto, el término anticuerpo, como se usa en la presente, incluye además fragmentos de anticuerpos producidos ya sea por la modificación de anticuerpos completos o sintetizados de novo mediante el uso de metodologías de ADN recombinante. Los anticuerpos incluyen, además, anticuerpos monoclonales compuestos de un solo brazo, anticuerpos de cadena única, lo que incluye los anticuerpos Fv de cadena simple (sFv) en los que una cadena pesada variable y una cadena ligera variable se unen (directamente o mediante un enlazador

peptídico) para formar un polipéptido continuo, así como también diacuerpos, tricuerpos, y tetracuerpos (Pack y otros (1995) J Mol Biol 246:28; Biotechnol 11:1271; y Biochemistry 31:1579). Los anticuerpos son, por ejemplo, policlonales, monoclonales, quiméricos, humanizados, de cadena simple, fragmentos Fab, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, o similares.

La "formación de dúplex específico de base" o "hibridación específica", como se usa en la presente, se refiere a las condiciones de temperatura, fuerza iónica y/o solvente eficaz para producir un emparejamiento específico de secuencia entre un oligonucleótido monocatenario y su cadena de ácidos nucleicos de secuencia complementaria, para un oligonucleótido de longitud dada. Dichas condiciones son, preferentemente, lo suficientemente rigurosas para evitar o evitar en gran medida la hibridación de dos cadenas casi complementarias que tienen uno o más errores de emparejamiento de base internos. En algunas modalidades, la región de identidad entre dos secuencias que forman un dúplex específico de base es mayor de aproximadamente 5 pb. En otras modalidades, la región de identidad es mayor de 10 pb.

"Ácido nucleico de captura", "oligonucleótido de captura", "y ácido nucleico de captura inmovilizado", como se usa en la presente, se refiere a una secuencia de ácido nucleico unida a un monolito. En general, la secuencia de un ácido nucleico de captura es complementaria a una de las secuencias de hibridación diferentes (por ejemplo, a_1, b_1, c_1, etcétera) de las etiquetas de ácido nucleico y, por lo tanto, permite la división específica de secuencia de una población de moléculas de ácido nucleico etiquetadas en una pluralidad de subpoblaciones de moléculas de ácido nucleico etiquetadas diferentes en recipientes separados.

"Sitio de reacción química", como se usa en la presente, se refiere a un componente químico de una etiqueta de ácido nucleico capaz de formar una variedad de enlaces químicos, lo que incluye, pero no se limita a; amida, éster, urea, uretano, enlaces carbono-carbonilo, enlaces carbono-nitrógeno, enlaces simples carbono-carbono, enlaces olefina, enlaces tioéter y enlaces disulfuro.

"Biblioteca combinatoria", como se usa en la presente, se refiere a una biblioteca de moléculas que contienen un gran número, típicamente entre 10^3 y 10^{15} o más compuestos diferentes caracterizados típicamente por secuencias de subunidades diferentes, o una combinación de diferentes grupos funcionales de cadenas laterales y enlaces.

"DAEM", como se usa en la presente, se refiere a metacrilato de 2(dimetilamino)etilo.

"DEGDMA", como se usa en la presente, se refiere a dimetacrilato de dietilenglicol.

"Depsipéptido", como se usa en la presente, se refiere a un péptido como se define en la presente descripción donde uno o más de los enlaces amida se reemplazan por enlaces éster.

"Compuestos de moléculas pequeñas de secuencias diferentes" se refiere a moléculas orgánicas pequeñas, que típicamente, pero no necesariamente, tienen una estructura parental común, tal como una estructura de anillo, y una pluralidad de grupos sustituyentes R diferentes o modificaciones de la estructura del anillo, cada uno de los cuales toma una variedad de formas, por ejemplo, diferentes grupos R. Dichos compuestos son usualmente no oligoméricos (es decir, no consisten en secuencias de subunidades similares que se repiten) y pueden ser similares en términos de estructura básica y grupos funcionales, pero varían en aspectos tales como la longitud de la cadena, el tamaño o número de anillos, o los patrones de sustitución.

"EDMA", como se usa en la presente, se refiere a dimetacrilato de etilenglicol.

"Recombinación genética de etiquetas de ácidos nucleicos", como se usa en la presente, se refiere a la formación de quimeras de etiquetas de ácidos nucleicos derivadas a partir de compuestos que tienen una o más actividades deseadas. Las quimeras pueden formarse por recombinación genética, después de ciclos repetidos de enriquecimiento y síntesis gradual, amplificación por PCR y síntesis gradual, digestión escalonada, reformación y síntesis gradual, para producir una subpoblación altamente enriquecida de etiquetas de ácido nucleico que se unen a compuestos que tienen una o más actividades deseadas.

"GMA", como se usa en la presente, se refiere a metacrilato de glicidilo.

"HEMA", como se usa en la presente, se refiere a metacrilato de 2-hidroxietilo.

"Hidratos" se refiere a la incorporación de agua en la red cristalina de un compuesto descrito en la presente descripción, en proporciones estequiométricas, lo que resulta en la formación de un aducto. Los métodos para obtener hidratos incluyen, entre otros, el almacenamiento en una atmósfera que contiene vapor de agua, formas de dosificación que incluyen agua o etapas de procesamiento farmacéutico de rutina tales como, por ejemplo, la cristalización (es decir, a partir de agua o solventes acuosos mixtos), liofilización, granulación húmeda, recubrimiento de película acuosa o secado por pulverización. Los hidratos pueden formarse, además, en ciertas circunstancias, a partir de solvatos cristalinos después de la exposición al vapor de agua, o al suspender el material anhidro en agua. Los hidratos pueden cristalizar, además, en más de una forma, lo que da como resultado un polimorfismo de hidratos. Ver, por ejemplo, (Guillory, K.,

Capítulo 5, pp. 202-205 en Polymorphism in Pharmaceutical Solids, (Brittain, H. ed.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, 1999). Los métodos anteriores para preparar hidratos están muy dentro del ámbito de los expertos en la técnica, son completamente convencionales y no requieren ninguna experimentación más allá de lo que es típico en la técnica. Los hidratos pueden caracterizarse y/o analizarse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, difracción de rayos X de cristal único, difracción de rayos X de polvo, microscopía óptica de polarización, microscopía térmica, termogravimetría, análisis térmico diferencial, calorimetría diferencial de barrido, espectroscopía IR, espectroscopía Raman y espectroscopía RMN. (Brittain, H., Capítulo 6, pp. 205-208 en Polymorphism in Pharmaceutical Solids, (Brittain, H. ed.), Marcel Dekker, Inc. Nueva York, 1999). Además, muchas compañías comerciales ofrecen habitualmente servicios que incluyen la preparación y/o la caracterización de hidratos tales como, por ejemplo, HOLODIAG, Pharmaparc II, Voie de l'Innovation, 27 100 Val de Reuil, Francia (http://www.holodiag.com).

"Ligando", como se usa en la presente, se refiere a un oligonucleótido, ARN monocatenario, ADN monocatenario, una proteína de unión a ADN, una proteína de unión a ARN, un ácido nucleico peptídico, un péptido, un depsipéptido, un polipéptido, un anticuerpo, un peptoide, un polímero, un polisiloxano, un compuesto inorgánico de peso molecular mayor de 50 daltons, un compuesto orgánico de peso molecular entre aproximadamente 1.000 daltons y aproximadamente 50 daltons o sus combinaciones.

"Enlazador", como se usa en la presente, es cualquier molécula o sustancia que realiza la función de unir el monolito al compuesto de reconocimiento. Un enlazador puede variar en estructura y longitud. El enlazador puede ser hidrófobo o hidrófilo, largo o corto, rígido, semirrígido o flexible, etcétera. El grupo de enlace puede comprender, por ejemplo, una cadena de polimetileno, tal como una cadena $-(CH_2)_n-$ o una cadena de poli(etilenglicol), tal como una cadena $-(CH_2CH_2O)_n$, donde en ambos casos n es un número entero de 1 a aproximadamente 20, 5'-O-dimetoxitritil-1',2'-dideoxirribosa-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita; 9-O-dimetoxitritil-trietilenglicol,1-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita; 3-(4,4'-dimetoxitritiloxi)propil-1-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita; y 18-O-dimetoxitritilhexaetilenglicol,1,-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita, enlazadores amino-carboxílicos (por ejemplo, péptidos (por ejemplo, Z-Gly-Gly-Gly-Osu o Z-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Osu), PEG (por ejemplo, Fmoc-aminoPEG2000-NHS o amino-PEG (12-24)-NHS), o cadenas de ácido alcano (por ejemplo, ácido-Osu Boc-ε-aminocaproico)), enlazadores de química clic (por ejemplo, péptidos (por ejemplo, azidohomalanina-Gly-Gly-Gly-OSu o propargilglicina-Gly-Gly-Gly-OSu), PEG (por ejemplo, azido-PEG-NHS), o cadenas ácidas de alcano (por ejemplo, ácido 5-azidopentanoico, (S)-2-(azidometil)-1-Boc-pirrolidina, o éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 4-azido-butan-1-oico)), enlazadores reactivos al tiol (por ejemplo, PEG (por ejemplo, SM(PEG)n NHS-PEG-maleimida), cadenas de alcano (por ejemplo, ácido Osu 3-(piridin-2-ildisulfanil)-propiónico o sulfosuccinimidil 6-(3'-[2-piridilditio]propionamido(hexanoato))), amiditas para la síntesis de oligonucleótidos (por ejemplo, modificadores de amino (por ejemplo, 6-(trifluoroacetilamino)-hexil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita), modificadores de tiol (por ejemplo, S-tritil-6-mercaptohexil-1-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita, o modificadores de química clic (por ejemplo, 5-hexinil-$TTT(T)_{0-7}$, 6-hexinil-$TTT(T)_{0-7}$, 5-hexin-1-il-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita, 6-hexin-1-il-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita, 3-dimetoxitritiloxi-2-(3-(3-propargiloxipropanamido)propanamido)propil-1-O-succinoilo, alquilamino de cadena larga CPG o éster N-hidroxisuccinimida del ácido 4-azido-butan-1-oico)).

“Iniciador”, como se usa en la presente, se refiere a cualquier generador de radicales libres capaz de iniciar la polimerización de monómeros de monovinilo o monómeros de polivinilo por medio de iniciación térmica, foto o redox. “MAA”, como se usa en la presente, se refiere al ácido metacrílico.

"MAETA", como se usa en la presente, se refiere a cloruro de [2-(metacriloxi)etil]trimetil amonio.

"γ-MAPS", como se usa en la presente, se refiere a metacrilato de 3-(trimetoxisilil)propilo.

"Monolito", como se usa en la presente, se refiere a una fase estacionaria continua (es decir, un solo material continuo (por ejemplo, una matriz base de polímero o sílice) que contiene grandes poros o canales interconectados que permiten altas tasas de flujo de fases móviles a presión moderada.

"Medio monolítico", como se usa en la presente, se refiere a un empaquetamiento de partículas agregadas que tiene una presión de columna más baja significativamente que la esperada sobre la base del tamaño de partícula.

"NBE", como se usa en la presente, se refiere a norborn-2-eno.

"Unión no específica", como se usa en la presente con respecto a un "monolito no específico", se refiere a la unión de ácido nucleico que no depende de la secuencia de ácido nucleico aplicada al monolito. Los materiales ilustrativos para la unión no específica incluyen materiales de intercambio iónico, que son eficaces para capturar de manera no específica moléculas etiquetadas con ácido nucleico a una fuerza iónica y liberar las moléculas etiquetadas con ácido nucleico, después de la reacción de la molécula, a una fuerza iónica superior.

"Ácido nucleico", como se usa en la presente, se refiere a un análogo de oligonucleótido como se define más abajo, así como también a una molécula de ADN y ARN bicatenaria. Una molécula de ADN y ARN puede incluir los diversos análogos definidos más abajo.

"Síntesis dirigida por la etiqueta de ácido nucleico" o "síntesis dirigida por la etiqueta" o "traducción química", como se usa en la presente, se refiere a la síntesis de una pluralidad de compuestos basada en las secuencias de hibridación encadenadas de las etiquetas de ácido nucleico de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción.

"Etiqueta de ácido nucleico", "soporte de ácido nucleico", "etiquetas de ácido nucleico que dirigen la síntesis", y "etiqueta de ADN", como se usa en la presente, significan las secuencias de ácido nucleico que comprenden cada una al menos (i) una primera secuencia de hibridación diferente, (ii) una segunda secuencia de hibridación diferente, y (iii) un sitio de reacción química. "Secuencias de hibridación" se refiere a oligonucleótidos que comprenden entre aproximadamente 3 y hasta 50, y típicamente de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 subunidades de ácido nucleico. Dichas "etiquetas de ácido nucleico" son capaces de dirigir la síntesis de la biblioteca combinatoria basada en las secuencias de hibridación encadenadas.

"Oligonucleótidos" u "oligos", como se usa en la presente, se refiere a oligómeros de ácido nucleico que contienen entre aproximadamente 3 y hasta aproximadamente 50, y típicamente de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 subunidades de ácido nucleico. En el contexto de los oligos (por ejemplo, secuencia de hibridación) que dirigen la síntesis de compuestos de la biblioteca, los oligos pueden incluir o componerse de residuos de nucleótidos de origen natural, residuos de análogos de nucleótidos u otras subunidades capaces de formar emparejamiento de bases específicas de secuencia, cuando se ensamblan en un polímero lineal, siempre y cuando el polímero sea capaz de proporcionar un sustrato adecuado para la polimerización dirigida a la cadena en presencia de una polimerasa y uno o más trifosfatos de nucleótido, por ejemplo, desoxirribonucleótidos convencionales. Un "oligo de secuencia conocida" es un oligo cuya secuencia de ácido nucleico se conoce.

"Análogo de oligonucleótido", como se usa en la presente, se refiere a un ácido nucleico que se ha modificado y que es capaz de realizar algunas o todas las actividades químicas o biológicas del oligonucleótido a partir del cual se derivó. Un análogo de oligonucleótido contendrá generalmente enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, se incluyen análogos de oligonucleótido que pueden tener cadenas principales alternativas. Las modificaciones de la cadena principal de ribosa-fosfato pueden facilitar la adición de restos adicionales, tales como etiquetas, o pueden realizarse para aumentar la estabilidad y la vida media de dichas moléculas. Además, pueden prepararse mezclas de ácidos nucleicos de origen natural y análogos. Alternativamente, pueden prepararse mezclas de diferentes análogos de ácidos nucleicos, y mezclas de ácidos nucleicos de origen natural y análogos. Los oligonucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, según se especifique, o contener porciones tanto de secuencia bicatenaria como monocatenaria. El oligonucleótido puede ser ADN, ARN o un híbrido, donde el ácido nucleico contiene cualquier combinación de desoxiribo y ribonucleótidos, y cualquier combinación de bases, lo que incluye uracilo, uridina, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina, isoguanina, etcétera.

"Péptido", como se usa en la presente, se refiere a un polímero de residuos de aminoácidos entre aproximadamente 2 y 50 residuos de aminoácidos, entre aproximadamente 2 y 20 residuos de aminoácidos, o entre aproximadamente 2 y 10 residuos. Los péptidos incluyen péptidos modificados tales como, por ejemplo, glucopéptidos, péptidos PEGilados, lipopéptidos, péptidos conjugados con ligandos orgánicos o inorgánicos, péptidos que contienen isósteres de enlaces peptídicos (por ejemplo, $\psi[CH_2S]$, $\psi[CH_2NH_2]$, $\psi[NHCO]$, $\psi[COCH_2]$, $\psi[(E)$ o (Z) $CH=CH]$, etcétera e incluyen además péptidos cíclicos. En algunas modalidades, los residuos de aminoácidos pueden ser cualquier residuo L-α-aminoácido, D-α-amino, variantes N-alquilo de estos o sus combinaciones. En otras modalidades, los residuos de aminoácidos pueden ser cualquier residuo L-α-aminoácido, D-α-amino, β-aminoácidos, γ-aminoácidos, variantes N-alquilo de estos o sus combinaciones.

"Unido operativamente", como se usa en la presente, se refiere a al menos dos grupos químicos o estructuras que se enlazan entre sí. Por ejemplo, un oligonucleótido puede unirse covalentemente mediante un enlazador a un ligando o a un sitio de reacción química. En algunas modalidades, los grupos o estructuras pueden permanecer unidos entre sí mediante diversas manipulaciones, tales como, por ejemplo, las etapas de un proceso.

"Ácido nucleico peptídico", como se usa en la presente, se refiere a análogos de oligonucleótidos en los que la cadena principal de azúcar-fosfato de los ácidos nucleicos se ha reemplazado por una cadena principal de péptidos (por ejemplo, N-(2-aminoetil)glicina) (Nielsen y otros, Patente de Estados Unidos Núm. 5.539.082; Nielsen y otros, Patente de Estados Unidos Núm. 5.773.571.; Burchardt y otros, Patente de Estados Unidos Núm. 6.395.474).

"Peptoide", como se usa en la presente, se refiere a polímeros de glicina poli-N-sustituida (Simon y otros, Proc. Natl Acad Sci. (1992) 89(20) 9367-9371) e incluye variantes cíclicas de estos.

"Polipéptido", como se usa en la presente, se refiere a un polímero de residuos de aminoácidos que comprende típicamente más de 50 residuos de aminoácidos e incluye variantes cíclicas de estos. El término polipéptido incluye proteínas (lo que incluye proteínas modificadas, tales como glicoproteínas, proteínas PEGiladas, lipoproteínas, conjugados de polipéptidos con ligandos orgánicos o inorgánicos, etcétera) receptor, fragmentos de receptor, enzimas, proteínas estructurales (por ejemplo, colágeno) etcétera. En algunas modalidades, los residuos de aminoácidos pueden ser cualquier residuo L-α-aminoácido, D-α-amino, o sus combinaciones. En otras modalidades, los residuos de aminoácidos pueden ser cualquier residuo L-α-aminoácido, D-α-amino, variantes N-alquilo de estos o sus combinaciones.

"Polímero" incluye copolímero, y el término "monómero" incluye comonómero. Los polímeros incluyen, por ejemplo, poliamidas, fosfolípidos, policarbonatos, polisacáridos, poliuretanos, poliésteres, poliureas, poliacetatos, poli(sulfuros de arileno), polietileniminas, poliimidas, etcétera.

"Porógeno" o "solvente porogénico", como se usa en la presente, se refiere a un solvente capaz de formar poros en una matriz polimérica durante la polimerización de esta, e incluye, pero no se limita a, un hidrocarburo alifático, un hidrocarburo aromático, un éster, una amida, un alcohol, una cetona, un éter, una solución de polímero soluble, y sus combinaciones.

"Compuesto de reconocimiento", como se usa en la presente, se refiere a un oligonucleótido, ARN monocatenario, ADN monocatenario, una proteína de unión a ADN, una proteína de unión a ARN, un ácido nucleico peptídico, un péptido, un depsipéptido, un polipéptido, un anticuerpo, un peptoide, un polímero, un polisiloxano, un compuesto inorgánico de peso molecular mayor de 50 daltons, un compuesto orgánico de peso molecular entre aproximadamente 1.000 daltons y aproximadamente 50 daltons o sus combinaciones.

"Sal" se refiere a una sal de un compuesto, que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto original. Dichas sales incluyen: (1) sales de adición ácidas, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares; o formadas con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil) benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etano-disulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido camforsulfónico, ácido 4-metilbiciclo[2.2.2]-oct-2-ene-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido lauril sulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico, y similares; o (2) sales formadas cuando un protón acídico presente en el compuesto original se reemplaza por un ion metálico, por ejemplo, un ión de metales alcalinos, un ión alcalinotérreo, o un ión de aluminio; o coordina con una base orgánica tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metilglucamina y similares. En algunas modalidades, las sales pueden formarse cuando un protón ácido presente puede reaccionar con bases inorgánicas (por ejemplo, hidróxido de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, etcétera) y bases orgánicas (por ejemplo, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina, etcétera). En algunas modalidades, la sal es aceptable farmacéuticamente.

"Solvatos" se refiere a la incorporación de solventes en la red cristalina de un compuesto descrito en la presente descripción, en proporciones estequiométricas, lo que da como resultado la formación de un aducto. Los métodos para preparar solvatos incluyen, pero no se limitan a, almacenamiento en una atmósfera que contiene un solvente, formas de dosificación que incluyen el solvente, o etapas de procesamiento farmacéutico rutinarios tales como, por ejemplo, cristalización (por ejemplo, a partir de solventes o solventes mixtos) difusión de vapor, etcétera. Los solvatos pueden formarse, además, en ciertas circunstancias, a partir de otros solvatos o hidratos cristalinos después de la exposición al solvente o después de suspender el material en el solvente. Los solvatos pueden cristalizar en más de una forma, lo que da como resultado un polimorfismo de solvato. Ver por ejemplo, (Guillory, K., Capítulo 5, pp. 205-208 en Polymorphism in Pharmaceutical Solids, (Brittain, H. ed.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, 1999)). Los métodos anteriores para preparar solvatos están muy dentro del ámbito de los expertos en la técnica, son completamente convencionales, no requieren ninguna experimentación más allá de lo que es típico en la técnica. Los solvatos pueden caracterizarse y/o analizarse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, difracción de rayos X de cristal único, difracción de rayos X en polvo, microscopía óptica de polarización, microscopía térmica, termogravimetría, análisis térmico diferencial, calorimetría diferencial de barrido, espectroscopía IR, espectroscopía Raman y espectroscopía RMN. (Brittain, H., Capítulo 6, pp. 205-208 en Polymorphism in Pharmaceutical Solids, (Brittain, H. ed.), Marcel Dekker, Inc. Nueva York, 1999). Además, muchas empresas comerciales ofrecen habitualmente servicios que incluyen la preparación y/o caracterización de solvatos tales como, por ejemplo, HOLODIAG, Pharmaparc II, Voie de l'Innovation, 27 100 Val de Reuil, Francia (http://www.holodiag.com).

"Selección para una actividad deseada", como se usa en la presente, es cualquier procedimiento bioquímico que segrega moléculas más convenientes a partir de moléculas menos convenientes basado en las propiedades físicas de la molécula. Como tal, incluye la segregación física de compuestos que exhiben una propiedad deseada de una mezcla heterogénea de moléculas. Los ejemplos incluyen la purificación por afinidad de ligandos de mezclas mediante la unión a una proteína objetiva inmovilizada, o el aislamiento de sustratos de enzimas a partir de mezclas mediante la unión mediada por enzimas de un mango de afinidad, etcétera.

"SPMA", como se usa en la presente, se refiere a metacrilato de 3-sulfopropilo.

"TRIM", como se usa en la presente, se refiere a trimetacrilato de trimetilolpropano.

"Compuestos etiquetados", "compuestos etiquetados con ADN" o "compuestos etiquetados con ácido nucleico" se usan para referirse a compuestos que contienen (a) etiquetas únicas de ácido nucleico, cada etiqueta única de ácido nucleico de cada compuesto incluye al menos una y, preferentemente, dos o más secuencias de hibridación diferentes encadenadas, en donde las secuencias de hibridación son capaces de unirse específicamente a secuencias de ácido

nucleico de captura inmovilizadas complementarias, y (b) un resto de reacción químicamente reactivo que puede incluir un precursor del compuesto, un compuesto sintetizado parcialmente o un compuesto completado. Un compuesto etiquetado con ácido nucleico en el que el resto químicamente reactivo es un compuesto de síntesis completa se denomina, además, compuesto etiquetado con ácido nucleico

Monolitos con compuestos de reconocimiento unidos y matrices de estos

Los monolitos son medios porosos continuos integrados sin huecos entre partículas que se han usado típicamente como soportes cromatográficos (por ejemplo, Ueki y otros, Anal. Chem. (2004) 76, 7007-7012; Ueki y otros, J. Chromatography A (2006) 1106, 106-111; Saburadin y otros, Analytica Chimica Acta (2012) 736 108-114; Shu y otros, J. Chromatography A (2011) 1218 5288-5234; Lubbad y otros, J. Chromatography A (2011) 1218 8897-8902; Lubbad y otros, J. Chromatography A (2011) 1218 2362-2367). Los monolitos, en general, son cualquier estructura de cuerpo único que contiene células o canales repetidos interconectados, que se caracterizan por una porosidad definida y que soportan interacciones entre la fase sólida y la fase móvil circundante. Las fases móviles son forzadas a través de los medios monolíticos porosos, lo que da como resultado un flujo convectivo y una transferencia de masa mejorada. Los monolitos pueden basarse en polímeros (es decir, orgánicos), sílice, híbridos orgánicos-sílice, inorgánicos, criogeles y agarosa, y los dos primeros tipos son los más predominantes.

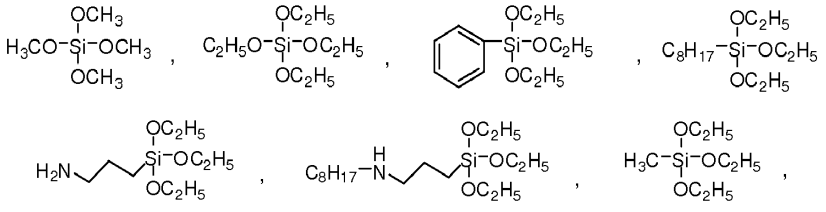
En la presente descripción, en el sentido más amplio, se proporcionan monolitos con compuestos de reconocimiento unidos y matrices de estos. En un aspecto, se proporcionan monolitos con compuestos de reconocimiento unidos que se unen selectivamente a ligandos. En algunas modalidades, los monolitos son porosos. En otras modalidades, los monolitos incluyen un grupo ionizable. En algunas de estas modalidades, los compuestos de reconocimiento se unen iónicamente a los monolitos. En otra de estas modalidades, los compuestos de reconocimiento se unen covalentemente a los monolitos.

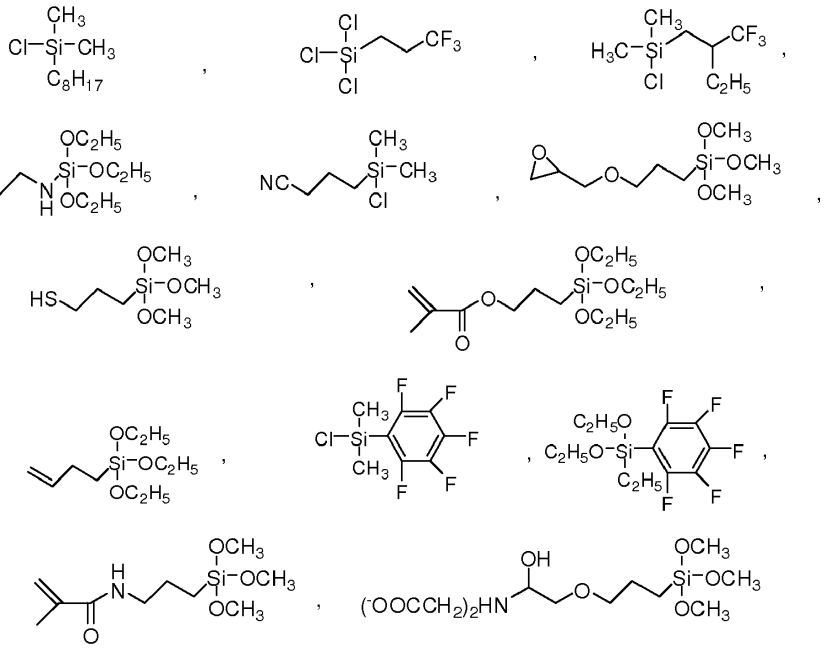
En algunas modalidades, los compuestos de reconocimiento son oligonucleótidos, ARN monocatenario, ADN monocatenario, proteínas de unión a ADN, proteínas de unión a ARN, ácidos nucleicos peptídicos, péptidos, depsipéptidos, polipéptidos, anticuerpos, peptoides, polímeros, polisiloxanos, compuestos inorgánicos de peso molecular mayor de 50 daltons, compuestos orgánicos de peso molecular entre aproximadamente 3.000 daltons y aproximadamente 50 daltons o sus combinaciones. En otras modalidades, los ligandos son oligonucleótidos, ARN monocatenario, ADN monocatenario, proteínas de unión a ADN, proteínas de unión a ARN, ácidos nucleicos peptídicos, péptidos, depsipéptidos, polipéptidos, anticuerpos, peptoides, polímeros, polisiloxanos, compuestos inorgánicos de peso molecular mayor de 50 daltons, compuestos orgánicos de peso molecular entre aproximadamente 3.000 daltons y aproximadamente 50 daltons o sus combinaciones. En aún otras modalidades, los compuestos de reconocimiento son oligonucleótidos, ARN monocatenario, ADN monocatenario, proteínas de unión a ADN, proteínas de unión a ARN, ácidos nucleicos peptídicos, péptidos, depsipéptidos, polipéptidos, anticuerpos, peptoides, compuestos orgánicos de peso molecular entre aproximadamente 3.000 daltons y aproximadamente 50 daltons o sus combinaciones y los ligandos son ADN monocatenario, ARN monocatenario, péptidos, depsipéptidos, polipéptidos, anticuerpos, peptoides, compuestos orgánicos de peso molecular entre aproximadamente 3.000 daltons y aproximadamente 50 daltons o sus combinaciones.

En algunas modalidades, los compuestos de reconocimiento son oligonucleótidos, ARN monocatenario, ADN monocatenario, proteínas de unión a ADN, proteínas de unión a ARN, ácidos nucleicos peptídicos o sus combinaciones. En otras modalidades, los ligandos son ADN monocatenario, ARN monocatenario o sus combinaciones. En aún otras modalidades, los compuestos de reconocimiento son oligonucleótidos, ARN monocatenario, ADN monocatenario, proteínas de unión a ADN, proteínas de unión a ARN, ácidos nucleicos peptídicos o sus combinaciones y los ligandos son ADN monocatenario, ARN monocatenario o sus combinaciones.

En algunas modalidades, los compuestos de reconocimiento son proteínas de unión a ADN proteicas tales como el represor lac, el represor trp, el represor lambda, el represor arc o las variantes modificadas por ingeniería genética de estos represores con una nueva especificidad de unión al ADN y los ligandos son ADN bicatenario. En aún otras modalidades, los compuestos de reconocimiento son nucleasas específicas de sitio tales como meganucleasas de la familia CreI o nucleasas TALEN que carecen de actividad nucleasa pero que retienen propiedades de reconocimiento de ADN específicas de secuencia.

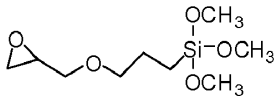
En algunas modalidades, el monolito se forma a partir de copolímeros de sílice. En otras modalidades, los copolímeros de sílice incluyen un monómero seleccionado del grupo que consiste en





o sus combinaciones.

Los monolitos basados en sílice pueden prepararse mediante hidrólisis y policondensación de alcoxisilanos, catalizadas por ácido, en presencia de un porógeno. Después de calentar y secar, la red sol-gel puede derivarse por silación. Los grupos funcionales apropiados para la unión de compuestos de reconocimiento pueden introducirse en el monolito de sílice mediante la incorporación directa de monómeros funcionalizados en el proceso de fabricación o mediante la modificación del monolito de sílice. Por ejemplo,



puede funcionalizarse, como se describe más abajo para los monolitos de polímeros GMA-co-EDMA. Otro monolito de sílice que puede ser útil para practicar los métodos descritos en la presente descripción es el poli(p-metilestireno-co-bis(p-vinilbencil)dimetilsilano (Wieder y otros, J. Chromatography A (2008) 1191 252-263).

Se prefiere usualmente la modificación del monolito de sílice, ya que un cambio en la funcionalidad química no requiere la optimización de las propiedades físicas de un nuevo monolito. Aquí, los monolitos de sol-gel se modifican químicamente mediante silación con organoclorosilano o reactivos de organoalcoxisilano, tales como algunos de los monómeros mostrados anteriormente. Los grupos funcionales en el monolito de sílice pueden funcionalizarse directamente con compuestos de reconocimiento, por ejemplo, mediante la formación de enlaces éter, éster o amida, si el compuesto de reconocimiento contiene funcionalidad complementaria. En algunas modalidades, puede usarse la cicloadición de grupos funcionales complementarios (por ejemplo, azida y acetileno; dieno y olefina deficiente en electrones) o la química clic (Evans, RA, Australian J. of Chemistry, 60 (6): 384-395 (2007) para unir el compuesto de reconocimiento al monolito. Alternativamente, puede unirse un enlazador bifuncional a los grupos funcionales del monolito de sílice y al compuesto de reconocimiento unido covalentemente al monolito mediante la formación de un enlace amida, carbamato, éster, urea, uretano, carbono-nitrógeno, carbono-carbono, éter, tioéter o disulfuro con un grupo funcional complementario en el enlazador bifuncional. En algunas modalidades, puede usarse la cicloadición de grupos funcionales complementarios (por ejemplo, azida y acetileno; dieno y olefina deficiente en electrones) o la química clic para unir el enlazador unido covalentemente al monolito al compuesto de reconocimiento.

Además, los compuestos de reconocimiento pueden funcionalizarse con un enlazador, el que contiene grupos funcionales capaces de reaccionar con los grupos funcionales en el monolito de sílice. Como anteriormente, un compuesto de reconocimiento unido a un enlazador puede unirse covalentemente al monolito mediante la formación de un enlace amida, carbamato, éster, urea, uretano, carbono-nitrógeno, carbono-carbono, éter, tioéter o disulfuro con un grupo funcional complementario en el enlazador. En algunas modalidades, puede usarse la cicloadición de grupos funcionales complementarios (por ejemplo, azida y acetileno; dieno y olefina deficiente en electrones) o la química clic para unir el monolito al enlazador unido covalentemente al compuesto de reconocimiento.

En algunas modalidades, el monolito es un híbrido de sílice orgánico-inorgánico que combina las ventajas de los monolitos inorgánicos y los monolitos orgánicos (es decir, estabilidad mecánica y estructural en solvente orgánico y fácil funcionalización). Dichos monolitos pueden prepararse a partir de silano que se ha modificado para tener un grupo funcional orgánico como parte de su estructura.

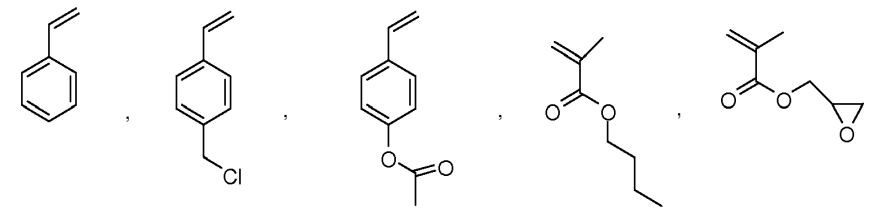
En algunas modalidades, el monolito puede ser un monolito inorgánico tal como, por ejemplo, un monolito de zirconio, hafnio o titanio (Hoth y col., J. Chromatogr. A, (2005) 392; Randon y otros, J. Chromatogr. A, (2006) 19; Rivera y otros, Analista, (2009), 31; Kubo y otros, Mater. Let., (2010) 177; Konishi y otros, J. Chromatogr. A, (2009) 7375). Los monolitos inorgánicos anteriores son resistentes a extremos de pH y temperatura que pueden ser problemáticos con los monolitos de sílice y con frecuencia tienen una selectividad inusual y única. En algunas modalidades, los monolitos inorgánicos pueden funcionalizarse con compuestos de reconocimiento de la forma descrita anteriormente para los monolitos de sílice.

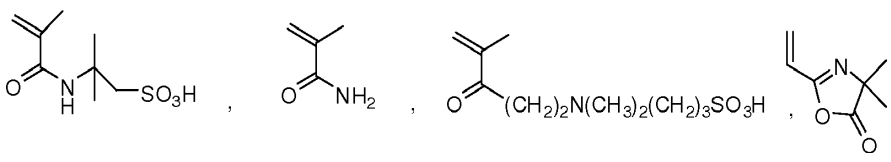
Los monolitos basados en polímeros son usualmente estructuras altamente reticuladas donde la estructura interna incluye matrices fusionadas de microglobulinas separadas por poros. La rigidez estructural de los monolitos de polímeros porosos se debe a la extensa reticulación que se encuentra típicamente en estas estructuras.

En algunas modalidades, el monolito comprende copolímeros orgánicos. En otras modalidades, el copolímero orgánico es una combinación de polímeros de monovinilo y un polímero de polivinilo. En aún otras modalidades, el copolímero orgánico es una combinación de polímeros de monovinilo y polímeros de polivinilo. En aún otras modalidades, el copolímero orgánico es un polímero de polivinilo o combinaciones de polímeros de polivinilo.

En algunas de las modalidades anteriores, el copolímero incluye un monómero de monovinilo seleccionado del grupo que consiste en vinilestireno, vinilnaftaleno, vinilantraceno y sus derivados sustituidos en el anillo en donde los sustituyentes incluyen clorometilo, alquilos con hasta 10 átomos de carbono, hidroxilo, t-butiloxicarbonilo, halógeno, grupos nitro, hidroxilos protegidos o amino, acrilamidas y metacrilamidas y sus derivados sustituidos en el átomo de nitrógeno con uno o dos alquilos C_{1-5}, alquilaminoalquilos o dialquilaminoalquilos C_{1-4}, metoxiaminoalquilos C_{1-4}, dimetoxi o dietoxiaminoalquilos C_{1-4}, metoxialquilos C_{1-4}, tetrahidropiranilo y grupos tetrahidrofurfurilo, N-acriloilpiperidina, N-acriloilpirrolidona y mezclas de estos, ésteres de ácido acrílico, ésteres de ácido metacrílico, acrilatos de alquilo, metacrilatos de alquilo, acrilatos de alquilo perfluorinados, metacrilatos de alquilo perfluorinados, acrilatos de glicidilo, acrilatos de hidroxialquilo, metacrilatos de hidroxialquilo, en donde el grupo alquilo en cada uno de los alquilos mencionados anteriormente consta de 1-10 átomos de carbono, acrilatos de sulfoalquilo, metacrilatos de sulfoalquilo, acrilatos de óxido de oligoetileno, metacrilatos de óxido de oligoetileno, derivados de acrilato y metacrilato lo que incluye amina primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, epóxido y funcionalidades zwiteriónicas, vinilpiridinas, vinilacetato, vinilpirrolidona, vinilazalactona o sus combinaciones. En otras modalidades, los monómeros de monovinilo incluyen, pero no se limitan a, estireno, vinilnaftaleno, vinilantraceno y sus derivados sustituidos en el anillo, en donde los sustituyentes incluyen clorometilo, alquilos con hasta 18 átomos de carbono, hidroxilo, t-butiloxicarbonilo, halógeno, nitro, hidroxilos protegidos, grupos amino o sus combinaciones. En aún otras modalidades, los monómeros de monovinilo incluyen, pero no se limitan a, acrilamidas, metacrilamidas y sus derivados sustituidos en el átomo de nitrógeno con uno o dos grupos alquilos C_{1-5}, alquilaminoalquilos o dialquilaminoalquilos C_{1-4}, metoxiaminoalquilos C_{1-4}, dimetoxi o dietoxiaminoalquilos C_{1-4}, metoxialquilos C_{1-4}, tetrahidropiranilo y tetrahidrofurfurilo, N-acriloilpiperidina y N-acriloilpirrolidona o sus combinaciones. En aún otras modalidades, el monómero de monovinilo puede seleccionarse, además, del grupo que consiste en ésteres de ácido acrílico y metacrílico, acrilatos de alquilo, metacrilatos de alquilo, acrilatos de alquilo perfluorados, metacrilatos de alquilo perfluorados, acrilatos de hidroxialquilo, metacrilatos de hidroxialquilo, en donde el grupo alquilo en cada uno de los alquilos mencionados anteriormente consiste de 1-10 átomos de carbono, acrilatos de sulfoalquilo, metacrilatos de sulfoalquilo, acrilatos de óxido de oligoetileno, metacrilatos de óxido de oligoetileno y derivados de acrilato y metacrilato, lo que incluye amina primaria, secundaria, terciaria y cuarternaria, epóxido y funcionalidades zwitteriónicas, acetato de vinilo, vinilpirrolidona, vinilazlactona y sus combinaciones.

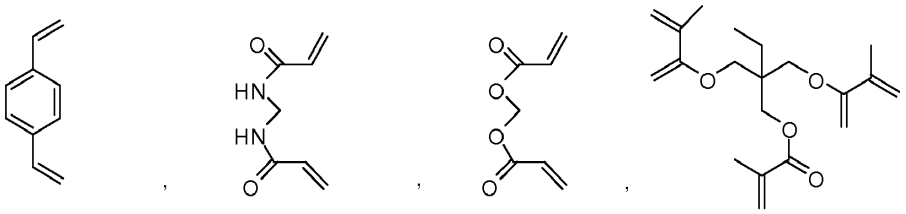
En algunas modalidades, el copolímero incluye un monómero de monovinilo seleccionado del grupo que consiste en





y sus combinaciones.

En algunas modalidades, el monómero de polivinilo es un diacrilato de alquileno, diacrilamida de alquileno, dimetacrilato de alquileno, diacrilamida de alquileno, dimetacrilamida de alquileno, diacrilato de alquileno, dimetacrilato de hidroxialquileno, en donde el grupo alquileno en cada uno de los monómeros de alquileno mencionados anteriormente consiste de 1-10 átomos de carbono, diacrilato de oligoetilenglicol, dimetacrilato de oligoetilenglicol, ésteres de vinilo del ácido policarboxílico, divinilbenceno, divinilnaftaleno, dimetacrilato de pentaeritol, triacrilato de pentaeritritol, tetrametacrilato de pentaeritol, diacrilato de pentaeritritol, triacrilato de pentaeritritol, tetraacrilato de pentaeritritol, triacrilato de trimetilopropano, acrilatos de trimetilopropano o sus combinaciones. En otras modalidades, el monómero de polivinilo se selecciona del grupo que consiste en



y sus combinaciones.

Los monolitos poliméricos se fabrican generalmente a partir de una mezcla que incluye un iniciador de radicales libres y monómeros (lo que incluye al menos un monómero de polivinilo) disueltos en al menos un porógeno. Los solventes porogénicos típicos incluyen solventes orgánicos comunes, tales como, por ejemplo, tetrahidrofurano, acetonitrilo, tolueno, clorobenceno, hexano, metanol, dimetilformamida, ciclohexanol, dodecanol, CO_2 supercrítico, éter, etcétera. La formación del monolito se desencadena por la ruptura de un iniciador (por ejemplo, AIBN, TEMPO, APS, TMED, etcétera) en un radical libre por una fuente externa (por ejemplo, fotoiniciación, calor, etcétera) o fotoexcitación de un iniciador (por ejemplo, benzofenona) lo que induce la formación de cadenas de polímero que precipitan fuera de la mezcla de reacción y se aglomeran eventualmente para formar una estructura sólida continua. La morfología del monolito depende de numerosas variables, tales como, por ejemplo, el(los) monómero(s) de polivinilo, los monómeros de monovinilo, la temperatura, la composición y el porcentaje de los solventes porogénicos (porógenos), la concentración del iniciador de radicales libres y el método usado para iniciar la polimerización.

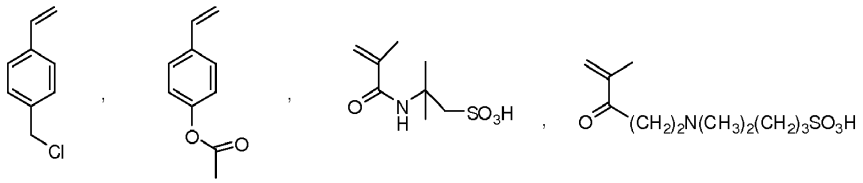
En algunas modalidades, los monolitos poliméricos se preparan al polimerizar una mezcla que incluye uno o más monómeros de polivinilo en presencia de un iniciador y un porógeno. En otras modalidades, los monolitos poliméricos se preparan al polimerizar una mezcla que incluye uno o más monómeros de polivinilo en presencia de un iniciador, un porógeno y uno o más monómeros de monovinilo. La mezcla se lava usualmente con un solvente adecuado para eliminar el porógeno y otras impurezas.

En algunas modalidades, la mezcla es uno o más monómeros de polivinilo en una cantidad de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 % en vol., aproximadamente 45 % a aproximadamente 90 % en vol. de porógenos y entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 % en vol. de iniciador. En otras modalidades, la mezcla es uno o más monómeros de polivinilo en una cantidad de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 % en vol., aproximadamente 45 % a aproximadamente 85 % en vol. de porógenos y entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 % en vol. de iniciador. En aún otras modalidades, la mezcla es uno o más monómeros de polivinilo en una cantidad de aproximadamente 20 a 40 % en vol., aproximadamente 45 a aproximadamente 80 % en vol. de porógenos y entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 % en vol. de iniciador. En aún otras modalidades, la mezcla es uno o más monómeros de polivinilo en una cantidad de aproximadamente 15 a 40 % en vol., aproximadamente 45 a aproximadamente 85 % en vol. de porógenos y entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 % en vol. de iniciador. En aún otras modalidades, la mezcla es aproximadamente 10-40 % de uno o más monómeros de monovinilo, 10 a 40 % en vol. de uno o más monómeros de polivinilo, aproximadamente 20 a aproximadamente 80 % en vol. de porógenos y entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 % en vol. de iniciador. En aún otras modalidades, la mezcla es aproximadamente 20-30 % de uno o más monómeros de monovinilo, 20 a 30 % en vol. de uno o más monómeros de polivinilo, aproximadamente 20 a aproximadamente 60 % en vol. de porógenos y entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 % en vol. de iniciador. En aún otras modalidades, la mezcla es uno o monómeros de polivinilo en una cantidad de aproximadamente 25 a 35 % en vol., aproximadamente 20 a aproximadamente 75 % en vol. de porógenos y entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 % en vol. de iniciador.

En algunas modalidades, el monolito es poli(GMA-co-EDMA), poli(HEMA-co-EDMA), poli(EDMA-co-MAA), poli(HEMA-co-EDMA-co-SPMA), poli(GMA-co-DEGDMA), poli(DAEM-co-PEGDA), poli(MAETA-co-PGDA), poli(HMA-co-EDMA), poli(LMA-co-EDMA), poli(BMA-co-EDMA), poli(ODMA-co-EDMA), poli(CMS-co-DVB), poli(GMA-co-DVB), poli(GMA-co-TRIM), poli(estireno-co-DVB), (NBE-co-(NBE-$CH_2O)_3SiCH_3$). En estas modalidades, los polímeros anteriores se fabrican mediante polimerización de GMA con EDMA, HEMA con EDMA, EDMA con MAA, HEMA con EDMA y SPMA, GMA con

DEGDMA, DAEM con PEGDA, MAETA con PGDA, HMA con EDMA, LMA con EDMA, BMA con EDMA, ODMA con EDMA, CMS con DVB, GMA con DVB, GMA con TRIM y estireno con DVB, respectivamente.

Los grupos funcionales apropiados para la unión de compuestos de reconocimiento pueden introducirse en el monolito polimérico mediante la incorporación directa de los monómeros funcionalizados en el proceso de fabricación o mediante la modificación del monolito polimérico. Algunos ejemplos de monómeros funcionalizados incluyen aquellos ilustrados a más abajo:



Se prefiere usualmente la modificación de los monolitos poliméricos, ya que un cambio en la funcionalidad química no requiere la optimización de las propiedades físicas de un nuevo monolito. Aquí, los monolitos poliméricos pueden modificarse químicamente, por ejemplo, por reacción con grupos funcionales epoxi, clorometilo, hidroxilos fenólicos y azalactona dispuestos en la superficie del monolito (Luo y otros, J. Chromatogr. A (2001) 926 255; Gusev y otros, J. Chromatogr. A (1999) 855 273; Xie, y otros, Biotechnol Bioeng. (1999) 62 30) por polimerización de monómeros funcionalizados. Los grupos funcionales en el monolito polimérico pueden reaccionar directamente con los compuestos de reconocimiento, por ejemplo, mediante la formación de enlaces éter, éster o amida, si el compuesto de reconocimiento contiene funcionalidad complementaria.

Alternativamente, puede unirse un enlazador bifuncional a los grupos funcionales del monolito polimérico y al compuesto de reconocimiento unido covalentemente al monolito mediante la formación de un enlace amida, carbamato, éster, urea, uretano, carbono-nitrógeno, carbono-carbono, éter, tioéter o disulfuro con un grupo funcional complementario en el enlazador bifuncional. En algunas modalidades, puede usarse la cicloadición de grupos funcionales complementarios (por ejemplo, azida y acetileno; dieno y olefina deficiente en electrones) o la química clic para unir el enlazador unido covalentemente al monolito al compuesto de reconocimiento.

Además, los compuestos de reconocimiento pueden funcionalizarse con un enlazador, el que contiene grupos funcionales capaces de reaccionar con los grupos funcionales en el monolito polimérico. Como anteriormente, un compuesto de reconocimiento unido a un enlazador puede unirse covalentemente al monolito mediante la formación de un enlace amida, carbamato, éster, urea, uretano, carbono-nitrógeno, carbono-carbono, éter, tioéter o disulfuro con un grupo funcional complementario en el enlazador. En algunas modalidades, puede usarse la cicloadición de grupos funcionales complementarios (por ejemplo, azida y acetileno; dieno y olefina deficiente en electrones) o la química clic para unir el monolito al enlazador unido covalentemente al compuesto de reconocimiento.

Son útiles para la unión de grupos de reconocimiento a los monolitos poliméricos los monómeros que contienen grupos oxirano, tales como, por ejemplo, GMA o derivados de estos. Los copolímeros que contienen dichos monómeros pueden tener el anillo abierto con diversos nucleófilos tales como, por ejemplo, azida, ion sulfuro, aminas, etcétera, los que pueden usarse después para reaccionar con una funcionalidad complementaria en un enlazador bifuncional, un enlazador unido a un compuesto de reconocimiento o un compuesto de reconocimiento para proporcionar en los últimos dos casos un compuesto de reconocimiento unido a un monolito. Por ejemplo, poli(GMA-co-EDMA) o poli(GMA-co-DVB) después de la reacción con ésteres activados, azida, ion sulfuro o aminas pueden reaccionar con compuestos de reconocimiento que contienen dienos, acetilenos, tioles y ésteres activados para proporcionar aductos Diels Alder, cicloaductos 1,3-dipolares, disulfuro y amidas, respectivamente. De manera similar, el poli(CMS-co-DVB) después de la reacción con azida, ion sulfuro o aminas puede reaccionar con compuestos de reconocimiento que contienen acetilenos, tioles y ésteres activados para proporcionar cicloadductos, disulfuro y amidas 1,3-dipolares, respectivamente. El poli(GMA-co-EDMA) o el poli(GMA-co-DVB) pueden hidrolizarse además a dioles, que después pueden oxidarse a aldehídos. Ambas funcionalidades anteriores pueden reaccionar con la funcionalidad complementaria en un enlazador, un enlazador unido a un compuesto de reconocimiento o un compuesto de reconocimiento, para proporcionar en los últimos dos casos un compuesto de reconocimiento unido a un monolito.

En algunas de las modalidades anteriores, el compuesto de reconocimiento es un ácido nucleico. En otras modalidades, el compuesto de reconocimiento es un oligonucleótido. En modalidades ilustrativas, el monolito de poli(GMA-co-EDMA) o poli(GMA-co-DVB) o poli(CMS-co-DVB) se hace reaccionar con azida para proporcionar un monolito que contiene una funcionalidad azida. En algunas de estas modalidades, los oligonucleótidos contienen un grupo alquinilo 5' (por ejemplo, C_3-C_{20}) que se une al extremo 5' del oligonucleótido con un enlazador (por ejemplo, PEG o poli T). En algunas de las modalidades anteriores, el oligonucleótido se unirá con química clic dependiente de Cu (I) al monolito.

En otras modalidades ilustrativas, un monolito de poli(GMA-co-EDMA) o poli(GMA-co-DVB) o poli(CMS-co-DVB) se hace reaccionar con azida para proporcionar un monolito que contiene un grupo azida. En algunas de estas modalidades, los oligonucleótidos contienen alquinos terminales, dibenzociclooctino o biciclo[6.1.0]nonino que se unen al extremo 5' del

oligonucleótido con un enlazador (por ejemplo, PEG o poli T). En algunas de las modalidades anteriores, el oligonucleótido se unirá al monolito con química clic libre de Cu.

Además, pueden usarse métodos de adición, injerto y fotoinjerto de radicales libres, para funcionalizar monolitos con funcionalidad reactiva mediante la adición de ligandos poliméricos sobre la superficie del monolito (Myer y otros, Macromolecules (2000) 3, 7769-7775; Rohr y otros, Macromolecules (2003) 36, 1677-1684.; Wang y otros, J. Chromatography A (2007) 1147, 24-29). Dichos polímeros que contienen ligando pueden aumentar sustancialmente la densidad de los grupos funcionales sobre la superficie del monolito, lo que aumenta, por lo tanto, la capacidad de unión de la superficie del monolito. El experto en la técnica apreciará que pueden usarse muchos otros métodos para funcionalizar monolitos poliméricos y unir elementos de reconocimiento a un monolito.

En algunas modalidades, poli(GMA-co-EDMA) o poli(GMA-co-DVB), después de la reacción con ésteres activados, azida, ion sulfuro o aminas, se convierten en resinas de intercambio iónico. En otras modalidades, el poli(CMS-co-DVB), después de la reacción con azida, ion sulfuro o aminas se convierte en resinas de intercambio iónico. Poli(GMA-co-EDMA) o poli(GMA-co-DVB) pueden hidrolizarse además a dioles, que después pueden oxidarse a aldehídos y después se convierten en resinas de intercambio iónico mediante la manipulación de grupos funcionales.

En algunas modalidades, el monolito poroso tiene un por ciento de porosidad de entre aproximadamente 45 % a aproximadamente 85 %. En otras modalidades, el monolito poroso tiene un por ciento de porosidad de entre aproximadamente 60 % y aproximadamente 75 %. En aún otras modalidades, la fracción de volumen de mesoporos (5 nm - 50 nm) está entre aproximadamente 30 % y aproximadamente 80 %. En aún otras modalidades, la fracción de volumen de microporos (2 nm) está entre aproximadamente 0 % y aproximadamente 10 %. En aún otras modalidades, la fracción de volumen de poros (50 nm-300 nm) está entre aproximadamente 1 % y aproximadamente 20 %. En aún otras modalidades, la fracción de volumen de flujo a través de los poros (> 300 nm) es menor de aproximadamente 40 %.

En algunas modalidades, el tamaño de poro del monolito polimérico poroso está en el intervalo de entre aproximadamente 5 nm a aproximadamente 10.000 nm. En otras modalidades, el tamaño de poro del monolito polimérico poroso está en el intervalo de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 5.000 nm. En aún otras modalidades, el tamaño de poro del monolito polimérico poroso está en el intervalo de entre aproximadamente 100 nm a aproximadamente 10.000 nm. En aún otras modalidades, el tamaño de poro del monolito polimérico poroso está en el intervalo de entre aproximadamente 50 nm a aproximadamente 700 nm.

En aún otras modalidades, el tamaño de microporo promedio del monolito es menos de aproximadamente 2 nm. En aún otras modalidades, el tamaño promedio de mesoporos del monolito está entre aproximadamente 2 nm y aproximadamente 50 nm. En aún otras modalidades, el tamaño promedio de microporos del monolito es menos de aproximadamente 2 nm, el tamaño promedio de mesoporos del monolito está entre aproximadamente 2 nm y aproximadamente 50 nm y el tamaño promedio de poros del monolito está entre aproximadamente 50 nm y aproximadamente 700 nm.

En algunas modalidades, el área superficial específica de la matriz polimérica está en el intervalo de entre aproximadamente 0,5 m^2/g a aproximadamente 1.000 m^2/g. En otras modalidades, el área superficial específica de la matriz polimérica está en el intervalo de entre aproximadamente 1 m^2/g a aproximadamente 500 m^2/g. En aún otras modalidades, el área superficial específica de la matriz polimérica está en el intervalo de entre aproximadamente 5 m^2/g a aproximadamente 200 m^2/g. En aún otras modalidades, el área superficial específica de la matriz polimérica está en el intervalo de aproximadamente 10 m^2/g a aproximadamente 100 m^2/g. En aún otras modalidades, el área superficial específica de la matriz polimérica está en el intervalo de entre aproximadamente 20 m^2/g a aproximadamente 60 m^2/g. En aún otras modalidades, el área superficial específica de la matriz polimérica está en el intervalo de entre aproximadamente 30 m^2/g a aproximadamente 50 m^2/g.

En algunas modalidades, la permeabilidad del monolito está entre aproximadamente 1 milidarcy y aproximadamente 1 x 10^4 darcy. En otras modalidades, la permeabilidad del monolito está entre aproximadamente 8,9 x 10^2 darcy y aproximadamente 8,9 x 10^4 darcy. En aún otras modalidades, la permeabilidad del monolito está entre aproximadamente 1 milidarcy y aproximadamente 1 x 10^3 darcy. En aún otras modalidades, la permeabilidad del monolito es aproximadamente 8,9 x 10^3 darcy.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, las propiedades de los monolitos que pueden ser importantes para unir o enrutar ligandos incluyen cinética de hibridación rápida de macromoléculas de ligandos grandes en solución a elementos de reconocimiento inmovilizados en el monolito, baja presión de retroceso y capacidad de unión alta del monolito con elemento de reconocimiento unido por el ligando.

En algunas modalidades, la densidad del compuesto de reconocimiento está entre aproximadamente 1 pmol/10 µl y aproximadamente 1 µmol/10 µl. En aún otras modalidades, la densidad de los compuestos de reconocimiento es de aproximadamente 1 nmol/10 µl.

En alguna modalidad, los compuestos de reconocimiento son oligonucleótidos y los ligandos son ADN monocatenario, secuencias de ARN monocatenario o sus combinaciones. En algunas de las modalidades anteriores, los oligonucleótidos tienen entre aproximadamente 10 subunidades de ácido nucleico y aproximadamente 50 subunidades de ácido nucleico.

En otra de las modalidades anteriores, los oligonucleótidos tienen entre aproximadamente 15 subunidades de ácido nucleico y aproximadamente 40 subunidades de ácido nucleico. En aún otra de las modalidades anteriores, la constante de velocidad de unión a las secuencias de ácido nucleico complementarias de los compuestos de reconocimiento está entre aproximadamente 1 x 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ y aproximadamente 1 x 10^6 $M^{-1}s^{-1}$. En aún otra de las modalidades anteriores, la constante de velocidad de unión a las secuencias de ácido nucleico complementarias de los compuestos de reconocimiento está entre aproximadamente 1 x 10^3 $M^{-1}s^{-1}$ y aproximadamente 1 x 10^6 $M^{-1}s^{-1}$. En aún otra de las modalidades anteriores, la constante de velocidad de unión a las secuencias de ácido nucleico complementarias de los compuestos de reconocimiento está entre aproximadamente 1 x 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ y aproximadamente 1 x 10^5 $M^{-1}s^{-1}$. En general, el flujo a través de monolitos, tales como aquellos descritos anteriormente, puede ser útil para la hibridación rápida y específica de ADN/ARN/ácido nucleico. En algunas modalidades, el ácido nucleico no es un homopolímero.

En algunas modalidades, el monolito es un monolito de criogel (Malik y otros, J. Sep Sci. (2006) 1686; Galaer y otros, J. Sep Sci. (2012) 1173; Arvidsson y otros, J. Chromatography A (2002) 27; Daniak y otros, J. Chromatography B (2006) 145. Los criogeles son matrices de gel formadas en presencia de soluciones moderadamente congeladas de precursores monoméricos y poliméricos que tienen una estabilidad química y física ilustrativa. Los monolitos de criogel, basados típicamente en poliacrilamida, poseen poros que son más grandes típicamente que los de otros geles, lo que los hace matrices útiles particularmente para entidades grandes tales como agregados de proteínas, fragmentos de membrana, virus, etcétera. En algunas modalidades, los compuestos de reconocimiento pueden unirse a monolitos de criogel mediante los métodos proporcionados anteriormente.

En algunas modalidades, el monolito es un monolito basado en agarosa. En otras modalidades, el monolito es un monolito basado en agarosa superporosa. En algunas de estas modalidades, el diámetro del superporo está entre aproximadamente 20 µm y aproximadamente 200 µm. En otras de estas modalidades, el volumen del superporo varía entre aproximadamente 20 % y 50 %. Los monolitos de agarosa pueden prepararse mediante el moldeo de emulsiones de agarosa (Gustavsson y otros, J. Chromatography A, (1999), 832 29-39; Gustavsson y otros, J. Chromatography A, (2000), 925 69-78).

En general, los monolitos derivados a partir de la agarosa pueden funcionalizarse con compuestos de reconocimiento por reacción con los grupos hidroxilo libres de las subunidades de D-galactosa y L-galactopiranosa alternas del polisacárido. Los grupos hidroxilo pueden funcionalizarse directamente con los compuestos de reconocimiento, por ejemplo, mediante la formación de enlaces éter, éster o carbamato si el compuesto de reconocimiento contiene una funcionalidad complementaria. Alternativamente, un enlazador bifuncional puede unirse a los grupos hidroxilo del polisacárido, y el compuesto de reconocimiento se une mediante la formación de un enlace amida, carbamato, éster, urea, uretano, carbono-nitrógeno, carbono-carbono, éter, tioéter o disulfuro o por cicloadición con un grupo funcional apropiado sobre el enlazador unido (por ejemplo, una azida, dieno u olefina deficiente en electrones) o por química clic. Además, los compuestos de reconocimiento pueden funcionalizarse con un enlazador bifuncional, el que contiene un grupo capaz de reaccionar con un compuesto hidroxilo.

En otro aspecto, se proporciona un medio monolítico. El medio monolítico incluye partículas agregadas con compuestos de reconocimiento unidos que se unen selectivamente a los ligandos. A modo de ilustración, pero sin limitación, pueden injertarse partículas de resina cargadas negativamente para proporcionar partículas de resina injertadas cargadas positivamente. Las partículas de resina injertadas cargadas positivamente se mezclan después con partículas de resina no recubiertas para formar partículas agregadas mediante unión iónica. Los compuestos de reconocimiento pueden unirse a partículas agregadas mediante una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica y las partículas agregadas pueden usarse para formar una columna. La ventaja de dicho enfoque es que la adhesión covalente o no covalente del monolito a la pared no es necesaria ya que el empaquetamiento de las partículas agregadas evita los espacios vacíos entre la superficie de la pared y el monolito.

En algunas modalidades, se proporciona una carcasa (por ejemplo, una columna o pocillo). La carcasa abarca uno o más monolitos que incluyen compuestos de reconocimiento unidos que se unen selectivamente a ligandos. En algunas modalidades, el monolito se une a la carcasa. En algunas modalidades, la carcasa une selectivamente a miembros de bibliotecas de compuestos. En algunas de estas modalidades, la biblioteca se proporciona mediante presentación de fagos, presentación de ARN o química combinatoria programable con ácidos nucleicos. En otra de estas modalidades, la biblioteca comprende ADN monocatenario, secuencias de ARN monocatenario, péptidos, depsipéptidos, polipéptidos, anticuerpos, peptoides, compuestos orgánicos de peso molecular entre aproximadamente 3.000 daltons y aproximadamente 50 daltons o sus combinaciones.

En algunas modalidades, se proporciona una carcasa (por ejemplo, una columna o pocillo) donde los compuestos de reconocimiento son oligonucleótidos, ARN monocatenario, ADN monocatenario, proteínas de unión a ADN, proteínas de unión a ARN, ácidos nucleicos peptídicos, péptidos, depsipéptidos, polipéptidos, anticuerpos, peptoides, compuestos orgánicos de peso entre aproximadamente 3.000 daltons y aproximadamente 50 daltons o sus combinaciones y los ligandos son ADN monocatenario, ARN monocatenario, péptidos, depsipéptidos, polipéptidos, anticuerpos, peptoides, compuestos orgánicos de peso molecular entre aproximadamente 3.000 daltons y aproximadamente 50 daltons o sus combinaciones. En otras modalidades, los compuestos de reconocimiento son oligonucleótidos, ARN monocatenario, ADN monocatenario, proteínas de unión a ADN, proteínas de unión a ARN, ácidos nucleicos peptídicos o sus combinaciones y los ligandos son ADN monocatenario, ARN monocatenario o sus combinaciones.

En algunas modalidades, se proporciona una carcasa (por ejemplo, una columna o pocillo) donde los compuestos de reconocimiento son oligonucleótidos y los ligandos son ADN monocatenario, secuencias de ARN monocatenario o sus combinaciones. En algunas de estas modalidades, la carcasa puede unir entre aproximadamente 0,5 fmol/µl y aproximadamente 0,4 nmol/µl de ácido nucleico monocatenario. En otra de estas modalidades, los oligonucleótidos son específicos de secuencia para los ácidos nucleicos monocatenarios. En algunas de estas modalidades, la columna enruta bibliotecas de ADN, que incluyen ligandos unidos tales como, por ejemplo, péptidos, péptidos cíclicos, triazenos y moléculas orgánicas pequeñas.

En algunas modalidades, se proporciona una carcasa (por ejemplo, una columna o pocillo) que incluye un monolito con un oligonucleótido unido que se une selectivamente a un oligonucleótido complementario unido operativamente a un sitio de reacción química o un ligando. En otras modalidades, el oligonucleótido está entre aproximadamente 10 subunidades de ácido nucleico y aproximadamente 50 subunidades de ácido nucleico. En aún otras modalidades, el oligonucleótido está entre aproximadamente 15 subunidades de ácido nucleico y aproximadamente 40 subunidades de ácido nucleico. En aún otras modalidades, la constante de velocidad de unión al oligonucleótido complementario está entre aproximadamente 1 x 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ y aproximadamente 1 x 10^6 $M^{-1}s^{-1}$. En aún otras modalidades, la constante de velocidad de unión al oligonucleótido complementario está entre aproximadamente 1 x $10^3M^{-1}s^{-1}$ y aproximadamente 1 x 10^6 $M^{-1}s^{-1}$. En aún otras modalidades, la constante de velocidad de unión al oligonucleótido complementario está entre aproximadamente 1 x 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ y aproximadamente 1 x 10^5 $M^{-1}s^{-1}$. En aún otras modalidades, el oligonucleótido complementario se une operativamente a un ligando que incluye un sitio de reacción química, donde el ligando es un péptido, un peptoide, un compuesto orgánico de peso molecular de menos de 2.000 daltons.

En algunas modalidades, la permeabilidad del monolito está entre aproximadamente 1 milidarcy y aproximadamente 1 x 10^4 darcy. En otras modalidades, la permeabilidad del monolito está entre aproximadamente 1 milidarcy y aproximadamente 1 x 10^3 darcy. En aún otras modalidades, la permeabilidad del monolito está entre aproximadamente 8,9 x 10^2 darcy y aproximadamente 8,9 x 10^4 darcy. En aún otras modalidades, la permeabilidad del monolito es aproximadamente 8,9 x 10^3 darcy. En aún otras modalidades, la columna une al oligonucleótido complementario preparativamente. En aún otras modalidades, la columna une entre aproximadamente 0,5 fmol/µl y entre aproximadamente 0,4 nmol/µl del oligonucleótido complementario. En aún otras modalidades, el oligonucleótido se une al monolito por cicloadición de un grupo azida en el monolito con un grupo alquino unido operativamente al oligonucleótido para formar un triazol 1, 2, 3.

En algunas modalidades, se proporciona una matriz que incluye dos o más columnas que incluyen un monolito con un oligonucleótido unido que se une selectivamente a un oligonucleótido complementario unido operativamente a un sitio de reacción química o un ligando, donde el nucleótido complementario es un componente de una mezcla. En otras modalidades, la matriz es un bloque que incluye dos o más pocillos, donde cada pocillo incluye una columna diferente. En otras modalidades, las columnas se unen a la(s) superficie(s) de los pocillos. En aún otras modalidades, las columnas se unen covalentemente a la superficie de los pocillos mediante la formación de un enlace amida, éster, urea, uretano, carbono-silicio, carbono-nitrógeno, carbono-carbono, éter, tioéter o disulfuro o por cicloadición. En aún otras modalidades, el bloque se compone de titanio, aluminio, acero inoxidable, metales dopados, vidrio, cuarzo, policarbonato, sílice fundida, poli(metacrilato de metilo), plásticos, poliéter éter cetona, poliéter éter cetona dopada, poliestireno dopado, copolímero de olefina cíclica, polieterimida ultem, polipropileno dopado o sus combinaciones. En aún otras modalidades, la pared interior del bloque se modifica para aumentar el área superficial de la pared. En aún otras modalidades, los pocillos están desgastados. En aún otras modalidades, los pocillos tienen roscas. En aún otras modalidades, las dimensiones del pocillo son aproximadamente 3,5 a 4 mm de diámetro interior y aproximadamente 1 a 4 mm de altura. En aún otras modalidades, los pocillos son direccionables.

En algunas modalidades, se proporciona una matriz que incluye un bloque con dos o más pocillos. En algunas modalidades, los pocillos contienen las carcasas que incluyen compuestos de reconocimiento unidos que unen selectivamente a ligandos. En otras modalidades, los monolitos se unen a las superficies de los pocillos. Los monolitos pueden unirse covalentemente a la superficie del pocillo mediante la formación de un enlace amida, éster, urea, uretano, carbono-silicio, carbono-nitrógeno, carbono-carbono, éter, tioéter o disulfuro a la superficie del pocillo. Alternativamente, la química clic o la cicloadición pueden proporcionar un cicloaducto entre la funcionalidad apropiada sobre la superficie del pocillo y los grupos en el monolito. La funcionalidad puede unirse a la superficie del pocillo, por ejemplo, mediante silación de la superficie del pocillo con un compuesto de silano funcionalizado (por ejemplo, 3-trimetoxisilil)propilmetacrilato) o por unión iónica de fosfato de metacriloiloxidecildihidrógeno. Alternativamente, la superficie del pocillo puede recubrirse con un polímero (por ejemplo, poli(metacrilato de metilo), polidimetilsiloxano, polietileno, polipropileno, poli-2-norboreno-co-etileno) y se une al monolito mediante la adición de radicales libres, iniciada, por ejemplo, por irradiación de benzofenona. En otras modalidades, los monómeros de polivinilo pueden unirse a las superficies de pocillos recubiertas con polímero durante la formación de monolitos y pueden reaccionar adicionalmente con olefinas colgantes en la superficie de monolitos para unir covalentemente el monolito a la superficie de los pocillos. En aún otras modalidades, los monolitos pueden unirse directamente al pocillo.

En algunas modalidades, el bloque comprende titanio, aluminio, acero inoxidable, metales dopados, vidrio, cuarzo, policarbonato, sílice fundida, poli(metacrilato de metilo), plásticos, poliéter éter cetona, poliéter éter cetona dopada, poliestireno dopado, polieterimida ultem, copolímero de olefina cíclica, polipropileno dopado o sus combinaciones. Los pocillos del bloque pueden modificarse para aumentar el área superficial de la pared mediante abrasión, roscado u otros

métodos conocidos por los expertos en la técnica. En algunas modalidades, las dimensiones del pocillo están entre aproximadamente 0,1 mm y aproximadamente 50 mm de diámetro y entre aproximadamente 0,1 mm de altura y aproximadamente 10 mm de altura. En otras modalidades, las dimensiones del pocillo son aproximadamente 10 mm de diámetro y aproximadamente 10 mm de altura. En aún otras modalidades, las dimensiones del pocillo son aproximadamente 3,5 a aproximadamente 4 mm de diámetro interior y aproximadamente 1 a aproximadamente 4 mm de altura. En algunas modalidades, los pocillos son direccionables.

En algunas modalidades, se proporciona una matriz con dos o más carcasas de intercambio iónico (por ejemplo, una columna o pocillo) que incluye placas de filtro o cualquier otro tipo de microplacas o dispositivos que permitan el flujo a través de la fase móvil. En algunas de estas modalidades, la carcasa de intercambio iónico incluye un monolito con un grupo ionizable. En algunas de estas modalidades, el grupo ionizable es una amina, un ácido carboxílico o un ácido sulfónico. En algunas de estas modalidades, el monolito es el producto de reacción de un copolímero que incluye metacrilato de glicidilo con una amina o un ácido sulfónico equivalente. En otra de estas modalidades, el monolito es el producto de reacción de poli(GMA-co-EDMA), poli(GMA-co-DEGDMA) o poli(GMA-co-DVB) con una amina o ácido sulfónico equivalente. En aún otra de estas modalidades, el monolito es el producto de reacción de poli(CMS-co-DVB) con una amina o ácido sulfónico equivalente. En algunas modalidades, la columna de intercambio iónico incluye material de intercambio iónico convencional.

En algunas modalidades, se proporciona una matriz que incluye placas de filtro o cualquier otro tipo de microplacas o dispositivos que permiten el flujo a través de la fase móvil. La matriz incluye, además, un bloque con dos o más pocillos. Cada pocillo contiene material de intercambio iónico. En algunas modalidades, el material de intercambio iónico incluye un monolito con un grupo ionizable. En algunas de estas modalidades, el grupo ionizable es una amina, un ácido carboxílico o un ácido sulfónico. En algunas de estas modalidades, el monolito es el producto de reacción de un copolímero que incluye metacrilato de glicidilo con una amina o un ácido sulfónico equivalente. En otra de estas modalidades, el monolito es el producto de reacción de poli(GMA-co-EDMA), poli(GMA-co-DEGDMA) o poli(GMA-co-DVB) con una amina o ácido sulfónico equivalente. En aún otra de estas modalidades, el monolito es el producto de reacción de poli(CMS-co-DVB) con una amina o ácido sulfónico equivalente. En algunas modalidades, el material de intercambio iónico es un material de intercambio iónico convencional.

En algunas modalidades, las columnas se unen a la(s) superficie(s) de los pocillos. En otras modalidades, las columnas se unen covalentemente a la superficie de los pocillos mediante la formación de un enlace amida, éster, urea, uretano, carbono-silicio, carbono-nitrógeno, carbono-carbono, éter, tioéter o disulfuro o por cicloadición.

En algunas modalidades, el bloque incluye titanio, aluminio, acero inoxidable, metales dopados, vidrio, cuarzo, policarbonato, sílice fundida, poli(metacrilato de metilo), plásticos, poliéter éter cetona, poliéter éter cetona dopada, poliestireno dopado, copolímero de olefina cíclica, polieterimida ultem, placas de filtro de fibra de vidrio, polipropileno dopado o sus combinaciones.

En algunas modalidades, las dimensiones del pocillo están entre aproximadamente 0,1 mm y aproximadamente 50 mm de diámetro y entre aproximadamente 0,1 mm de altura y aproximadamente 10 mm de altura. En otras modalidades, las dimensiones del pocillo son aproximadamente 10 mm de diámetro y aproximadamente 10 mm de altura. En aún otras modalidades, las dimensiones del pocillo son aproximadamente 3,5 a 4 mm de diámetro interior y aproximadamente 1 a 4 mm de altura. En algunas modalidades, los pocillos son direccionables.

Métodos para el uso de monolitos con compuestos de reconocimiento unidos y matrices de estos

Se proporciona un método para preparar una biblioteca de compuestos químicos programada con ácidos nucleicos. El método abarca las etapas de poner en contacto una mezcla de moléculas de ácido nucleico con una matriz que incluye un bloque que tiene dos o más pocillos direccionables. Cada pocillo incluye un monolito con uno o más compuestos de reconocimiento unidos que unen selectivamente ácidos nucleicos monocatenarios, lo que divide de esta manera las moléculas de ácido nucleico en subpoblaciones. En algunas modalidades, la matriz incluye dos u oligonucleótidos donde el oligonucleótido unido de cada columna se une selectivamente al oligonucleótido complementario unido operativamente a un sitio de reacción química o un ligando, donde el nucleótido complementario es un componente de una mezcla.

Las subpoblaciones de moléculas de ácido nucleico pueden disociarse opcionalmente de los compuestos de reconocimiento mediante el uso de, por ejemplo, temperatura elevada, cambio en la fuerza iónica o cambio en el pH con las moléculas de ácido nucleico disociadas transferidas a contenedores separados. Las subpoblaciones separadas de las moléculas de ácido nucleico se hacen reaccionar después con diferentes subunidades químicas, donde las moléculas de ácido nucleico incluyen al menos una secuencia de unión y un sitio de reacción química que se unen operativamente. Cuando las subpoblaciones de moléculas de ácido nucleico se transfieren opcionalmente a contenedores separados, los pocillos que incluyen monolitos con compuestos de reconocimiento unidos que unen selectivamente ácidos nucleicos se alinean de manera direccionable con los contenedores separados. En algunas modalidades, las subpoblaciones separadas de moléculas de ácido nucleico se inmovilizan antes de la reacción con diferentes subunidades químicas. En otras modalidades, las subpoblaciones separadas de moléculas de ácido nucleico se inmovilizan sobre columnas de intercambio aniónico antes de la reacción con diferentes subunidades químicas. En aún otras modalidades, las columnas de intercambio aniónico incluyen un monolito con un grupo de intercambio iónico.

Se proporciona otro método para preparar una biblioteca de compuestos químicos programada con ácidos nucleicos. El método abarca las etapas de poner en contacto una mezcla de moléculas de ácido nucleico con una matriz que incluye un bloque que tiene dos o más pocillos direccionables. Cada pocillo incluye un monolito con uno o más compuestos de reconocimiento unidos que unen selectivamente ácidos nucleicos monocatenarios, lo que divide de esta manera las moléculas de ácido nucleico en subpoblaciones. En algunas modalidades, la matriz incluye dos u oligonucleótidos donde el oligonucleótido unido de cada columna se une selectivamente al oligonucleótido complementario unido operativamente a un sitio de reacción química o un ligando, donde el nucleótido complementario es un componente de una mezcla.

Las subpoblaciones de moléculas de ácido nucleico se transfieren a una segunda matriz que incluye placas de filtro o cualquier otro tipo de microplacas o dispositivos que permiten el flujo a través de la fase móvil y un bloque que contiene dos o más pocillos direccionables. Las subpoblaciones de moléculas de ácido nucleico pueden disociarse de los compuestos de reconocimiento, por ejemplo, mediante el uso de temperatura elevada, cambio de fuerza iónica o cambio en el pH. Los pocillos de la segunda matriz incluyen material de intercambio aniónico que inmoviliza de forma no específica las subpoblaciones de moléculas de ácido nucleico. Las subpoblaciones inmovilizadas de moléculas de ácido nucleico se hacen reaccionar con diferentes subunidades químicas. Los pocillos que incluyen monolitos con uno o más compuestos de reconocimiento unidos que unen selectivamente ácidos nucleicos se alinean de manera direccionable con los pocillos que incluyen el material de intercambio aniónico. Las moléculas de ácido nucleico incluyen al menos una secuencia de unión y un sitio de reacción química que se unen operativamente. En algunas modalidades, el material de intercambio aniónico incluye un monolito con grupos de intercambio aniónico. En algunas modalidades, la matriz incluye dos o más oligonucleótidos donde el oligonucleótido unido de cada columna se une selectivamente al oligonucleótido complementario unido operativamente a un sitio de reacción química o un ligando, donde el nucleótido complementario es un componente de una mezcla. En otras modalidades, el material de intercambio aniónico incluye una columna monolítica con un grupo de intercambio iónico. En otras modalidades, las subpoblaciones separadas de moléculas de ácido nucleico se inmovilizan antes de la reacción con diferentes subunidades químicas. En aún otras modalidades, las subpoblaciones separadas de moléculas de ácido nucleico se inmovilizan sobre material de intercambio aniónico antes de la reacción con diferentes subunidades químicas.

Como tal, la descripción anterior representa nuevos métodos para realizar química combinatoria programada con ADN ("DPCC", por sus siglas en inglés) (ver por ejemplo, Wrenn y otros, J. Am. Chem. Soc. (2007) 129(43) 13137-13143; Wrenn y otros, Annu. Rev. Biochem. (2007) 76, 331-349; Harbury y otros, Patente de Estados Unidos Núm. 7,479, 472; Harbury y otros, Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. US2006/0099626) que se describe más abajo.

La DPCC proporciona métodos para sintetizar, seleccionar y amplificar una biblioteca química combinatoria con plantilla de ácidos nucleicos. La biblioteca química combinatoria comprende una pluralidad de especies de moléculas bifuncionales (es decir, moléculas etiquetadas con ácido nucleico) que comprenden cada una un resto de compuesto químico diferente y un resto identificador único de secuencia de ácido nucleico (es decir, etiqueta de ácido nucleico), en donde la secuencia de ácido nucleico define y dirige la síntesis del resto de compuesto químico correspondiente. Los detalles de las moléculas etiquetadas con ácido nucleico usadas y las estrategias tradicionales para sintetizar y seleccionar compuestos etiquetados de ácido nucleico combinatorios se describen en las referencias anteriores.

Más abajo se describen con mayor detalle las moléculas etiquetadas con ácidos nucleicos usadas para producir bibliotecas combinatorias de moléculas pequeñas. Las moléculas etiquetadas con ácido nucleico son compuestos etiquetados que tienen una etiqueta de ácido nucleico que contiene al menos una, típicamente dos o más secuencias de hibridación encadenadas diferentes y un resto de reacción química unido, típicamente unido covalentemente (Fig. 1). Las secuencias de hibridación en cualquier etiqueta de ácido nucleico dada difieren generalmente de las secuencias en cualquier otra etiqueta de ácido nucleico. Debe señalarse que diferentes etiquetas de ácido nucleico pueden compartir un codón común. Las secuencias de hibridación de cada etiqueta de ácido nucleico identifican los monómeros químicos particulares que se usarán en cada etapa de síntesis sucesiva para sintetizar un compuesto químico único unido al sitio de reacción química. Como tal, las secuencias de hibridación de cada etiqueta de ácido nucleico identifican, además, el orden de unión de los monómeros químicos particulares al sitio de reacción química.

En general, cada secuencia de hibridación de la etiqueta de ácido nucleico proporciona una secuencia separada para hibridar con una secuencia de ácido nucleico de captura complementaria unida a un monolito. Las diferentes secuencias de hibridación de las etiquetas de ácido nucleico permiten la división específica de secuencia de una población de moléculas etiquetadas de ácido nucleico en una pluralidad de subpoblaciones de moléculas etiquetadas de ácido nucleico diferentes. Cada subpoblación de moléculas etiquetadas con ácido nucleico se hace reaccionar con un monómero químico diferente para permitir el acoplamiento del monómero químico diferente en el sitio de reacción química de cada etiqueta de ácido nucleico.

En algunas modalidades, se selecciona un conjunto de 20-mer ortogonales (ver la regla ortogonal más abajo) que contienen el sitio BsaI y tienen una T_m en el intervalo de 57-60 °C. Las anteriores son las regiones constantes y existen 22 de dichos oligos. El conjunto anterior se usa como una semilla para generar un conjunto de 20-mer ortogonales que tienen una T_m en el intervalo 49-53 para usarse como codones. La ortogonalidad entre una consulta y el sujeto (secuencia en semilla) se define mediante los criterios siguientes: (a) la alineación dentro del registro (nucleótido consulta 1 emparejado con el nucleótido sujeto 1) no debe tener más de 12 nucleótidos emparejados; (b) las corridas contiguas de no más de 9 nucleótidos deben emparejar entre la consulta y el sujeto (cualquier registro); (c) corridas contiguas de no

más de 6 nucleótidos emparejados entre la consulta y el sujeto en el extremo 3' o 5'; y (4) todas las condiciones anteriores deben cumplirse con el complemento inverso de la consulta.

El conjunto de 20-mer se genera mediante las siguientes reglas: (a) calcular T_m mediante el uso del método del vecino más cercano; (b) descartar si no está en el intervalo (49-53 para codones; 57-61 para regiones constantes); (c) sin palíndromos > 4 pb; y (d) sin corridas de una sola base > 4 nt.

Para llevar a cabo una primera etapa de reacción, la población de etiquetas de ácido nucleico se "divide" en una pluralidad de subpoblaciones de etiquetas de ácido nucleico, por ejemplo, 10 subpoblaciones diferentes que corresponden a las diez secuencias de hibridación diferentes en la "primera" posición (V_1, por ejemplo, a_1, b_1, o c_1) en cada etiqueta (Fig. 3A, paneles superior y central). Esto se hace al poner en contacto las moléculas que contienen la etiqueta de ácido nucleico con un primer grupo de monolitos con ácidos nucleicos de captura unidos con secuencias complementarias a una de las diferentes secuencias de hibridación de "primera posición" en las etiquetas de ácido nucleico (por ejemplo, a_1', b_1', o c_1'). Estos ácidos nucleicos inmovilizados se denominan a veces en la presente descripción "ácido nucleico de captura" u "oligonucleótidos de captura", y las secuencias complementarias a una secuencia etiqueta de ácido nucleico se denominan "secuencias de captura". Esta etapa de contacto proporciona dividir una población de moléculas que tienen diferentes etiquetas de ácido nucleico en X_1 subpoblaciones (donde X representa el número de secuencias de captura diferentes usadas para separar los compuestos agrupados), donde cada subpoblación de moléculas comparte al menos una secuencia de hibridación común dentro de la etiqueta de ácido nucleico.

Después de la primera etapa de división, las diferentes subpoblaciones de etiqueta de ácido nucleico X_1, (por ejemplo, diez subpoblaciones diferentes de etiquetas de ácido nucleico como se ejemplifica en la Fig. 3A) se hacen reaccionar con monómeros químicos diferentes X_1 (Fig. 3A, panel central). Las reacciones se realizan de manera que la identidad de cada monómero químico usado en la etapa de acoplamiento se dirige por la secuencia de hibridación de primera posición particular de la etiqueta de ácido nucleico en la subpoblación. Como se ejemplifica en la Fig. 3A, el monómero químico A_1, B_1 o C_1 corresponde a la secuencia de hibridación de la etiqueta de ácido nucleico particular en la "primera posición" (por ejemplo, a_1, b_1 o c_1). La primera etapa de acoplamiento químico convierte el sitio de reacción química en cada etiqueta en un compuesto intermedio específico de reactivo, al conjugar el monómero químico particular al sitio de reacción química de cada subpoblación de etiqueta de ácido nucleico (por ejemplo, A_1, B_1 o C_1, como se ejemplifica en la Fig. 2). El resultado es subpoblaciones diferentes X_1 de compuestos que tienen etiquetas de ácido nucleico, cada subpoblación tiene un monómero químico diferente conjugado con el sitio de reacción química de cada subpoblación de etiqueta de ácido nucleico (Fig. 3A, panel de la parte inferior). Por ejemplo, tres poblaciones diferentes de etiquetas de ácido nucleico (como las separadas por hibridación a a_1, b_1 o c_1 en la etapa de "división") se representan en el panel de la parte inferior de la Fig. 3A, donde una primera subpoblación de moléculas separadas por secuencia se modifica para contener el monómero químico A_1, una segunda subpoblación de moléculas separadas por la secuencia b_1 se modifica para contener el monómero químico B_1, y una tercera subpoblación de moléculas separadas por secuencia se modifica para contener el monómero químico C_1. En cada caso, un monómero químico se acopla al sitio de reacción química del compuesto que contiene la etiqueta de ácido nucleico, donde el monómero químico añadido proporciona el sitio de reacción para el acoplamiento de un monómero adicional en una etapa posterior, según se desee.

Después de las primeras etapas de división y acoplamiento químico, las subpoblaciones de compuestos que contienen la etiqueta de ácido nucleico diferentes X_1 se agrupan y se ponen en contacto con un segundo grupo de reactivos en fase sólida (secuencias de ácido nucleico de captura inmovilizadas, por ejemplo, a_2', b_2', o $c_{2'}$), cada uno tiene una secuencia que es complementaria a una de las secuencias de hibridación de “segunda posición” de las etiquetas de ácido nucleico diferentes X_2 (por ejemplo, a_2, b_2o c_2) (Fig. 3B, paneles superior y medio). Como resultado, la población agrupada de compuestos etiquetados con ácido nucleico se divide en una pluralidad de subpoblaciones X_2 de etiquetas de ácidos nucleicos diferentes. El número de subpoblaciones en la segunda etapa (X_2) puede ser igual o diferente que el número de subpoblaciones resultantes de la primera etapa de división (X_1). Como anteriormente, cada subpoblación de moléculas etiquetadas con ácido nucleico se determina por la secuencia de hibridación de la "segunda posición" de las etiquetas de ácido nucleico (por ejemplo, a_2, b_2 o c_2) (Fig. 3B, panel central).

Cada una de las subpoblaciones de "segunda posición" de compuestos etiquetados con ácido nucleico diferentes se hace reaccionar con una de una segunda pluralidad de monómeros químicos, un monómero químico diferente para cada subconjunto (por ejemplo, A_2, B_2o C_2) (Fig. 3B, panel central). El resultado es una subpoblación de etiquetas de ácido nucleico diferente X_2, cada población tiene un monómero químico diferente conjugado con el monómero químico anterior de cada subpoblación de moléculas que contiene etiquetas de ácido nucleico (Fig. 3B, panel de la parte inferior). Por ejemplo, como se ejemplifica en el panel de la parte inferior de la Fig. 3B, pueden generarse nueve subpoblaciones diferentes de compuestos que contienen la etiqueta de ácido nucleico, donde una primera población comprende los monómeros químicos A_1 y A_2, una segunda población comprende los monómeros químicos A_1 y B_2, una tercera población comprende los monómeros químicos A_1 y C_2, una cuarta población comprende los monómeros químicos B_1 y A_2, una quinta población comprende los monómeros químicos B_1 y B_2, una sexta población comprende los monómeros químicos B_1 y C_2, una séptima población comprende los monómeros químicos C_1 y A_2, una octava población comprende los monómeros químicos C_1 y B_2, y una novena población comprende los monómeros químicos C_1 y C_2.

Este proceso de dividir las etiquetas de ácido nucleico previamente reaccionadas en subpoblaciones diferentes X_n puede repetirse, según se desee (donde X representa el número de diferentes secuencias de captura usadas para separar los

compuestos agrupados y n representa el número de etapas del esquema sintético). Por ejemplo, como se ilustra en las Fig. 3C y 3D, los compuestos que contienen etiquetas de ácido nucleico pueden hibridarse con un nuevo conjunto de oligonucleótidos de captura inmovilizados, y después se hacen reaccionar las subpoblaciones separadas de etiquetas X_n con los diferentes monómeros químicos seleccionados X_n. Estas etapas pueden repetirse hasta que se completan todas las etapas de reacción deseadas realizadas sucesivamente en los sitios de reacción del compuesto que contiene la etiqueta de ácido nucleico (Fig. 3C y Fig. 3D). El resultado es una biblioteca combinatoria de compuestos químicos etiquetados con ácidos nucleicos diferentes $X_1 \times X_2 \times \ldots \times X_n$, en donde la particularidad de las secuencias de hibridación en las posiciones N (por ejemplo, V_1, V_2, y V_3, ver Fig. 1) de la etiqueta de ácido nucleico de cada compuesto dicta la secuencia de monómeros químicos del compuesto en particular.

Como se ejemplifica en el panel superior de la Fig. 3D, pueden generarse veintisiete poblaciones diferentes de compuestos etiquetados con ácido nucleico a partir de las etapas como se ejemplifica en las Fig. 3A-3C. La biblioteca combinatoria de compuestos ilustrativa incluye, por ejemplo, una primera población que comprende los monómeros químicos A_1, A_2y A_3, una segunda población que comprende los monómeros químicos A_1, B_2y A_3, una tercera población que comprende los monómeros químicos A_1, C_2y A_3, una cuarta población que comprende los monómeros químicos B_1, A_2y A_3, una quinta población que comprende los monómeros químicos B_1, B_2y A_3, una sexta población que comprende los monómeros químicos B_1, C_2y A_3, una séptima población que comprende los monómeros químicos C_1, A_2y A_3, una octava población que comprende los monómeros químicos C_1, B_2y A_3, y una novena población que comprende los monómeros químicos C_1, C_2y A_3, etcétera.

Como se ejemplifica en la Fig. 1, la etiqueta de ácido nucleico se compone de regiones Z_n(por ejemplo, n=9) de secuencias de ácido nucleico encadenadas diferentes y un sitio de reacción química. Cinco de estas regiones se denotan C_1 hasta C_5y se refieren a las secuencias "constante" o "espaciador" que son las mismas para las etiquetas de ácido nucleico. Las cuatro regiones Z restantes se denotan como V_1 hasta V_4 y se refieren a las secuencias de hibridación "variables" en las posiciones de la primera a la cuarta. En modalidades representativas, las regiones V y las regiones C se alternan en orden desde el extremo 3' de la etiqueta de ácido nucleico al extremo 5' de la etiqueta de ácido nucleico. En ciertas modalidades, la primera región Z es una región C. En otras modalidades, la primera región Z es una región V. En ciertas modalidades, la última región Z es una región C. En otras modalidades, la última región Z es una región V.

Las secuencias de hibridación variables son diferentes generalmente para cada grupo de subpoblaciones de etiquetas de ácido nucleico en cada posición. En esta modalidad, cada región V se rodea por dos regiones C diferentes. Como se apreciará más abajo, todas las secuencias de la región V son ortogonales, de manera que no hay dos secuencias de la región V que se hibriden de forma cruzada entre sí. Por ejemplo, en una modalidad que comprende etiquetas de ácido nucleico que incluyen cuatro regiones variables y 400 secuencias de ácido nucleico diferentes para cada una de las cuatro regiones variables, existe un total de 1.600 secuencias de hibridación de ácido nucleico ortogonales. Dichas secuencias de hibridación pueden diseñarse de acuerdo con métodos conocidos. Por ejemplo, donde cada secuencia de hibridación variable comprende 20 nucleótidos, con una posibilidad de uno de cuatro nucleótidos en cada posición, son posibles 4^{20} secuencias diferentes. De los candidatos posibles diferentes, pueden elegirse secuencias específicas de manera que cada secuencia difiera de otra secuencia en al menos 2 a 3, o más, nucleótidos internos diferentes.

En general, las regiones C y V adecuadas comprenden de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, o más. En ciertas modalidades, las regiones C y V comprenden de aproximadamente 11 nucleótidos a aproximadamente 29 nucleótidos de longitud, lo que incluye de aproximadamente 12 a aproximadamente 28, de aproximadamente 13 a aproximadamente 27, de aproximadamente 14 a aproximadamente 26, de aproximadamente 14 a aproximadamente 25, de aproximadamente 15 a aproximadamente 24, de aproximadamente 16 a aproximadamente 23, de aproximadamente 17 a aproximadamente 22, de aproximadamente 18 a aproximadamente 21, de aproximadamente 19 a aproximadamente 20 nucleótidos de longitud. En modalidades representativas, las regiones C y V comprenden aproximadamente 20 nucleótidos de longitud.

Una etiqueta de ácido nucleico puede comprender de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 o más regiones V diferentes (secuencias de hibridación), lo que incluye aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 500 o más regiones V diferentes. En modalidades representativas, la etiqueta de ácido nucleico comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 regiones V diferentes, lo que incluye aproximadamente 2 a aproximadamente 48, aproximadamente 3 a aproximadamente 46, aproximadamente 4 a aproximadamente 44; aproximadamente 5 a aproximadamente 42, aproximadamente 6 a aproximadamente 40, aproximadamente 7 a aproximadamente 38, aproximadamente 8 a aproximadamente 36, aproximadamente 9 a aproximadamente 34, aproximadamente 10 a aproximadamente 32, aproximadamente 11 a aproximadamente 30, aproximadamente 12 a aproximadamente 29, aproximadamente 13 a aproximadamente 28, aproximadamente 14 a aproximadamente 27, aproximadamente 15 a aproximadamente 26, aproximadamente 16 a aproximadamente 25, aproximadamente 17 a aproximadamente 24, aproximadamente 18 a aproximadamente 23, aproximadamente 19 a aproximadamente 22, aproximadamente 20 a aproximadamente 21 regiones V diferentes.

Una etiqueta de ácido nucleico puede comprender de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 o más regiones C diferentes (secuencias constantes), lo que incluye aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 500 o más regiones C diferentes. En modalidades representativas, la etiqueta de ácido nucleico comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 regiones C diferentes, lo que incluye aproximadamente 2 a aproximadamente

48, aproximadamente 3 a aproximadamente 46, aproximadamente 4 a aproximadamente 44; aproximadamente 5 a aproximadamente 42, aproximadamente 6 a aproximadamente 40, aproximadamente 7 a aproximadamente 38, aproximadamente 8 a aproximadamente 36, aproximadamente 9 a aproximadamente 34, aproximadamente 10 a aproximadamente 32, aproximadamente 11 a aproximadamente 30, aproximadamente 12 a aproximadamente 29, aproximadamente 13 a aproximadamente 28, aproximadamente 14 a aproximadamente 27, aproximadamente 15 a aproximadamente 26, aproximadamente 16 a aproximadamente 25, aproximadamente 17 a aproximadamente 24, aproximadamente 18 a aproximadamente 23, aproximadamente 19 a aproximadamente 22, aproximadamente 20 a aproximadamente 21 regiones C diferentes.

Las etiquetas de ácido nucleico se sintetizan de manera que las regiones Z_1 hasta Z_n (por ejemplo, n=9) se unen entre sí lo que comienza con Z_1 en el extremo 3' y continúa en orden con el sitio de reacción química en el extremo 5' después de Z_n. Por ejemplo, al comenzar con el extremo 3' de la etiqueta de ácido nucleico, Z_1 se une a Z_2, Z_2 se une a Z_3, Z_3 se une a Z_4, etcétera, y el sitio de reacción química se une a Z_n en cualquier sitio de la etiqueta de ácido nucleico, lo que incluye el extremo terminal 3', el extremo terminal 5' o cualquier otra posición en la etiqueta de ácido nucleico.

Como se indicó anteriormente, una población de etiquetas de ácido nucleico se degenera, es decir, casi todas las etiquetas de ácidos nucleicos difieren entre sí en la secuencia de nucleótidos. Las diferencias de nucleótidos entre las etiquetas de ácidos nucleicos diferentes residen completamente en las secuencias de hibridación (regiones V). Por ejemplo, una población inicial de etiquetas de ácido nucleico puede comprender de 400 primeras subpoblaciones de etiquetas de ácido nucleico basadas en la secuencia particular de V_1 de cada subpoblación. Como tal, la región V_1 de cada subpoblación comprende una cualquiera de 400 secuencias de hibridación de 20 pares de bases diferentes. La separación de dicha población de etiquetas de ácido nucleico basadas en V_1 daría como resultado 400 subpoblaciones diferentes de etiquetas de ácidos nucleicos. Igualmente, la misma población inicial de etiquetas de ácido nucleico puede comprender, además, 400 subpoblaciones secundarias de etiquetas de ácido nucleico basadas en la secuencia particular de V_2 de cada subpoblación, en donde las segundas subpoblaciones son diferentes de las primeras subpoblaciones.

En la población ilustrativa de etiquetas de ácido nucleico demostrada en la Fig. 1, las primeras pocas de las primeras secuencias de hibridación se indican como a_1, b_1, c_1 ... j_1, en la región V_1 de las diferentes etiquetas de ácido nucleico. Igualmente, las primeras pocas de las segundas secuencias de hibridación se denotan como a_2, b_2, c_2... j_2, en la región V_2 de las diferentes etiquetas de ácido nucleico. Las primeras pocas secuencias de la tercera hibridación se denotan como a_3, b_3, c_3 ... j_3, en la V_3, etcétera.

En ciertas modalidades, las etiquetas de ácido nucleico comparten la misma secuencia de veinte pares de bases para las regiones espaciadoras designadas a la vez que tienen una secuencia diferente de veinte pares de bases entre regiones espaciadoras diferentes. Por ejemplo, las etiquetas de ácido nucleico comprenden la misma región espaciadora C_1, la misma región espaciadora C_2, y la misma región espaciadora C_3, en donde C_1, C_2, y C_3 son diferentes entre sí.

De esta forma, cada etiqueta de ácido nucleico de 180 nucleótidos de longitud consta de un ensamble ordenado de 9 regiones de veinte pares de bases diferentes que comprenden las 4 regiones variables (a_1, b_1, c_1 ... d_5, e_5, f_5, h_{10}, i_{10}, j_{10}) y las 5 regiones espaciadoras (z_1... z_{11}) en orden alterno. Las veinte regiones de pares de bases tienen las propiedades siguientes: (i) las concentraciones micromolares de todas las secuencias de la región se hibridan con sus secuencias de ADN complementarias eficientemente en solución a una temperatura especificada designada Tm, y (ii) las secuencias de la región son ortogonales entre sí con respecto a la hibridación, lo que significa que ninguna de las secuencias de la región hibrida de manera cruzada eficientemente con otra de las secuencias de la región, o con el complemento de cualquiera de las otras secuencias de la región, a la temperatura Tm.

Las etiquetas de ácido nucleico degeneradas pueden ensamblarse a partir de sus unidades estructurales constituyentes mediante el método de ensamble de PCR sin cebador descrito por Stemmer y otros, Gene (1995) 164(1) 49-53 o por estrategias de ligadura.

Como se indicó anteriormente, las etiquetas de ácido nucleico comprenden además un sitio de reacción química, lo que incluye el extremo terminal 3', el extremo terminal 5' o cualquier otra posición en la etiqueta de ácido nucleico. En algunas modalidades, el sitio de reacción química puede añadirse al modificar el alcohol 5' de la base 5' de la etiqueta de ácido nucleico con un reactivo disponible comercialmente que introduce un grupo fosfato anclado a un espaciador lineal, por ejemplo, una cadena de 12 carbonos terminada con un grupo amino primario (por ejemplo, como el disponible de Glen Research, o de muchos otros reactivos disponibles para introducir tioles u otros sitios de reacción química en el ADN sintético).

El sitio de reacción química es el sitio en el que se sintetiza el compuesto particular dictado por el orden de las secuencias de la región V de la etiqueta de ácido nucleico. Un sitio de reacción química ilustrativo es una amina primaria. Pueden introducirse muchos tipos diferentes de sitios de reacción química además de las aminas primarias en cualquier sitio, lo que incluye el extremo 3', el extremo 5' o cualquier otra posición en la etiqueta de ácido nucleico. Los sitios de reacción química ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, componentes químicos capaces de formar enlaces amida, éster, urea, uretano, enlaces carbono-carbonilo, enlaces carbono-nitrógeno, enlaces simples carbono-carbono, enlaces olefínicos, enlaces tioéter y enlaces disulfuro. En el caso de la síntesis enzimática, pueden suministrarse cofactores según se

requiera para una catálisis eficaz. Dichos cofactores se conocen por los expertos en la técnica. Un cofactor ilustrativo es el grupo fosfopanteteinilo útil para la síntesis de policétidos.

Una biblioteca de compuestos completa se sintetiza al llevar a cabo rondas alternas de división de bibliotecas con plantilla de ADN y un acoplamiento químico y/o bioquímico a cada subconjunto de etiquetas de ácido nucleico.

La pluralidad de compuestos químicos producidos se une a etiquetas de secuencia de ácido nucleico que facilitan la identificación de la estructura química. Los métodos convencionales de secuenciación de ADN están fácilmente disponibles y son útiles para una determinación de la secuencia de las etiquetas de ácido nucleico que dirigen la síntesis. (Ver, por ejemplo, Maniatis y otros, Eds., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Segunda edición, Cold Spring Harbor, NY (1989))).

La biblioteca de compuestos puede tamizarse para una actividad deseada, por ejemplo, la capacidad de catalizar una reacción particular o de unirse con afinidad alta a un receptor inmovilizado. En la mayoría de los casos, la subpoblación de moléculas con la actividad deseada, así como también sus etiquetas de ácido nucleico, se separan físicamente de las hermanas durante la selección. Después de la selección, las etiquetas de ácido nucleico unidas a las moléculas seleccionadas se sintetizan mediante la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") (Saiki y otros, Science (1988) 239(4839) 487-491). El hidroxilo 5' del cebador del extremo 5' usado para sintetizar la cadena codificante se modifica con un grupo fosfato anclado a un sitio de reacción química de amina primaria nuevo. Después de la síntesis, la cadena codificante se separa de la cadena no codificante. Debido a que las etiquetas de ácido nucleico dirigen la síntesis de la biblioteca, en lugar de simplemente informar sobre la historia sintética de los compuestos individuales, las cadenas de codificación amplificadas a partir de la primera biblioteca pueden usarse para dirigir la construcción de una biblioteca de compuestos de segunda generación. La repetición de este procedimiento, al llevar a cabo múltiples rondas de selección, amplificación de etiquetas de ADN y resíntesis de bibliotecas, permite que los compuestos individuales convenientes se amplifiquen a partir de bibliotecas extremadamente complejas.

Una biblioteca de compuestos completa o miembros de biblioteca individuales producidos mediante lo anterior pueden evaluarse para una o más actividades deseadas en ensayos de tamizaje capaces de distinguir compuestos que modulan una actividad o poseen una propiedad estructural o funcional deseada. Los ensayos ilustrativos y los análisis funcionales incluyen, pero no se limitan a, ensayos enzimáticos, ensayos catalíticos no enzimáticos, ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de unión receptor/ligando y ensayos basados en células. Más específicamente, los métodos basados en células ilustrativos se basan en; (1) unión diferencial de compuestos de la biblioteca a una superficie celular (es decir, unión a la célula cancerosa y no a una célula no cancerosa); (2) unión de compuestos de la biblioteca a componentes de un extracto celular (por ejemplo, unión a una fracción celular producida al separar un extracto celular completo en un gradiente de sacarosa); (3) compuestos de la biblioteca capaces de endocitosis por una célula y (4) localización in vivo y propiedades de unión de los compuestos de la biblioteca mediante la inyección de la biblioteca en un animal. (Ver, por ejemplo, Arap y otros, Science (1998) 279(5349) 377-80 que describe la selección in vivo de bibliotecas de presentación de fagos para aislar péptidos que se alojan específicamente en los vasos sanguíneos del tumor). Como apreciarán los expertos en la técnica, dichos ensayos pueden realizarse en bibliotecas completas de compuestos sintetizados por los métodos descritos en la presente descripción o subpoblaciones derivadas de los mismos.

El número de compuestos de reconocimiento posibles para los cuales los ligandos pueden sintetizarse e identificarse por DPCC es virtualmente ilimitado. Los compuestos de reconocimiento incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos, ARN monocatenario, ADN monocatenario, proteínas de unión a ADN, proteínas de unión a ARN, ácidos nucleicos peptídicos, péptidos, depsipéptidos, polipéptidos, anticuerpos, peptoides, polímeros, polisiloxanos, compuestos inorgánicos de peso mayor de 50 daltons, compuestos orgánicos de peso molecular entre aproximadamente 3.000 daltons y aproximadamente 50 daltons o sus combinaciones.

Los ligandos deseados producidos por los métodos de la biblioteca combinatoria dirigida por la etiqueta de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos, ARN monocatenario, ADN monocatenario, proteínas de unión a ADN, proteínas de unión a ARN, ácidos nucleicos peptídicos, péptidos, depsipéptidos, polipéptidos, anticuerpos, peptoides, polímeros, polisiloxanos, compuestos inorgánicos de peso molecular mayor de 50 daltons, compuestos orgánicos de peso molecular entre aproximadamente 3.000 daltons y aproximadamente 50 daltons o sus combinaciones.

Además de permitir la amplificación de los miembros de la biblioteca seleccionados, el método permite la evolución de las bibliotecas compuestas codificadas. Más específicamente, se lleva a cabo in vitro la recombinación genética entre las etiquetas de ácido nucleico que codifican subpoblaciones seleccionadas de compuestos por mutagénesis o fragmentación aleatoria de la secuencia de la etiqueta de ácido nucleico, seguida de la generación de secuencias de ácido nucleico relacionadas ("barajado génico", Stemmer, Nature, (1994) 370 389-391; Stemmer y otros, Patente de Estados Unidos Núm. 5.811.238) y la subsecuente síntesis escalonada de compuestos adicionales. La repetición de este procedimiento, al llevar a cabo múltiples rondas de selección, amplificación de etiquetas de ADN, recombinación genética y resíntesis de bibliotecas, permite que los compuestos convenientes individuales evolucionen a partir de bibliotecas extremadamente complejas.

En algunas modalidades, se introduce un sitio de restricción único en cada secuencia de hibridación específica. A manera de ejemplo, la digestión parcial de una biblioteca con 11 secuencias de hibridación específicas se realiza mediante una

digestión parcial con 11 enzimas de restricción correspondientes, seguida de una reacción de reensamblaje de PCR sin cebador, lo que permite que las etiquetas de ácido nucleico para los compuestos que se han seleccionado de la biblioteca se recombinen entre sí y se lleven a cabo etapas sintéticas adicionales. Por analogía con el barajado génico para la síntesis de proteínas (Crameri y otros, Nature (1998) 391 288-291), la capacidad de llevar a cabo la recombinación genética de bibliotecas de compuestos aumenta enormemente la eficiencia con la que puede explorarse y optimizarse la diversidad en las bibliotecas de compuestos. En algunas modalidades, el gen se ha circularizado

En consecuencia, el barajado de polinucleótidos produce una población de secuencias de ácidos nucleicos variantes, capaces de dirigir la síntesis de moléculas relacionadas estructuralmente y/o funcionalmente relacionadas, y/o variantes de estas para crear ligandos que tienen una o más actividades deseadas. Por ejemplo, las moléculas capaces de unirse a la región 5' no traducida (UTR, por sus siglas en inglés) del ARNm pueden identificarse de esta manera. La amplificación in vitro de una subpoblación seleccionada de etiquetas de ácido nucleico que dirigen la síntesis mediante PCR, ya sea antes o después del "barajado génico" es posible además mediante el uso de los métodos descritos anteriormente.
En aún otro aspecto, se proporciona un dispositivo. El dispositivo abarca dos matrices que incluyen bloques separados. El bloque de la primera matriz abarca dos o más pocillos direccionables que incluyen monolitos con compuestos de reconocimiento unidos que unen selectivamente a los ligandos. El bloque de la segunda matriz abarca dos o más pocillos direccionables que incluyen material de intercambio iónico. Los pocillos que incluyen monolitos con compuestos de reconocimiento unidos que unen selectivamente ligandos se alinean con los pocillos que incluyen el material de intercambio iónico. En algunas modalidades, el material de intercambio iónico incluye un monolito con grupos de intercambio iónico. En otras modalidades, el material de intercambio iónico incluye un monolito con grupos de intercambio aniónico. Pueden usarse modalidades específicas de cualquiera de las matrices descritas anteriormente en el dispositivo informado en la presente descripción.

Como tal, la descripción anterior representa un dispositivo novedoso para realizar DPCC (ver por ejemplo, Harbury y otros Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. US2006/0099626; Weisenger y otros, PLoS ONE 7, e32299 para ejemplos anteriores). Como se describió anteriormente, una biblioteca de ADN se traduce en moléculas pequeñas mediante ciclos de hibridación y química repetidos. El número de ciclos depende del número de etapas de química combinatoria que se requieren para hacer la biblioteca. Cada sintón en una etapa particular corresponderá a un codón único. En las modalidades anteriores, una matriz de hibridación separa (es decir, enruta) la biblioteca de ADN de manera que los miembros de una biblioteca de ADN (es decir, los ligandos) que contienen el mismo codón se inmovilizarán en uno o más monolitos, que se unen al compuesto de reconocimiento anticodón afín, en pocillos direccionables. La matriz de hibridación puede usarse en lugar de los filtros de división descritos en Harbury y otros, Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. US2006/0099626 o las columnas de sefarosa descritas en Weissenger y otros, PLoS ONE 7, e32299.

En otro aspecto, la matriz de hibridación separa (es decir, enruta) la biblioteca de ADN de manera que los miembros de una biblioteca de ADN (es decir, los ligandos) que contienen el mismo codón se inmovilizan en uno o más monolitos, que se unen al compuesto de reconocimiento anticodón afín, en pocillos direccionables. Una matriz de transferencia eluye los miembros específicamente hibridados de la biblioteca de ADN en pocillos direccionables separados para etapas de química posteriores. Los expertos en la técnica apreciarán que el uso de dicho dispositivo no se restringe a bibliotecas de ADN. Diversas bibliotecas de compuestos pueden enrutarse de la misma manera con compuestos de reconocimiento elegidos apropiadamente y pueden procesarse adicionalmente como se describe más abajo.

Una matriz de hibridación ilustrativa se ilustra en la Fig. 4 e incluye cinco placas ensambladas de la parte superior a la parte inferior: A11, D11, T1, D12 y A12. La placa T1 es una matriz donde cada pocillo direccionable contiene un monolito con un compuesto de reconocimiento anticodón específico adjunto. Las placas D11 y D12 se fabrican, por ejemplo, a partir de un plástico que contiene orificios que conectan los monolitos con compuestos de reconocimiento anticodón específicos unidos sobre la placa T1 con las ranuras en las caras internas de las placas A11 y A12. Las ranuras se conectan a canales a través de los cuales puede aplicarse presión de aire y vacío. Los diafragmas colocados entre las placas A y D crean una cámara sinuosa contínua sellada que consta de las ranuras de las placas A, los orificios de las placas D y los monolitos en la placa T. Una de las placas D (D11) tiene puertos a través de los cuales el líquido puede entrar y salir de esta cámara. Las ranuras en las placas A de la parte superior y la parte inferior se diseñan de manera que la aplicación cíclica adecuada de presión del aire y vacío a los canales en las placas A establece un flujo direccional del líquido en la cámara sinuosa mediante, por ejemplo, una bomba de hibridación (ver por ejemplo, Weissenger y otros, PLoS ONE 7, e32299). El efecto neto del dispositivo mesofluídico puede compararse con el flujo de la biblioteca de ligandos de ADN a través de una matriz de columnas monolíticas unidas a un compuesto de reconocimiento de anticodón específico (es decir, la matriz de hibridación), que se conectan en serie en un modo de cabeza a cola. El experto en la técnica apreciará que dichos dispositivos N pueden conectarse en serie para que una biblioteca pueda particionarse, en principio, entre un número infinito de matrices de hibridación.

A medida que la biblioteca de ADN fluye a través de la matriz de hibridación, los miembros de la biblioteca de ADN que contienen el codón apropiado se hibridarán con un monolito unido a un compuesto de reconocimiento de anticodón afín en la matriz de hibridación. En algunas modalidades, el ciclaje de la biblioteca de ADN a través del dispositivo cinco veces asegurará una partición >90 % de cada codón (es decir, el 90 % de la biblioteca de ADN con cada codón se inmoviliza en el monolito correcto con compuestos de reconocimiento de anticodón unidos; lo anterior requiere que cada pase de la biblioteca de ADN a través de las columnas monolíticas con compuestos de reconocimiento de anticodón unidos particione > 40 % del codón afín). En consecuencia, al final de esta etapa, en algunas modalidades, se inmovilizará >90 % de la

biblioteca sobre la matriz de hibridación. En otras modalidades, el ciclaje de la biblioteca de ADN a través del dispositivo cinco veces garantizará entre aproximadamente 80 % y aproximadamente 90 % de partición de cada codón. En consecuencia, al final de esta etapa, en algunas modalidades, entre aproximadamente 80 % y aproximadamente 90 % de la biblioteca se inmovilizará en la matriz de hibridación al final de esta etapa. En algunas modalidades, el dispositivo se desensambla y la matriz de hibridación que comprende un monolito unido a un compuesto de reconocimiento de anticodón afín que tiene miembros específicos unidos de la biblioteca de ADN (es decir, placa T1) se usan ahora para formar una matriz de transferencia.

La matriz de transferencia permite el procesamiento paralelo de las columnas monolíticas individuales en la matriz donde los monolitos con compuestos de reconocimiento de anticodón unidos se han hibridado con miembros específicos de la biblioteca de ADN. En algunas modalidades, la matriz de transferencia incluye las placas D01, T1 y D02, como se ilustra en la Fig. 5. En algunas de estas modalidades, se colocan juntas de silicona en las ranuras de los patrones de calles en la cara interna de las placas D01 y D02 (cara adyacente a T1) para evitar la contaminación cruzada de los pocillos de la matriz de transferencia direccionable. El líquido aplicado a la parte superior de la placa D01 se extraerá a través del ensamble, por ejemplo, mediante centrifugación. La matriz de transferencia permite el lavado, elución y regeneración de la matriz con monolitos con compuestos de reconocimiento anticodón unidos. En algunas modalidades, los pocillos de la matriz de transferencia contendrán material de intercambio iónico que puede usarse para inmovilizar los miembros específicos de la biblioteca de ADN, que se hibridaron a los monolitos con compuestos de reconocimiento de anticodón unidos. En algunas modalidades, la dirección de los pocillos de la matriz de transferencia corresponde directamente a la dirección de los pocillos de la matriz de hibridación.

Además, mientras que las figuras ilustran el primer codón enrutado hacia el extremo 3', el experto en la técnica apreciará que el primer codón enrutado también puede enrutarse al extremo 5'. Los expertos en la técnica apreciarán además que más de una etapa química puede seguir cada etapa de enrutamiento.

Finalmente, debe señalarse que existen formas alternativas de implementar la presente invención. En consecuencia, las presentes modalidades deben considerarse como ilustrativas y no restrictivas, y la invención no debe limitarse a los detalles dados en la presente descripción, sino que puede modificarse dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Se entiende que la presente descripción anula y reemplaza cualquier descripción de una publicación incorporada en la medida en que exista una contradicción. Las publicaciones discutidas en la presente se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente descripción debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a preceder tal publicación en virtud de una invención previa. Adicionalmente, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación presentes que pueden necesitar ser confirmadas independientemente.

Los siguientes ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: silanización de titanio

Se roscaron dos arandelas de titanio núm. 4 grado 5 (United Titanium, diámetro externo = 0,3125 pulgadas, diámetro interno = 0,125 pulgadas, grosor = 0,032 pulgadas (diámetro externo=7,94 mm, diámetro interno=3,18 mm, grosor=0,81 mm)) con macho para roscar núm. 6-32 (diámetro mayor = 0,136 pulgada (3,45 mm), 32 hilos/pulgada (12,6 hilos/cm), se lavaron con agua, se lavaron con acetona y después se secaron durante 5 minutos. Después, se colocó cada arandela en un tubo eppendorf y se añadió entonces aproximadamente 250 µl de una solución de 115 µl de MPS ([3-(metacriloiloxi)propil]trimetoxisilano de Gelest) y 40 µl de n-butóxido de titanio (Gelest) disuelto en 345 µl de heptano, el tubo se agitó y se colocó boca abajo. Después de aproximadamente 15 minutos, las arandelas se secaron al aire durante 15-30 minutos, se curaron a 99 °C durante 45 minutos, se enjuagaron con acetona para eliminar el exceso de reactivos sin reaccionar y se secaron al aire durante 5 minutos adicionales.

Ejemplo 2: formación de monolito y unión a titanio silanizado

Las arandelas de titanio silanizadas se colocaron en una bolsa de aluminio (Sigma núm. 183385), la bolsa se purgó 5 veces con N_2 y después se cerró. Una mezcla que incluía 3 ml de GMA, 1 ml de EDMA, 3 ml de 1-propanol, 2,4 ml de 1,4-butanodiol y 0,6 ml de agua se roció con N_2 durante aproximadamente 2 minutos, se sonicó durante aproximadamente 10 minutos, momento en el que se añadieron 10 mg de AIBN (2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo) y la mezcla se agitó para disolver el iniciador. La mezcla se sonicó durante 1 minuto adicional, el espacio de cabeza se purgó con N_2 durante aproximadamente 30 segundos, se vertió en la bolsa de aluminio que contenía las arandelas silanizadas y se selló después de eliminar cualquier aire/N_2 residual. Las arandelas se colocaron entre dos placas exteriores de aluminio, lo que aseguró que el polímero solo se formara dentro de los orificios roscados ("pocillos") en las arandelas. El ensamble se colocó horizontalmente en el horno a 60 °C y se incubó durante toda la noche. El ensamble placa/abrazadera se retiró del horno, se dejó equilibrar a temperatura ambiente y se desmontó para proporcionar las arandelas monolíticas. El exceso de monolito se eliminó de los bordes de la arandela.

La arandela monolítica se colocó en una carcasa filtro unida a una jeringa y se lavó con 5 ml de etanol y 5 ml de agua.

Ejemplo 3: silanización de matriz de aluminio 6061

Una placa de aluminio de 3,125 mm de grosor de grado 6061 que se había maquinado para formar una placa de 384 pocillos se lavó con agua del grifo, se enjuagó en agua destilada durante 5 minutos, se lavó en acetona durante 15 minutos y se secó al aire durante 5 minutos. La placa se trató con NaOH al 10 % durante aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 45 °C, se secó para eliminar el exceso de NaOH y se sumergió en solución de HNO_3 al 30 %, hasta que toda la superficie de la placa quedó plateada (1-3 minutos). La placa se enjuagó después con agua destilada, se secó al aire durante aproximadamente 10-60 minutos y se trató con MPS al 30 % en acetona a 60 °C durante 15 minutos, se lavó tres veces en acetona, se secó al aire y se curó a 80 °C durante toda la noche. Después, la placa se lavó con acetona y se secó al aire durante aproximadamente 10-15 minutos.

Ejemplo 4: formación de monolito y unión a una matriz de aluminio 6061 silanizado

La placa de aluminio silanizado preparada en el Ejemplo 3 se colocó en una bolsa de aluminio (Sigma núm. Z183393), la bolsa se purgó 5 veces con N_2 y después se cerró. Una mezcla que incluía 15 ml de GMA, 5 ml de EDMA, 15 ml de 1-propanol, 12 ml de 1,4-butanodiol y 3 ml de agua se roció con N_2 durante aproximadamente 5 minutos, se sonicó durante aproximadamente 10 minutos, momento en el que se añadieron 25-50 mg de AIBN y la mezcla se agitó para disolver el iniciador. La mezcla se sonicó durante 1 minuto adicional, el espacio de cabeza se purgó con N_2 durante aproximadamente 1 minuto, se vertió en la bolsa de aluminio que contenía la placa de aluminio silanizado y se selló después de eliminar cualquier aire/N_2 residual. La placa de aluminio silanizado cerrada se colocó después entre dos bloques exteriores de aluminio que se aseguraron con abrazaderas en C. Esto aseguró que el polímero solo se formara dentro de los orificios maquinados ("pocillos") en la placa. El ensamble se colocó horizontalmente en el horno a 60 °C y se incubó durante toda la noche. El conjunto placa/abrazadera se retiró del horno, se dejó equilibrar a temperatura ambiente y se desmontó para proporcionar la placa de matriz de monolito. El exceso de monolito se eliminó de los bordes de la placa.

La matriz de monolitos se lavó tres veces con entre aproximadamente 30 ml y aproximadamente 40 ml de etanol mediante el uso de vacío (20 psi (1,38 bar) durante entre 10-60 segundos) para extraer el etanol a través de los monolitos unidos a la placa de aluminio. Después, entre aproximadamente 30 µl y aproximadamente 40 µl de etanol se añaden a cada pocillo y se hacen pasar a través del monolito mediante la aplicación de vacío (15-20 psi (1,03-1,38 bar) durante aproximadamente 15 y aproximadamente 20 segundos). Finalmente, se añaden a cada pocillo entre aproximadamente 30 µl y aproximadamente 40 µl de etanol y se hacen pasar a través del monolito mediante centrifugación a 1.000 rpm durante aproximadamente 3 minutos. Después, la matriz de monolitos se lavó con agua de una manera similar. Idealmente, cada monolito en cada pocillo es permeable al solvente. Un solo pocillo impermeable es suficiente para descalificar la matriz para su uso posterior.

Ejemplo 5: apertura con azida del monolito de epóxido de glicidilo unido a la matriz de aluminio 6061

En resumen, se añadieron 20 µl de una solución acuosa de azida sódica (25 mmol en 8 ml de agua y 4,6 ml de ácido acético glacial) a cada pocillo de la matriz de monolitos preparada en el Ejemplo 4 y se hizo pasar a través del monolito mediante el uso de vacío. El procedimiento anterior se repitió una vez, la matriz se transfirió a un baño que contenía la solución de azida anterior, se desgasificó durante aproximadamente cinco minutos, se transfirió a un depósito relleno con la solución de azida anterior, se incubó a 30 °C durante toda la noche, se lavó abundantemente con agua destilada y se almacenó en agua para proporcionar una matriz monolítica funcionalizada con un azido alcohol.

Ejemplo 6: unión de un oligonucleótido a un monolito funcionalizado con azida unido a una matriz de aluminio 6061

Se añadieron 30 µl de solución “clic” que contenía fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0, CuSO4 625 µM, THTTA 3,125 mM (Tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina, Sigma-Aldrich), aminoguanidina-HCl 12,5 mM, NaCl 0,3 mM, ascorbato 12,5 mM, y 1 nmol del oligonucleótido a inmovilizar (estructura general 5'hexinil-TTTTTTTTTT-anticodón, comprado de Eurofins MWG Operon Inc., 2211 Seminole Drive Huntsville, AL 35805) a cada monolito funcionalizado con azido-alcohol en la matriz e incubado durante un total de 1 hora. La solución “clic” se extrajo por centrifugación periódicamente (aproximadamente, cada 15 minutos) del monolito, se rellenó con ascorbato fresco (adición de hasta 3 µl de ascorbato 100 mM), y se volvió a añadir al mismo monolito. Después de 1 hora de incubación, la solución “clic” se extrajo por centrifugación del monolito y la matriz se lavó tres veces con 30 µl de tampón Tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) para quelar el cobre y apagar la reacción. Las matrices funcionalizadas resultantes se almacenaron en EDTA 1 mM, azida al 0,02 % a 4 ºC.

La eficiencia de la química clic para unir el 5'-hexinil-oligo al monolito modificado con azida se evaluó mediante la eliminación del oligo de la solución “clic”. Típicamente, la reacción de prueba, que consiste de concentraciones iguales de dos oligos, un oligo 5'-OH (oligo de referencia) y el oligo 5'-hexinilo (oligo de prueba), se incubó con el monolito en el tampón “clic” durante un total de 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual se extrajo por centrifugación del monolito. La solución “clic” agotada se analizó mediante RP-HPLC en una columna C18 con un gradiente de acetonitrilo (fase móvil A: trietilamina 135 mM, ácido acético glacial 150 mM, acetonitrilo al 5 %; fase móvil B: fase móvil A al 25 %, acetonitrilo al 75 %) que separaba los dos oligos. Las áreas de los picos relativos de los oligos de referencia y de prueba

en las muestras antes y después de la incubación con el monolito se usaron para estimar la proporción de 5'hexinil-oligo que se “clicó” sobre el monolito.

Ejemplo 7: bloqueo con ácido propiólico del monolito funcionalizado con oligonucleótido unido a una matriz de aluminio 6061

Cualquier grupo azida sin reaccionar en la matriz monolítica tratada como en el ejemplo 6 se bloqueó al reaccionar con ácido propiólico como sigue. Se añadieron 30 µl de solución “clic” que contenía fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0, CuSO4 625 µM, 3,125 mM THPTA (Tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina, Sigma-Aldrich), aminoguanidina-HCl 12,5 mM, NaCl 0,3 mM, ascorbato 12,5 mM y ácido propiólico 8 mM a cada monolito funcionalizado en la matriz y se incubó durante un total de 30 minutos. La solución “clic” se extrajo por centrifugación periódicamente (aproximadamente cada 15 minutos) del monolito, se rellenó con ascorbato fresco (adición de hasta 3 µl de ascorbato 100 mM) y volvió a añadirse al mismo monolito. Después de 30 minutos de incubación, la solución 'clic' se extrajo por centrifugación del monolito y la matriz se lavó tres veces con 30 µl de tampón Tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) para quelar el cobre y apagar la reacción. Las matrices tratadas se almacenaron en EDTA 1 mM, azida al 0,02 % a 4 ºC.

Ejemplo 8: silanización de una matriz de aluminio 5038

La silanización se realizó como en el Ejemplo 3, excepto que la placa se trató con NaOH aproximadamente al 10 % durante aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 45 °C.

Ejemplo 9: formación de monolitos y unión a una matriz de aluminio 5038 silanizado

El procedimiento del Ejemplo 5 se usó para proporcionar la matriz de monolitos anterior.

Ejemplo 10: tratamiento uv de arandelas PEEK

Las arandelas se roscaron mediante el uso de un macho para roscar núm. 10-32 (diámetro principal = 0,19 pulgada (4,83 mm), hilos/pulgada = 32 (12,6 hilos/cm)) y se sumergieron en una solución de EDMA:metanol 1:10 en un vial de centelleo. Cada arandela tenía un cono de acero inoxidable en su centro para dispersar la luz UV incidente. Además, se colocaron conos alrededor del lado de la arandela para usar la cara del diámetro exterior como prueba de la fuerza de unión. Los viales se sumergieron después en la solución de EDMA:metanol hasta una altura de aproximadamente 1 cm. Después, las arandelas se irradiaron con luz UV a 302 nm durante 15 minutos desde una distancia de aproximadamente 3 cm, se voltearon e irradiaron nuevamente con luz UV a 302 nm durante 15 minutos desde una distancia de aproximadamente 3 cm, se enjuagaron 3 veces con metanol, se secaron al aire y se almacenaron en una bolsa de aluminio en atmósfera de nitrógeno. Las arandelas se usaron para moldear monolitos de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2.

REIVINDICACIONES

1. Una matriz (T1) para la partición preparativa de una biblioteca de compuestos químicos programada con ácidos nucleicos, la matriz comprende un bloque que incluye dos o más pocillos, en donde dentro de cada pocillo se une covalentemente una columna diferente a la superficie del pocillo mediante la formación de un enlace amida, éster, urea, uretano, carbono-silicio, carbono-nitrógeno, carbono-carbono, éter, tioéter, o disulfuro o por cicloadición;
en donde cada columna es un monolito que incluye un oligonucleótido unido que se une selectivamente a un oligonucleótido complementario unido operativamente a un sitio de reacción química o un ligando, en donde el nucleótido complementario es un componente de una mezcla.

2. La matriz de conformidad con la reivindicación 1, en donde la mezcla incluye diferentes oligonucleótidos unidos operativamente a diferentes sitios de reacción química o ligandos.

3. La matriz de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el bloque comprende titanio, aluminio, acero inoxidable, metales dopados, vidrio, cuarzo, policarbonato, sílice fundida, poli(metacrilato de metilo), plásticos, poliéter éter cetona, poliéter éter cetona dopado, poliestireno dopado, copolímero de olefina cíclica, polieterimida ultem, polipropileno dopado o sus combinaciones; opcionalmente, en donde el bloque se compone de titanio, aluminio, acero inoxidable o metales dopados.

4. La matriz de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde el bloque se compone de aluminio.

5. La matriz de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde cada monolito comprende copolímeros orgánicos.

6. La matriz de conformidad con la reivindicación 5, en donde cada monolito comprende poli(GMA-co-EDMA).

7. La matriz de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde cada columna puede unir entre 0,5 fmol/µl y 0,4 nmol/µl de ácido nucleico monocatenario.

8. La matriz de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde cada oligonucleótido unido está presente en su monolito a una densidad de entre 1 pmol/10 µl y 1 µmol/10 µl.

9. La matriz de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde la constante de velocidad de unión al oligonucleótido complementario del oligonucleótido unido está entre 1×10^2 $M^{-1}s^{-1}$ y 1×10^6 $M^{-1}s^{-1}$.

10. Una matriz de hibridación para la partición preparativa de una biblioteca de compuestos químicos programada con ácidos nucleicos que comprende cinco placas ensambladas de la parte superior a la parte inferior A11, D11, T1, D12 y A12, en donde:
la placa T1 es una matriz de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde cada pocillo es un pocillo direccionable que comprende dicho monolito con dicho oligonucleótido unido, en donde dicho oligonucleótido unido es un compuesto de reconocimiento de anticodón específico;
las placas D11 y D12 comprenden orificios que conectan dichos monolitos con compuestos específicos de reconocimiento anticodón unidos sobre la placa T1 con las ranuras en las caras internas de las placas A11 y A12, en donde las ranuras se conectan a canales a través de los cuales pueden aplicarse presión de aire y vacío;
en donde los diafragmas colocados entre las placas A y D crean una cámara serpentina contínua sellada que consiste de las ranuras en las placas A, los orificios en las placas D y los monolitos en la placa T;
en donde la placa D11 tiene puertos a través de los cuales el líquido puede entrar y salir de la cámara sinuosa; y
en donde las ranuras en las placas A11 y A12 se configuran de manera que la aplicación cíclica apropiada de presión del aire y vacío a los canales en las placas A establece un flujo direccional del líquido en la cámara serpentina.

11. La matriz de hibridación de conformidad con la reivindicación 10, que comprende además miembros de una biblioteca de ADN que contiene el codón apropiado hibridado con el monolito unido al compuesto de reconocimiento de anticodón afín en la matriz de hibridación.

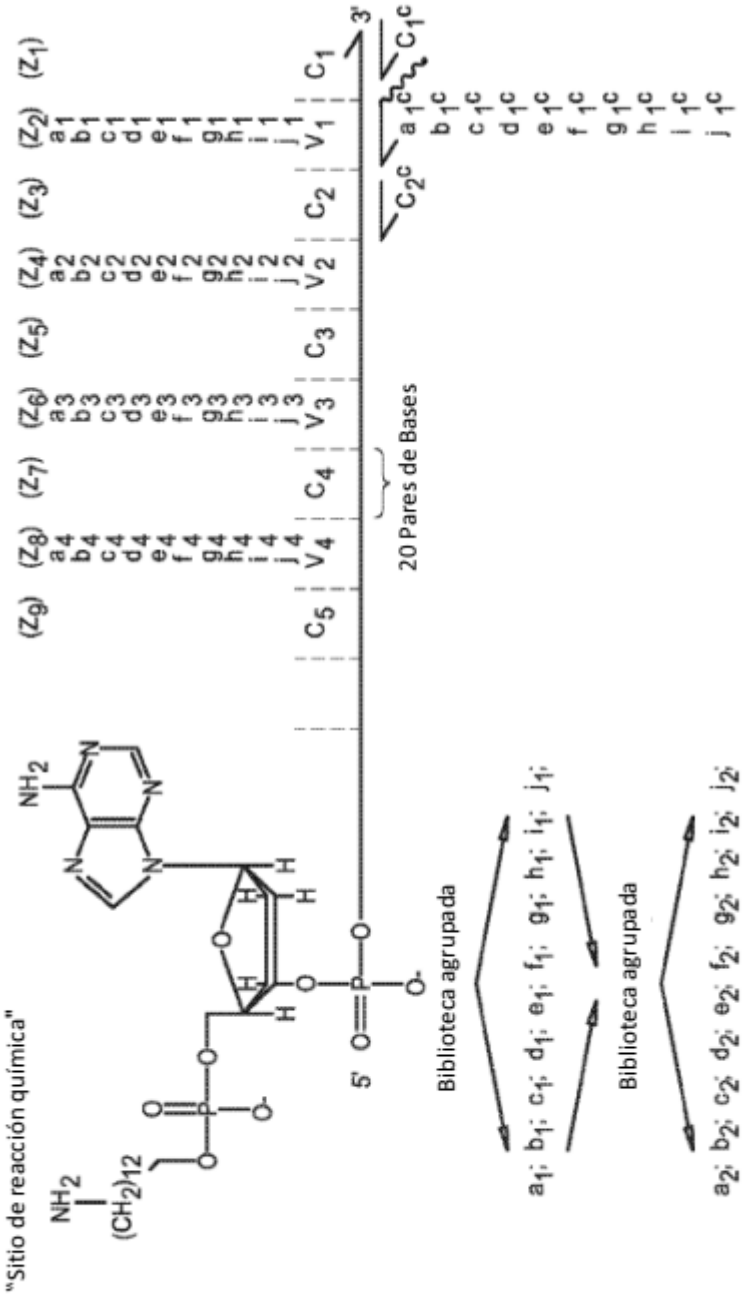

"Sitio de reacción química"
20 Pares de Bases
Biblioteca agrupada
Biblioteca agrupada
5'
3'

FIG. 1

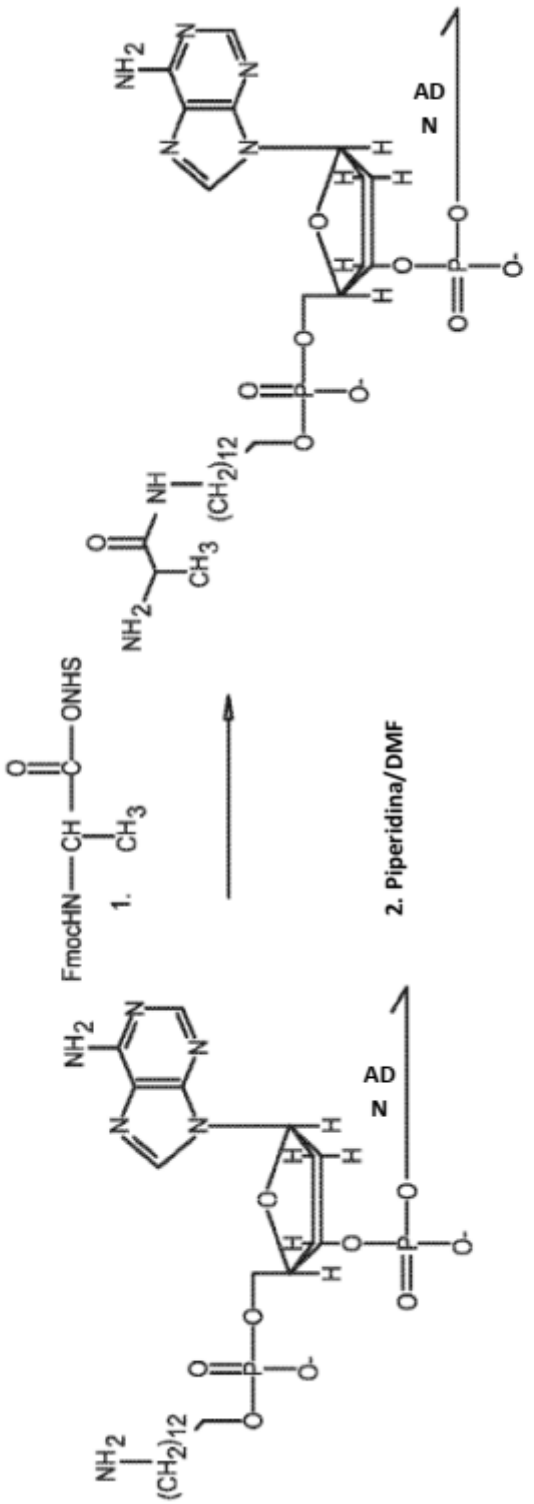

AD
N
NH2
FmocHN—CH—CH3
C=O
ONHS
1.
2. Piperidina/DMF
NH
(CH2)12
CH3
NH2

FIG. 2

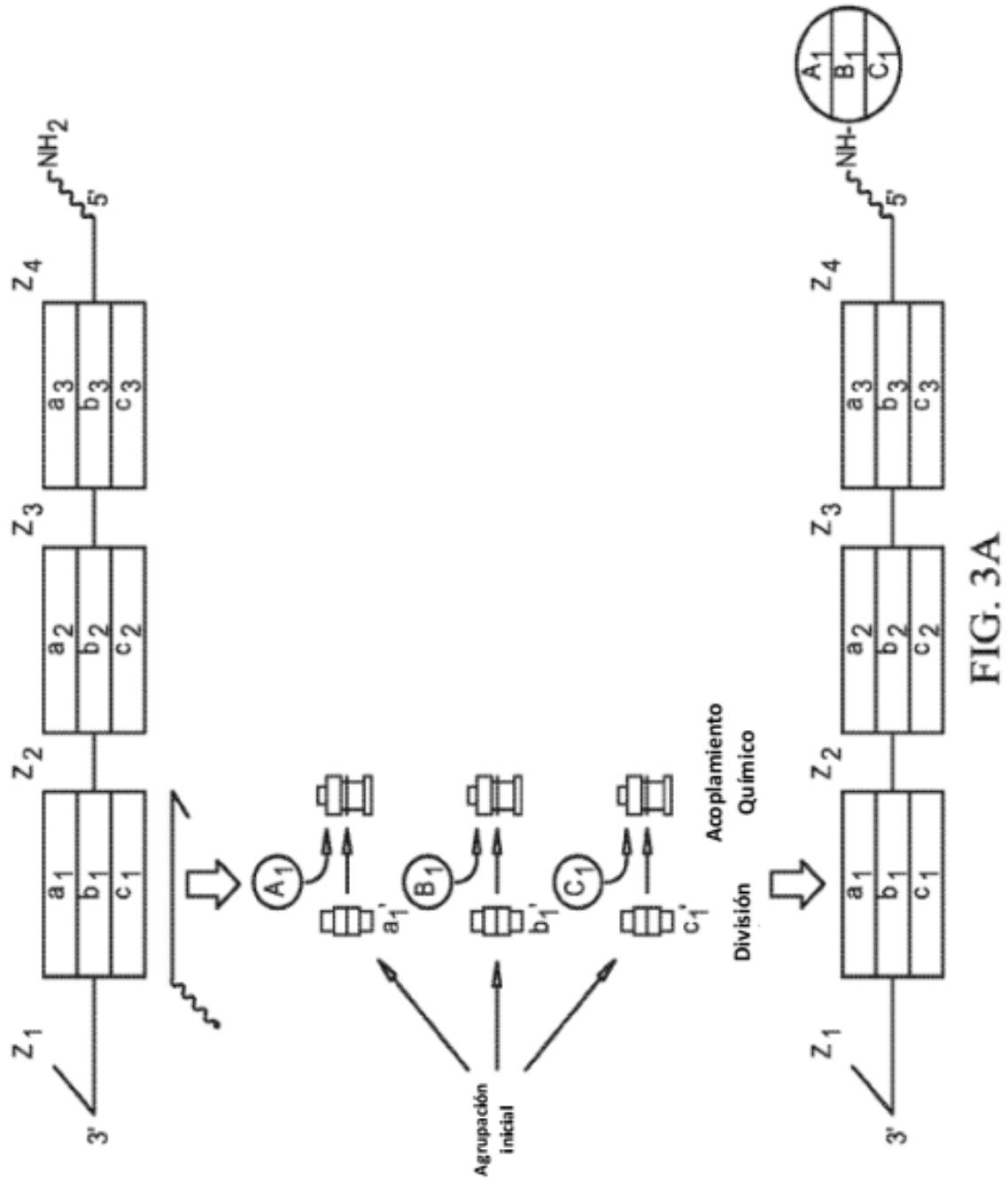

NH2
5'
Z4
a3 b3 c3
Z3
a2 b2 c2
Z2
a1 b1 c1
Z1
3'
A1
B1
C1
a'1
b'1
c'1
Agrupación inicial
División
Acoplamiento Químico
A1 B1 C1
NH
5'
Z4
a3 b3 c3
Z3
a2 b2 c2
Z2
a1 b1 c1
Z1
3'

FIG. 3A

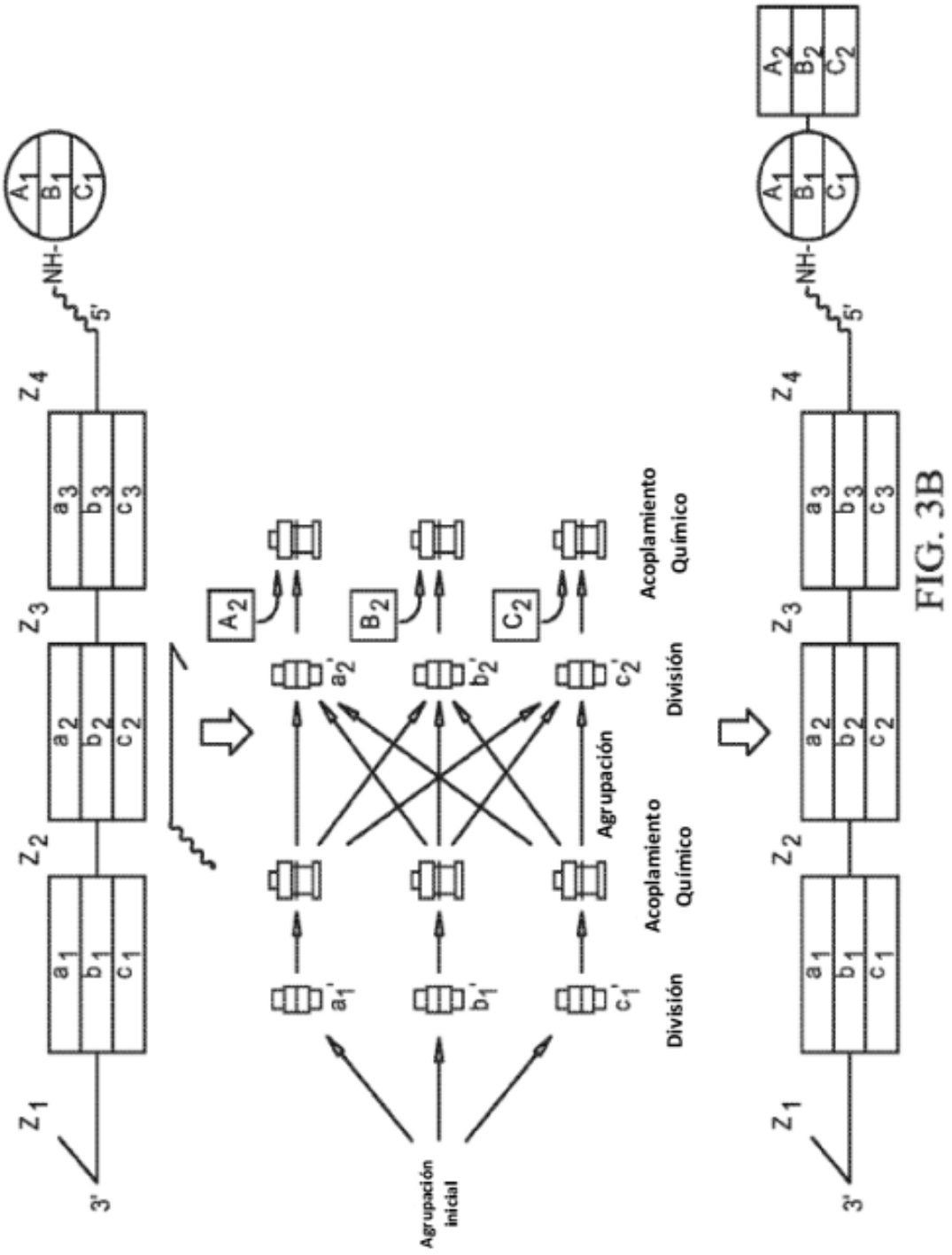

A1
B1
C1
NH-
5'
Z4
a3
b3
c3
Z3
a2
b2
c2
Z2
a1
b1
c1
Z1
3'
Agrupación inicial
a'1
b'1
c'1
Acoplamiento Químico
División
A2
B2
C2
a'2
b'2
c'2
Agrupación
Acoplamiento Químico
División

FIG. 3B

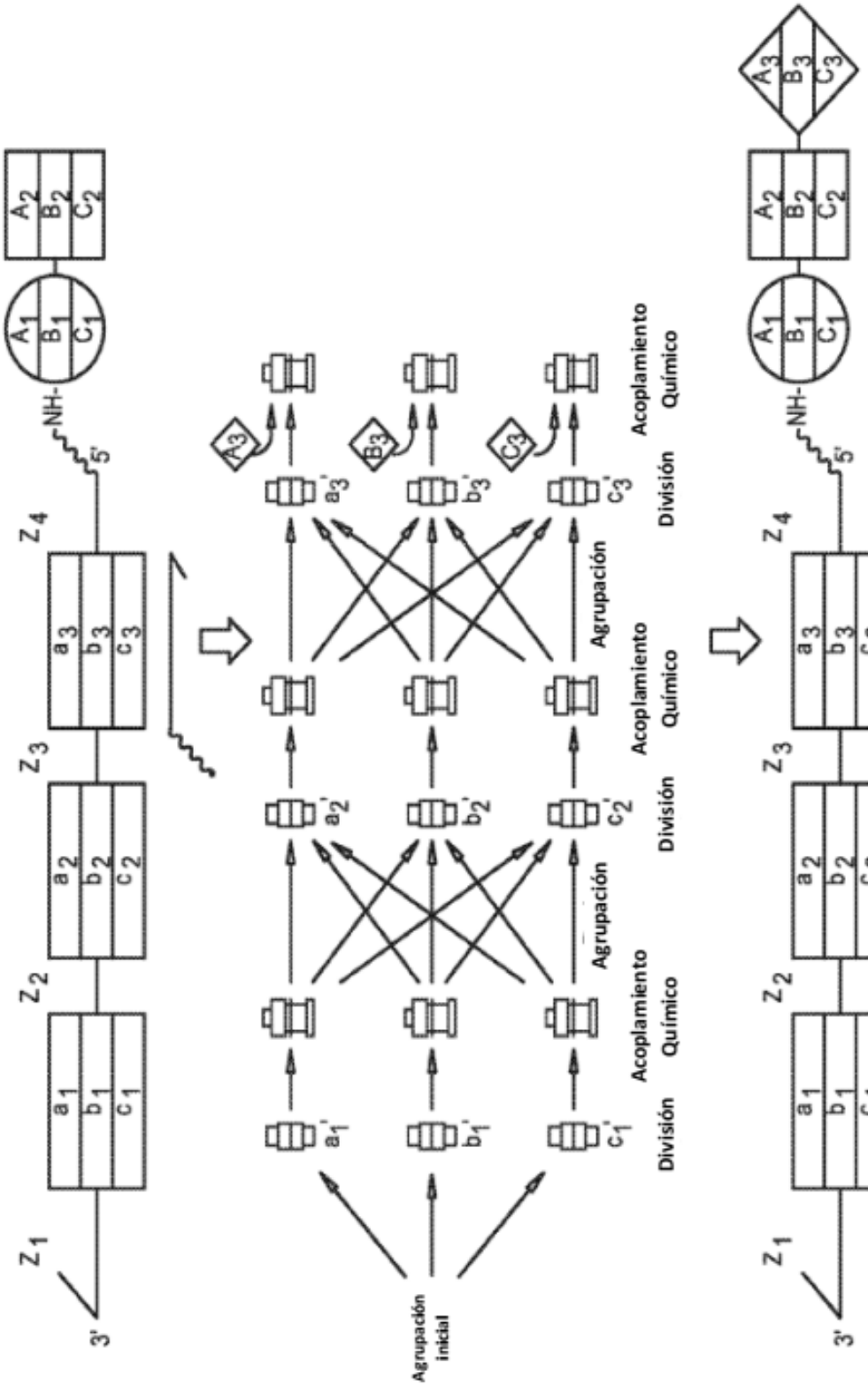

Z1
Z2
Z3
Z4
3'
5'
NH-
Agrupación inicial
Agrupación
Acoplamiento Químico
División

FIG. 3C

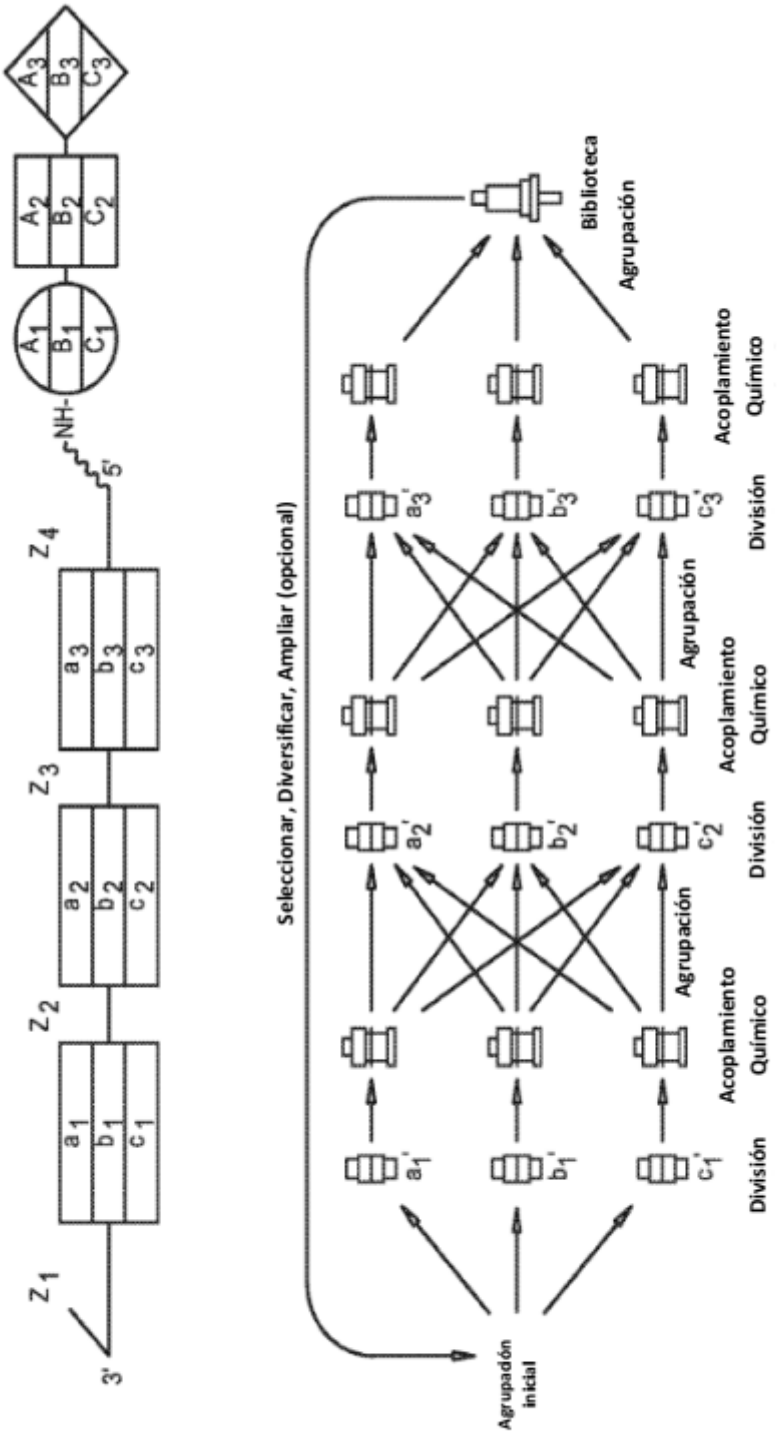

Seleccionar, Diversificar, Ampliar (opcional)
Biblioteca
Agrupación
Agrupación inicial
División
Acoplamiento Químico
Agrupación
Z1
Z2
Z3
Z4
NH-
5'
3'

FIG. 3D

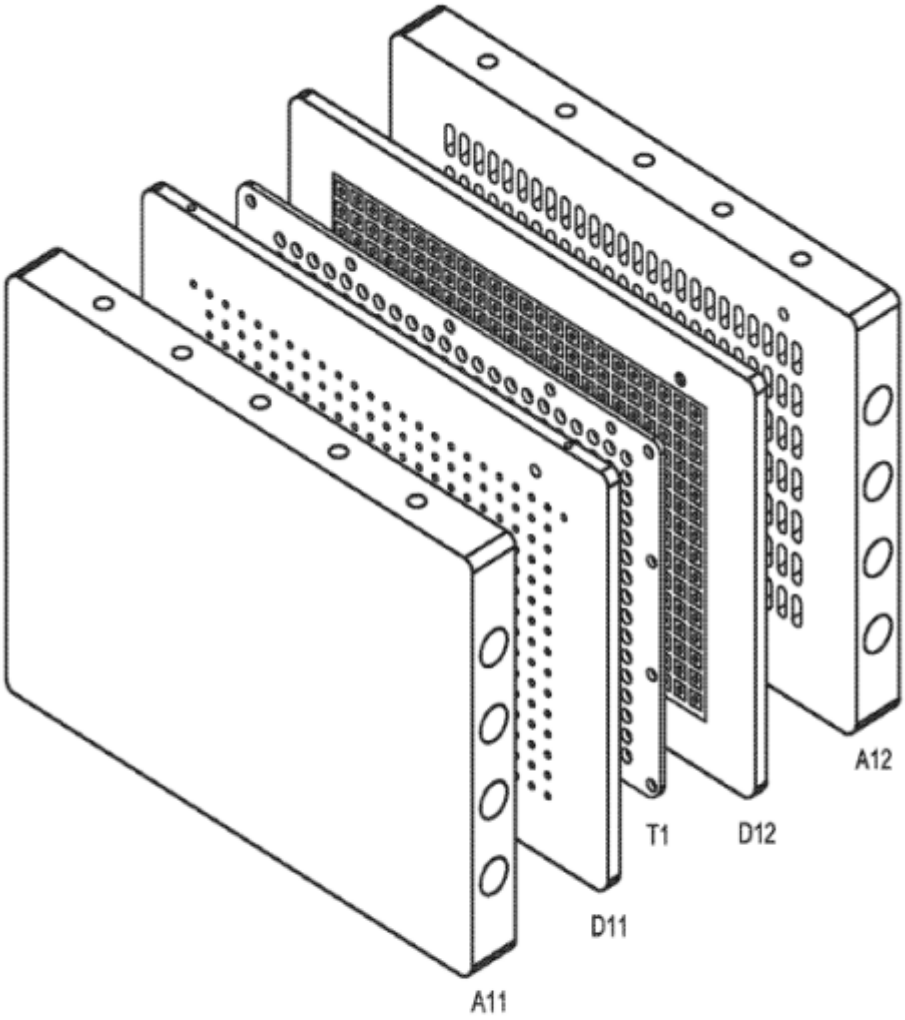


FIG. 4

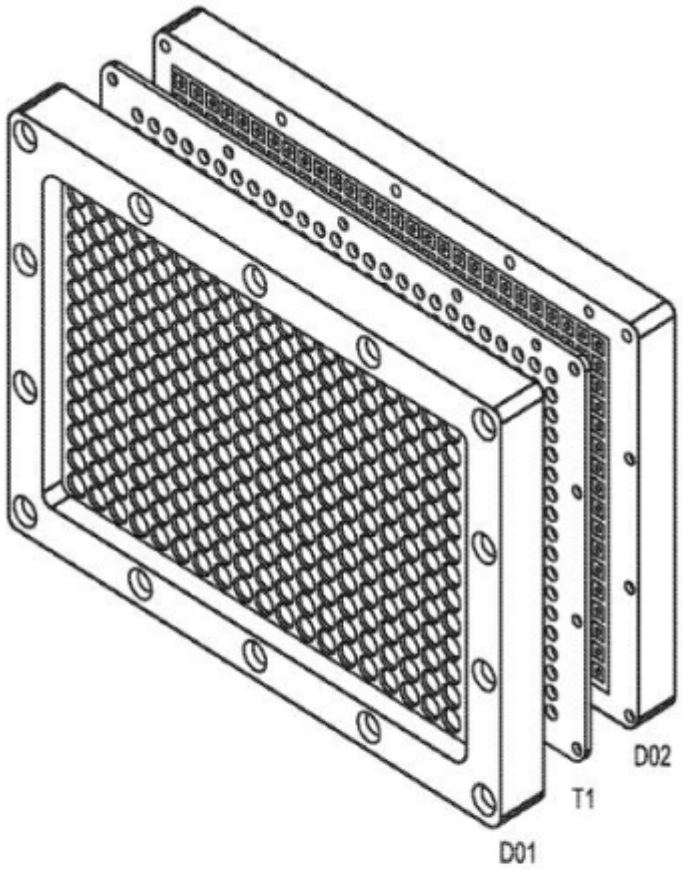


FIG. 5