



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 289 194**

51 Int. Cl.:  
**C07K 1/04** (2006.01)  
**C07B 61/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03003577 .8**  
86 Fecha de presentación : **27.05.1994**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1310510**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.05.2003**

54 Título: **Bibliotecas en fase sólida codificadas, segregadas topológicamente.**

30 Prioridad: **27.05.1993 US 68327**  
**26.05.1994 US 249830**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.02.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.02.2008**

73 Titular/es: **Aventis Pharmaceuticals Inc.**  
**300 Somerset Corporate Boulevard**  
**Bridgewater, New Jersey 08807, US**

72 Inventor/es: **Lebl, Michal;**  
**Lam, Kit S.;**  
**Salmon, Sudney E.;**  
**Krchnak, Victor;**  
**Sevetov, Nikolai y**  
**Kocis, Peter**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 289 194 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Bibliotecas en fase sólida codificadas, segregadas topológicamente.

## 5 1. Campo de la invención

La invención se refiere a bibliotecas de compuestos de ensayo sintéticos unidos a soportes de síntesis de fases separadas. En particular, la invención se refiere a bibliotecas de compuestos de ensayo sintéticos unidos a soportes de síntesis de fases separadas que también contienen secuencias poliméricas codificantes que codifican la estructura del compuesto de ensayo sintético. Cada una de las perlas de soporte de síntesis en fase sólida contiene un único tipo de compuesto de ensayo sintético y una secuencia polimérica codificante individual, única y fácilmente determinable que codifica la estructura del compuesto de ensayo sintético. El compuesto de ensayo sintético puede tener estructuras de cadena principal con enlaces tales como amida, urea, carbamato (es decir, uretano), éster, amino, sulfuro, disulfuro o carbono-carbono, tales como alcano y alqueno, o cualquier combinación de los mismos. Los compuestos de ensayo sintéticos también pueden ser armazones moleculares, tales como derivados de carbohidratos monocíclicos o bicíclicos, esteroides, azúcares, estructuras heterocíclicas, estructuras poliaromáticas u otras estructuras capaces de actuar como armazones. La invención también se refiere a métodos para sintetizar dichas bibliotecas y al uso de dichas bibliotecas para identificar y caracterizar moléculas de interés de entre la biblioteca de compuestos de ensayo sintéticos.

## 20 2. Antecedentes de la invención

El reconocimiento y la unión de ligandos regula casi todos los procesos biológicos, incluyendo el reconocimiento inmune, la señalización y comunicación celular, la transcripción y traducción, la señalización intracelular y la catálisis enzimática. Como resultado, desde hace mucho tiempo hay un interés en la técnica por la identificación de moléculas que puedan usarse de la siguiente manera: para servir como agonistas o antagonistas de ligandos tales como hormonas, factores de crecimiento o neurotransmisores; para inducir inmunidad de células B (mediada por anticuerpos) o células T (mediada por células); para inducir catálisis de reacciones químicas; y para regular la expresión génica a nivel de la transcripción o la traducción. Una razón principal para este interés es el deseo de usar directamente estas moléculas biológicamente activas como fármacos o, si fuera necesario, para convertir estas moléculas en derivados que puedan funcionar como fármacos.

Muchos ligandos biológicos son proteínas o péptidos. Esta lista incluye la mayoría de hormonas, factores de crecimiento, moléculas neuroactivas y epítopos inmunes. Por esta razón, los esfuerzos iniciales para desarrollar agonistas o antagonistas de actividades biológicas mediadas por receptores o enzimas implicaban el diseño y síntesis de péptidos. Sin embargo, los péptidos que se ha descubierto que poseen actividades biológicas deseables a menudo no son adecuados como fármacos. Para convertirse en fármacos, los péptidos a menudo necesitan convertirse en derivados o análogos estructurales, es decir, peptidomiméticos, que, a diferencia de la mayoría de los péptidos, poseen propiedades farmacocinéticas y de estabilidad satisfactorias. Han aparecido muchas publicaciones que describen el desarrollo de peptidomiméticos útiles en medicina o prometedores; algunos ejemplos recientes incluyen Rudy Baum, en *Chemical & Engineering News*, 18 de enero, 1993, página 33; Hirschmann, R. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 9699-9701; Hirschmann, R. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 9217-9218.

El descubrimiento de compuestos biológicamente activos puede ser un proceso difícil, que requiere mucho tiempo, y extremadamente caro. Un problema clave en esta área es la identificación de una única estructura química, de entre una gran cantidad de posibles estructuras relevantes, que posea las propiedades deseadas. Cuando el proceso de descubrimiento emplea una estrategia secuencial de estructura-diseño, síntesis y ensayo biológico, la identificación de una estructura química deseable se vuelve extremadamente laboriosa. Para evitar esta tarea altamente agotadora, pueden prepararse bibliotecas de grandes cantidades de moléculas de diversas estructuras. Idealmente, dichas bibliotecas pueden explorarse y evaluarse rápidamente.

La mayor parte del trabajo en este área de síntesis y exploración de bibliotecas se ha realizado con péptidos, por ejemplo, las estrategias de Geysen (Geysen et al. *Molecular Immunology*, 1986, 23, 709-715; Geysen et al. *J. Immunologic Methods*, 1987, 102, 259-274), Fodor (Fodor et al., *Science*, 1991, 251, 767-773) y Houghten (Houghten et al., *Nature*, 1991, 354, 84-86). Sin embargo, dichas bibliotecas están limitadas en términos de la cantidad de variantes estructurales posibles que pueden prepararse, ensayarse e identificarse en un experimento dado.

La invención de bibliotecas realmente aleatorias de compuestos de ensayo sintéticos poliméricos, en las que una sola especie polimérica que surge de una combinación de subunidades está unida a un único soporte sólido, marcó un avance en el descubrimiento de compuestos biológicamente activos que son péptidos o, aún más importante, peptidomiméticos (véase la solicitud WO-A-9200091).

Los compuestos orgánicos no peptídicos, tales como peptidomiméticos, a menudo pueden sobrepasar a los ligandos peptídicos en afinidad por cierto receptor o enzima. La unión de biotina y avidina, la más estrecha registrada, implica la asociación de una estructura orgánica no peptídica (biotina) con una proteína (avidina). Una estrategia eficaz para identificar rápidamente ligandos biológicos de alta afinidad, y finalmente fármacos nuevos e importantes, requiere la construcción y exploración rápida de diversas bibliotecas de estructuras no peptídicas que contienen diversas unidades estructurales capaces de establecer uno o más tipos de interacciones con un aceptor biológico (por ejemplo, un receptor

o enzima), tales como puentes de hidrógeno, puentes de sales, formación de complejos  $\pi$ , efectos hidrófobos, etc. Sin embargo, el trabajo sobre la generación y exploración de bibliotecas de compuestos de ensayo sintéticos que contienen moléculas no peptídicas está aún en sus comienzos. Un ejemplo de esta área es el trabajo de Ellman y Bunin sobre una síntesis combinatoria de benzodiazepinas sobre un soporte sólido (*J. Am. Chem. Soc.* 114, 10997, (1992); véase *Chemical and Engineering News*, 18 de enero de 1993, página 33).

Un problema clave aún sin resolver en el área de generación y uso de bibliotecas no peptídicas es la resolución de la estructura de moléculas seleccionadas de una biblioteca que muestran una actividad biológica prometedora.

Brenner y Lerner (Brenner, S. y Lerner, R.A. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 1992 89, 5381-5383) han descrito recientemente un intento de descubrir las estructuras de péptidos seleccionados de una biblioteca usando códigos de secuencia de nucleótidos únicos, que se sintetizan en tándem con la biblioteca peptídica. La secuencia de nucleótidos del código unido a cada péptido debe ser amplificable mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, las técnicas de síntesis de nucleótidos no son compatibles con todas las técnicas sintéticas requeridas para la síntesis de muchos tipos de bibliotecas moleculares. Además, la estrecha proximidad del compuesto de ensayo sintético y el nucleótido en la biblioteca, que puede dar como resultado interacciones entre estas moléculas que interfieran con la unión del ligando a un receptor o enzima diana durante el ensayo biológico, limita también este enfoque. El componente nucleotídico de la biblioteca también puede interferir durante ensayos biológicos de diversas maneras diferentes.

Dower *et al.* (documento WO 93/06121) se refieren a un método estocástico para sintetizar bibliotecas de oligómeros aleatorios. Los oligómeros aleatorios se sintetizan sobre soporte sólidos, o partículas, pero pueden escindirse de estos soportes para proporcionar una biblioteca soluble. Los oligómeros se componen de una secuencia de monómeros, siendo los monómeros cualquier miembro del conjunto de moléculas que pueden unirse entre sí para formar un oligómero o polímero, es decir, aminoácidos, carbamatos, sulfonas, sulfóxidos, nucleósidos, carbohidratos, ureas, fosfonatos, lípidos, ésteres, combinaciones de los mismos y similares. Se usa un marcador de identificación para identificar la secuencia de monómeros en el oligómero. El marcador de identificación puede ser cualquier característica reconocible que de algún modo lleva la información requerida, y que es descifrable a nivel de uno o varios soportes sólidos. Los soportes sólidos pueden unirse a los oligómeros y a la marca de identificación por medio de una o más moléculas enlazadoras.

Kerr *et al.* (*J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 2520-2531) presentaron la síntesis de bibliotecas en fase de solución de péptidos, que contenían restos de aminoácidos no naturales, en paralelo con cadenas codificantes de péptidos. El ligando peptídico y su cadena codificante en esta biblioteca se unen de forma covalente entre sí, lo que permite el aislamiento y la determinación de la secuencia de pares de compuesto de ensayo sintético y el código correspondiente. Sin embargo, como ocurre con la biblioteca codificada por ácido nucleico descrita por Brenner y Lerner, *supra*, el péptido codificante puede interferir con el ensayo de selección. Además, los requisitos de purificación de cantidades suficientes de material de la biblioteca con el método de selección de afinidad, para obtener la secuencia de los péptidos codificantes, impide la síntesis de bibliotecas de más de varios miles de especies.

Por lo tanto, en la técnica existe la necesidad de nuevos métodos generales y versátiles para generar y explorar bibliotecas de compuestos que pertenecen a diversas clases químicas. También existe la necesidad de métodos eficaces para aclarar las estructuras de compuestos seleccionados de la biblioteca como resultado de la exploración, cuyas estructuras no pueden determinarse mediante técnicas tradicionales, por ejemplo, degradación de Edman o espectrometría de masas sola. Existe aún otra necesidad en la técnica de un sistema codificante molecular que no interactúe en los ensayos de selección o influya sobre la unión del compuesto de ensayo sintético a través de efectos de proximidad.

La mención o identificación de cualquier referencia en este documento no debe interpretarse como una admisión de que dicha referencia está disponible como técnica anterior de la presente invención.

### 3. Sumario de la invención

El solicitante ha descubierto una biblioteca para identificar y analizar un ligando de un aceptor. La presente invención se refiere a una biblioteca que comprende una multiplicidad de soportes en fase sólida separada; a cada uno de los cuales se une un compuesto de ensayo y una o más moléculas codificantes. El compuesto de ensayo está compuesto por una secuencia de subunidades y cada compuesto de ensayo está unido a cada soporte en fase sólida a través de un enlazador escindible.

Las moléculas codificantes están unidas a cada soporte en fase sólida a través de un enlazador no escindible o escindible por separado.

Las moléculas codificantes están compuestas por alfa-aminoácidos. Además, cada especie de molécula codificante es diferente de la especie de compuesto de ensayo, la secuencia de las subunidades del compuesto de ensayo está codificada por las especies de moléculas codificantes y las moléculas codificantes tienen subunidades dispuestas en un código no secuencial y se segregan topológicamente del compuesto de ensayo que está unido al soporte de modo que la molécula codificante está en el interior del soporte y el compuesto de ensayo está en el exterior del soporte.

La presente invención también se refiere a una biblioteca para identificar un ligando o un aceptor de interés, comprendiendo la biblioteca una multiplicidad de soportes en fase sólida separada, teniendo unida la superficie de cada soporte un enlazador que comprende una sola especie de compuesto de ensayo que tiene una secuencia de subunidades, y teniendo unido el interior de cada soporte una molécula codificante que codifica la secuencia de subunidades del compuesto de ensayo, teniendo el enlazador un enlace que es escindible por una enzima que no escinde una unión de la molécula codificante y comprendiendo la molécula codificante alfa-aminoácidos.

La presente invención también proporciona una biblioteca para identificar un ligando o un aceptor de interés, comprendiendo la biblioteca una multiplicidad de soportes en fase sólida separada, teniendo la superficie de cada soporte un enlazador que comprende una sola especie de compuesto de ensayo que comprende una secuencia de subunidades a la que se une un primer grupo protector, y teniendo unido el interior de cada soporte una molécula codificante que codifica la secuencia de subunidades y a la que se une un segundo grupo protector, siendo el primer grupo protector diferente del segundo grupo protector y comprendiendo la molécula codificante alfa-aminoácidos.

La invención también contempla ensayos de selección para los compuestos, tales como, aunque sin limitación, de actividad enzimática, de actividad de transporte de electrones y fotoactividad, por mencionar algunos.

Se seleccionan soportes sólidos que contienen compuestos que demuestran la actividad de interés en el ensayo de selección. La estructura del compuesto se determina, por ejemplo, mediante espectrometría de masas, espectrometría de resonancia magnética nuclear u otros métodos de espectrometría. Preferiblemente, la biblioteca es una biblioteca codificada, en cuyo caso la estructura del compuesto está codificada por la secuencia de la molécula codificante, que puede determinarse fácilmente.

Los compuestos de la presente invención pueden proporcionar directrices para agentes terapéuticos o de diagnóstico. Más preferiblemente, los propios compuestos pueden ser agentes terapéuticos o de diagnóstico útiles. Los compuestos en soportes de fase separada también pueden ser útiles para el transporte de electrones, por ejemplo, como transistores o semiconductores.

#### 4. Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Estrategias para unir bibliotecas codificadas de compuestos de ensayo sintéticos. Las subunidades del compuesto de ensayo sintético se indican como [NO SEC]; la molécula codificante se indica mediante A-B-C. (A) El compuesto de ensayo y la molécula codificante pueden unirse por separado al soporte directamente o mediante un enlazador, en una distribución estadística que puede alterarse basándose en la acción de las masas y la reactividad intrínseca. (B) El compuesto de ensayo sintético y la molécula codificante pueden unirse al mismo enlazador en el soporte de fase separada, en una proporción molar definida. (C) El compuesto de ensayo sintético se une a la superficie y la molécula codificante se une en el interior de un soporte de fase separada, tal como una perla de resina.

Como alternativa, en (C), la molécula codificante puede estar en la superficie y el compuesto de ensayo en el interior.

Figura 2. Tres formas de una biblioteca modelo codificada en la que tanto el compuesto "de ensayo" (Ala-Phe-Val) como la molécula codificante (Gly-Tyr-Leu) son péptidos. (A) El compuesto "de ensayo" se sintetizó usando el grupo protector Fmoc y la molécula codificante se sintetizó con el grupo protector Boc. Fmoc y Boc son grupos protectores ortogonales. (B) El compuesto "de ensayo" desprotegido con Fmoc se acetiló de modo que solamente podría secuenciarse el péptido codificante mediante degradación de Edman. (C) El péptido codificante se bloqueó con trifluoroacetilo (TFA), permitiendo la secuenciación de Edman del compuesto "de ensayo", seguido de la retirada de TFA y la secuenciación del péptido codificante. Los péptidos se unieron a la resina TentaGel (TG) mediante un enlazador amida de seguridad (SCAL; Patek y Lebl, 1991, Tetrahedron Lett. 32: 3891-3894) con ramificaciones de lisina.

Figura 3. Bibliotecas modelo de armazón ramificado, que muestran diversas químicas de enlace posibles, incluyendo la reacción de una amina con un ácido carboxílico para formar una amida; la reacción de un ácido carboxílico con una amina para formar una amida; y la reacción de un tiol con un halogenuro de alquilo para formar un sulfuro.

Figura 4. Un modelo de interacción de un compuesto de ensayo sintético de armazón con una molécula aceptora. (A) Los grupos funcionales unidos al armazón están libres para asumir una conformación de unión apropiada. (B) Los grupos funcionales del armazón se fuerzan en la conformación de unión apropiada.

Figura 5. Estructuras de algunas de las subunidades que pueden unirse químicamente en estructuras aleatorias para formar las bibliotecas de compuestos de ensayo sintéticos.

Figura 6. Un modelo de biblioteca cíclica formado a partir de reacciones de condensación repetidas con subunidades bloqueadas con Boc y Fmoc.

Figura 7. Un esquema para la preparación de una biblioteca de armazón sobre resina TentaGel en la que el armazón es ciclopentano.

Figura 8. Estructuras de subunidades usadas para preparar una biblioteca de armazón de la invención. El código del dipéptido de aminoácidos de dos letras para cada una de las subunidades se muestra debajo de cada una. La preparación y uso de esta biblioteca se describe en la Sección 9, *infra*.

## 5. Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a bibliotecas de compuestos de ensayo sintéticos unidos a soportes de fase separada, en las que cada soporte de fase separada contiene una sola especie de compuesto de ensayo sintético, y métodos de síntesis y uso de dichas bibliotecas. La expresión “soporte de fase separada” se refiere a una matriz a la que puede unirse el compuesto de ensayo sintético, matriz que no es soluble en un líquido o forma un sistema de dos fases con un líquido. Preferiblemente, la fase separada es una fase sólida, aunque también se contemplan fases separadas tales como hidrogeles y aerogeles.

Como se usa en este documento, la expresión “biblioteca de compuestos de ensayo sintéticos” se refiere a colecciones de compuestos de ensayo sintéticos en partículas de soporte de fase separada en las que cada partícula de soporte de fase separada contiene una sola especie estructural del compuesto de ensayo sintético. Cada soporte contiene muchas copias de la especie estructural individual. Por ejemplo, un soporte de resina típico para la síntesis de péptidos en fase sólida contiene aproximadamente 50-250 pmol de péptido. Las estructuras del compuesto de ensayo sintético se obtienen por una combinación química sustancialmente aleatoria de “subunidades”.

Como se usa en este documento, la expresión “compuesto de ensayo sintético” se refiere a moléculas pequeñas consistentes en 2 a 100, y más preferiblemente 2-20 subunidades, con o sin un armazón. En una realización, el compuesto de ensayo sintético es un polímero formado por subunidades unidas mediante enlaces tales como amida, urea, éster, éter, carbamato, amina, sulfuro, disulfuro, carbono-carbono, tales como alcano, alqueno y alquino, y similares; en particular, el compuesto puede incluir, pero sin limitación, policarbamato, poliurea, poliamida, poliéster, poliéter, etc., o cualquier combinación de los mismos, como se describe con detalle *infra*. En otra realización, un compuesto de ensayo sintético puede ser un armazón molecular funcionalizado aleatoriamente, tal como, aunque sin limitación, un esteroide, estructura heterocíclica, un anillo poliaromático, o estructura de carbohidrato y similares, como se describe con detalle *infra*.

Como se usa en este documento, el término “subunidad” se refiere a un subcomponente químico, con lo que el compuesto de ensayo sintético se forma por enlace de los subcomponentes químicos por una química definida. Por ejemplo, una “biblioteca de péptidos” es una colección de péptidos (el compuesto de ensayo sintético), es decir, cadenas consistentes en 2-100 restos de  $\alpha$ -aminoácidos (las subunidades), cuyas secuencias contienen cualquier resto de aminoácido que precede o sigue a cualquier otro resto de aminoácido. Un ejemplo de una “biblioteca de derivados de esteroides” es una colección de derivados de esteroides que contienen uno cualquiera de un conjunto de grupos funcionales, las subunidades, en posiciones específicas del núcleo del esteroide.

Más preferiblemente, la presente invención se refiere a bibliotecas codificadas de compuestos de ensayo sintéticos. Como se usa en este documento, la expresión “biblioteca codificada” se refiere a una biblioteca en la que cada especie diferente de compuesto se empareja en cada soporte de fase separada con una molécula codificante cuya estructura se determina fácilmente y codifica una única estructura para su compañero en el par de la biblioteca. En una realización preferida de una biblioteca molecular codificada, la molécula polimérica codificante es un péptido. En otra realización, la molécula polimérica codificante es un oligonucleótido.

Los ejemplos de realizaciones de bibliotecas incluyen, pero sin limitación, los siguientes:

bibliotecas en las que el compuesto de ensayo sintético son poliamidas, es decir, el compuesto de ensayo sintético son cadenas de 2-100 aminoácidos unidos a través de enlaces amida;

bibliotecas en las que el compuesto de ensayo sintético son poliésteres, es decir, cadenas de 2-100 hidroxiaácidos unidos mediante enlaces éster;

bibliotecas en las que el compuesto de ensayo sintético son poliéteres, es decir, cadenas de 2-100 hidroxialcoholes unidos mediante enlaces éter;

bibliotecas en las que el compuesto de ensayo sintético son poliureas;

bibliotecas en las que el compuesto de ensayo sintético son poliuretanos;

bibliotecas en las que el compuesto de ensayo sintético son policarbonatos;

bibliotecas en las que el compuesto de ensayo sintético son poliaminas;

bibliotecas en las que el compuesto de ensayo sintético son polialcanos, polialquenos o polialcoholes, incluyendo derivados de halo de los mismos;

bibliotecas en las que el compuesto de ensayo sintético son polisulfuros;

bibliotecas en las que el compuesto de ensayo sintético son polidisulfuros;

bibliotecas en las que el compuesto de ensayo sintético son polímeros cuyas estructuras contienen segmentos dispuestos aleatoriamente de dos o más de las estructuras poliméricas descritas en las realizaciones anteriores;

bibliotecas en las que el compuesto de ensayo sintético son derivados de una estructura esteroidea;

bibliotecas en las que el compuesto de ensayo sintético son derivados de un azúcar tal como  $\beta$ -D-glucosa;

bibliotecas en las que el compuesto de ensayo sintético son derivados de una estructura heterocíclica, tal como benzodiazepina;

bibliotecas en las que el compuesto de ensayo sintético son derivados de una estructura capaz de proporcionar un armazón sobre el cual pueden unirse múltiples estructuras tales como, pero sin limitación, ácidos carboxílicos, aminas y derivados de halógeno de una manera definida;

bibliotecas en las que las moléculas son estructuras quiméricas que contienen una o más secuencias de longitud variable unidas mediante una química seleccionada entre una o más de las siguientes: amidas, ésteres, éteres, carbonatos, sulfuros, disulfuros, alquenos y aminas, y una o más estructuras capaces de actuar como armazones, tales como un esteroide, un azúcar, una estructura aromática o poliaromática.

Muchas subunidades diferentes para las diferentes clases de compuestos de ensayo sintéticos están disponibles en el mercado de proveedores tales como Sigma, Aldrich, ICI Chemicals, etc. Como alternativa, pueden prepararse de forma sintética subunidades usando técnicas de síntesis química convencionales.

En una realización preferida, las bibliotecas mostradas anteriormente son bibliotecas codificadas en las que cada soporte de fase separada contiene un compuesto de ensayo sintético y una secuencia polimérica que codifica la estructura del compuesto de ensayo sintético. Preferiblemente, la secuencia polimérica codificante es un péptido.

### 5.1 Estrategias de codificación

Como se ha indicado anteriormente, en un aspecto preferido, las bibliotecas de la invención son bibliotecas codificadas en las que la secuencia de una molécula codificante en cada soporte corresponde a la estructura del compuesto de ensayo sintético en cada soporte. De esta manera, cada estructura del compuesto de ensayo sintético única está codificada por una única secuencia de molécula codificante. Como se ha indicado *supra*, preferiblemente la molécula codificante es un péptido, aunque la presente invención incluye el uso de ácidos nucleicos o cualquier polímero secuenciable como secuencia codificante.

El paradigma de una secuencia codificante es el código genético, donde la secuencia de tripletes de nucleótidos en un gen corresponde a un aminoácido específico en una proteína codificada por el gen. La disposición de codones en un gen corresponde a la secuencia de aminoácidos de una proteína. De esta manera, el gen codifica la proteína.

Siguiendo esta analogía, la codificación de la secuencia de una biblioteca de compuestos de ensayo sintéticos, tal como una poliamida cuya secuencia no puede establecerse por métodos tradicionales (por ejemplo, degradación de Edman), con una molécula codificante puede conseguirse fácilmente usando un código análogo. La elección del código es totalmente arbitraria, incluyendo combinaciones sencillas, dobles o triples (o mayores) de subunidades de la molécula codificante que corresponden a cada subunidad del compuesto de ensayo sintético.

Por ejemplo, la molécula codificante puede ser un péptido. En este caso, se consideran especialmente útiles códigos que consisten en uno o más restos de aminoácidos que pueden detectarse fácilmente mediante degradación de Edman, y también se sabe que se acoplan de forma eficaz en síntesis de péptidos en fase sólida sin requerir protección de cadenas laterales. Por ejemplo, si se usa un código de tripletes basado en los aminoácidos leucina (Leu), glicina (Gly), alanina (Ala) y fenilalanina (Phe) (de los que ninguno requiere protección de la cadena lateral y se acoplan eficazmente durante la síntesis de péptidos y además son fácilmente detectables mediante la degradación de Edman), pueden sintetizarse bibliotecas de compuestos de ensayo sintéticos que contienen hasta sesenta y cuatro subunidades estructuralmente diferentes, con cada subunidad emparejada con un único péptido que contiene tripletes de Leu, Gly, Ala o Phe (correspondiendo cada triplete a una y solamente una subunidad en la poliamida), usando reacciones químicas adecuadas. Otros aminoácidos preferidos, es decir, aquellos que no requieren protección de la cadena lateral incluyen, pero sin limitación, isoleucina, valina, ciclohexil-L-alanina, norleucina, norvalina, prolina y similares. Se prefieren menos la asparagina y glutamina. En otra realización, cada uno de los 20 aminoácidos naturales puede codificar una subunidad específica. Una sola subunidad de secuencia codificante o codón puede codificar más de una subunidad del compuesto de ensayo sintético, dando como resultado un código degenerado, aunque esto no es necesario.

La presente invención proporciona diversas estrategias para aumentar la probabilidad de que los ensayos de selección reconozcan compuestos de ensayo sintéticos activos en lugar de las moléculas codificantes en un soporte dado, que se describen en la Sección 5.3, *infra*.

### 5.2 Métodos para generar una biblioteca de compuestos de ensayo sintéticos

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención se refiere a un método para generar una biblioteca de compuestos de ensayo sintéticos en soportes de fase separada. Preferiblemente, la biblioteca es una en la que cada compuesto de ensayo sintético se empareja con una única molécula codificante, por ejemplo, un péptido, cuya secuencia codifica la estructura del compuesto de ensayo sintético unido al mismo soporte y puede determinarse fácilmente usando técnicas analíticas tradicionales, por ejemplo, degradación de Edman.

Si los compuestos de ensayo sintéticos son armazones moleculares funcionalizados, el armazón o un precursor del armazón se unirá al soporte en fase sólida antes del comienzo de la síntesis.

La síntesis de bibliotecas de compuestos de ensayo sintéticos comprende la repetición de las siguientes etapas:

- (i) dividir el soporte seleccionado en una cantidad de porciones que es al menos igual a la cantidad de subunidades diferentes a unir;
- (ii) unir químicamente una y solamente una de las subunidades del compuesto de ensayo sintético con una y solamente una de las porciones del soporte sólido de la etapa (i), preferiblemente asegurándose de que la reacción formadora del enlace químico se completa en el mayor grado posible;
- (iii) mezclar minuciosamente las porciones del soporte sólido que contienen el compuesto de ensayo sintético en crecimiento;
- (iv) repetir las etapas (i) a (iii) una cantidad de veces igual a la cantidad de subunidades en cada uno de los compuestos de ensayo sintéticos de la biblioteca deseada, haciendo crecer de este modo el compuesto de ensayo sintético; y
- (v) retirar cualquier grupo protector usado durante el ensamblaje del compuesto de ensayo sintético sobre el soporte sólido.

Preferiblemente, se sintetiza una molécula codificante en paralelo con el compuesto de ensayo sintético. En este caso, antes o después de unir la subunidad del compuesto de ensayo sintético al soporte en la etapa (ii), se unen una o más subunidades de la molécula codificante, que corresponde(n) a la subunidad añadida del compuesto de ensayo sintético, a la molécula codificante en crecimiento de modo que se crea un único código estructural (véase la Sección 5.1, *supra*), que corresponde a la estructura del compuesto de ensayo sintético en crecimiento, sobre cada soporte. Puede entenderse fácilmente que si se prepara una biblioteca codificada, la síntesis de la subunidad o subunidades codificantes debe preceder a la etapa de mezcla, (iii).

La repetición de las etapas (i)-(iii) (véase la etapa (iv)) dará como resultado de forma natural el crecimiento del compuesto de ensayo sintético y, si el proceso se modifica para incluir la síntesis de una molécula codificante, la molécula codificante en paralelo con el compuesto de ensayo. El brazo de ensayo y el brazo codificante se usan en este documento para referirse al compuesto de ensayo sintético sintetizado sobre el soporte y, si estuviera presente, a la molécula codificante sintetizada en el soporte, respectivamente.

La presente invención incluye la modificación de cualquiera de las etapas del procedimiento anterior. Por ejemplo, se obtendrá una biblioteca diferente, y ocasionalmente deseable si la etapa (ii) se cambia para implicar la unión de la misma subunidad polimérica a todas las porciones del soporte sólido. En este caso, la prolongación del polímero codificante necesita modificarse de forma análoga.

En otra realización, si se prolonga el mismo polímero en el brazo de ensayo que en el brazo codificante, el brazo codificante no necesita prolongarse más allá del punto requerido para codificar una subunidad no secuenciable del compuesto de ensayo sintético, siempre que se conozca la historia de la síntesis, por ejemplo, se conozca la cantidad de subunidades.

En otra realización de la invención, el soporte sólido usado para realizar la síntesis de un compuesto de ensayo sintético que es un polímero corto se derivatiza con una o más de las subunidades del polímero antes de su uso en la síntesis de una biblioteca.

En una realización, se usan suficientes partículas de soporte para que exista una alta probabilidad de que cualquier estructura posible del compuesto de ensayo sintético esté presente en la biblioteca. Dicha biblioteca se denomina biblioteca "completa". Para asegurar una probabilidad alta de representación de todas las estructuras, se requiere el uso de una cantidad de soportes en exceso, por ejemplo, cinco veces mayor, veinte veces mayor, etc., de acuerdo con la estadística, tales como estadística de Poisson, de la cantidad de especies posibles de compuestos. En otra realización, especialmente donde la cantidad de estructuras posibles supera la cantidad de soportes, no todas las estructuras posibles se representan en la biblioteca. Dichas bibliotecas "incompletas" también son muy útiles.

En una realización adicional, una biblioteca puede tener un compuesto de ensayo sintético cuyas estructuras incluyan una secuencia polimérica deseable, descubierta como resultado de explorar otra biblioteca añadida antes de la

generación de la biblioteca o al final de la generación de la biblioteca. Dicha biblioteca se prepara sintetizando un soporte sólido que contiene la secuencia polimérica deseable y usando este soporte derivatizado como soporte sólido para la síntesis de la nueva biblioteca. Como alternativa, puede sintetizarse una porción del compuesto de ensayo sintético de la biblioteca seguido de la síntesis de la secuencia polimérica deseable como una prolongación de los compuestos de ensayo en todos los soportes de fase separada. Como alternativa, la secuencia deseable puede ser discontinua y estar incluida dentro de la biblioteca aleatoria.

### 5.3 Desarrollo y uso de soportes y enlazadores de síntesis de fase separada en la síntesis de bibliotecas moleculares codificadas

#### 5.3.1 Soportes y enlazadores útiles en la síntesis de bibliotecas moleculares codificadas

Un soporte de fase separada adecuado para uso en la presente invención se caracteriza por las siguientes propiedades: (1) insolubilidad en fases líquidas usadas para la síntesis o exploración; (2) capacidad de movilidad en tres dimensiones independientemente de los demás soportes; (3) contener muchas copias de cada uno de los compuestos de ensayo sintéticos y, si estuviera presente, la secuencia codificante unida al soporte; (4) compatibilidad con las condiciones de ensayo de selección; y (5) ser inerte a las condiciones de reacción para la síntesis de un compuesto de ensayo y para la síntesis de la molécula codificante. Un soporte preferido tiene también grupos funcionales reactivos, tales como hidroxilo, carboxilo, amino, tiol, etc., para unirse a una subunidad que es un precursor de cada uno de los compuestos de ensayo sintéticos y moléculas codificantes, o para unirse a un enlazador que contiene uno o más grupos reactivos para la unión del monómero u otro precursor de la subunidad.

Como se usa en este documento, un soporte de fase separada no se limita a un tipo específico de soporte. En su lugar, están disponibles y son conocidos por un especialista en la técnica una gran cantidad de soportes. En un aspecto preferido, el soporte de fase separada es un soporte en fase sólida, aunque la presente invención incluye el uso de semisólidos, tales como aerogeles e hidrogeles. Los soportes en fase sólida incluyen geles de sílice, resinas, películas plásticas derivatizadas, perlas de vidrio, algodón, perlas de plástico, geles de alúmina, polisacáridos tales como Sepharose y similares, etc. Un soporte en fase sólida adecuado puede seleccionarse basándose en el uso final deseado y su idoneidad para diversos protocolos de síntesis.

Por ejemplo, en la síntesis de poliamida, el soporte en fase sólida útil puede ser resinas tales como poliestireno (por ejemplo, resina PAM obtenida en Bacher Inc., Peninsula Laboratories, etc.), resina POLYHIPE<sup>®</sup> (obtenida en Aminatech, Canadá), resina de poliamida (obtenida en Peninsula Laboratories), resina de poliestireno injertada con polietilenglicol (TentaGel<sup>®</sup>, Rapp Polymere, Tubingen, Alemania) o resina de polidimetil-acrilamida (obtenida en Milligen/Biosearch, California). En una realización preferida para la síntesis de péptidos y otras poliamidas, el soporte en fase sólida preferido es resina de polidimetil-acrilamida. A continuación se describen soportes de síntesis en fase sólida preferidos para síntesis específicas. Por ejemplo, en una realización de modelo específica, *infra*, puede derivatizarse un soporte tal como el que se usa en la síntesis peptídica de Merrifield mediante un aminoácido protegido con Fmoc, que se prolonga a través de ciclos sintéticos posteriores para dar el "compuesto de ensayo sintético" de poliamida, y un aminoácido protegido con Ddz o Boc, que se prolonga para dar el péptido codificante. A continuación se describen otras derivatizaciones secuenciales. De este modo, cada perla de resina se funcionaliza para contener tanto compuesto de ensayo sintético como las estructuras codificantes correspondientes, cuyas cantidades relativas dependen de las condiciones de reacción para unir los primeros aminoácidos protegidos con Fmoc y Ddz (o Boc). En una variación de este enfoque, el compuesto de ensayo sintético y las moléculas codificantes se unen al soporte sólido a través de enlazadores tales como los que se describen a continuación.

Los soportes de la invención también pueden comprender enlazadores o una disposición de enlazadores. Como se usa en este documento, un enlazador se refiere a cualquier molécula que contiene una cadena de átomos, por ejemplo, carbono, nitrógeno, oxígeno, etc., que sirve para unir las moléculas a sintetizar en el soporte con el soporte. El enlazador se une habitualmente al soporte mediante un enlace covalente, antes de que comience la síntesis en el soporte, y proporciona uno o más sitios para la unión de precursores de las moléculas a sintetizar en el soporte. Pueden usarse diversos enlazadores para unir los precursores de moléculas a sintetizar al soporte en fase sólida. Los ejemplos de enlazadores incluyen ácido aminobutírico, ácido aminocaproico, ácido 7-aminoheptanoico, ácido 8-aminocaprílico, lisina, ácido iminodiacético, polioxietileno, ácido glutámico, etc. En una realización más, los enlazadores pueden comprender adicionalmente una o más  $\beta$ -alaninas u otros aminoácidos como espaciadores.

En otra realización, el "enlazador amida de seguridad" (SCAL) (véase Patek, M. y Lebl, M. 1991, Tetrahedron Letters 32: 3891-3894; Publicación de Patente Internacional WO 92/18144, publicada el 29 de octubre de 1992) se introduce en el soporte.

Además de los enlazadores descritos anteriormente, pueden emplearse enlazadores escindibles de forma selectiva, preferiblemente para la unión de la molécula del compuesto de ensayo sintético. Un ejemplo es el enlazador sensible a luz ultravioleta, ONb, descrito por Barany y Albericio (1985, J. Ala. Chem. Soc. 107: 4936-4942). Se encuentran otros ejemplos de enlazadores fotoescindibles en Wang (1976, J. Org. Chem. 41: 32-58), Hammer *et al.* (1990, Int. J. Pept. Protein Res. 36: 31-45) y Kreib-Cordonier *et al.* (1990, en "Peptides - Chemistry, Structure and Biology", River y Marshall, eds., págs. 895-897). Landen (1977, Methods Enzym. 47: 145-149) usó ácido fórmico acuoso para escindir enlaces Asp-Pro; este enfoque se ha usado para caracterizar determinantes de células T junto con el método de síntesis de las varillas de Geysen (Van der Zee *et al.*, 1989, Eur. J. Immunol. 191: 43-47). Otros enlazadores potenciales

escindibles en condiciones básicas incluyen los que se basan en ácido *p*-(hidroximetil)benzoico (Atherton *et al.*, 1981, J. Chem. Soc. Perkin I: 538-546) y ácido hidroxiaacético (Baleaux *et al.*, 1986, Int. J. Pept. Protein Res. 28: 22-28). Geysen *et al.* (1990, J. Immunol. Methods 134: 23-33; Publicación Internacional WO 90/09395, publicada el 23 de agosto de 1990) presentaron la escisión de péptidos mediante un mecanismo de dicetopiperazina. Se describen enlaces de dicetopiperazina preferidos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de serie 07/919.454 presentada el 24 de julio de 1991, que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. También pueden ser útiles enlazadores escindibles con enzimas. Una enzima puede escindir de forma específica un enlazador que comprende una secuencia reconocida por la enzima. De esta manera, los enlazadores que contienen secuencias peptídicas adecuadas pueden escindirse mediante una proteasa y los enlazadores que contienen secuencias de nucleótidos adecuadas pueden escindirse por una endonucleasa. En algunos casos, puede derivatizarse una porción (por ejemplo, 10-90%) de los grupos funcionales de la resina disponibles con un enlazador escindible usando ciertas condiciones de la reacción, y el resto de los grupos funcionales de la resina con un enlazador que es estable a las condiciones de escisión para asegurar que permanecerá suficiente material en la resina después de la escisión para el estudio adicional. Esta disposición se prefiere particularmente cuando no existe molécula codificante. También pueden usarse combinaciones de enlazadores escindibles en diferentes condiciones de reacción para permitir la escisión selectiva de moléculas de una sola perla de soporte sólido.

Preferiblemente, puede usarse un enlazador escindible para liberar el compuesto de ensayo sintético, o una porción del mismo, para ensayarlo en un ensayo de selección. En este caso, la secuencia codificante, si estuviera presente, se une al soporte en fase sólida mediante un enlazador no escindible.

Un enfoque para la síntesis de bibliotecas codificadas implica enlazar los precursores del compuesto de ensayo sintético y moléculas codificantes de la biblioteca entre sí mediante un enlazador ramificado que también sirve para unir los dos precursores al soporte sólido. Dependiendo de la estructura del enlazador, cualquier molécula o las dos moléculas pueden separarse del soporte sólido para un estudio adicional. Un ejemplo de este enfoque de anclaje del compuesto de ensayo sintético y las moléculas codificantes es usar TentaGel derivatizado con Lys(SCAL).

Un enlazador de soporte en fase sólida para uso en la presente invención puede comprender además una molécula de interés, que puede derivatizarse adicionalmente para dar una biblioteca molecular. La molécula unida previamente puede seleccionarse de acuerdo con los métodos descritos en este documento o puede comprender una estructura que se sabe que proporciona propiedades deseadas.

La presente invención incluye el uso de una serie de enlazadores unidos al soporte sólido en una o muchas disposiciones. Por ejemplo, puede unirse un grupo lisina carboxilo a un enlazador SCAL que está unido al soporte en fase sólida, produciendo de este modo un soporte funcionalizado con un enlazador lisina-SCAL. En otra realización, puede unirse una lisina al soporte en fase sólida mediante un enlazador de polietilenglicol. También puede unirse un enlazador SCAL en un soporte sólido a un grupo amino de un enlazador diamina, mientras que el otro grupo amino puede usarse directamente para un acoplamiento adicional. En otra realización más, puede unirse un enlazador escindible a uno de los grupos amino de una lisina unida a un soporte, mientras que el otro grupo amino se usa sin modificación adicional. Los acoplamientos específicos a cada grupo amino de un enlazador de lisina pueden realizarse usando grupos protectores ortogonales.

En una realización específica, *infra*, puede acilarse SCAL unido a TentaGel con lisina, cuyos grupos amino están protegidos con Fmoc y Boc; el soporte resultante es TentaGel con el enlazador Boc-Lys(Fmoc)-SCAL que puede desprotegerse secuencialmente para proporcionar dos grupos amino únicos que, por ejemplo, después de acilaciones con dos conjuntos diferentes de aminoácidos, pueden convertirse en anclajes para dos poliamidas. La acilación de uno de los grupos amino del resto de lisina del enlazador con Boc-Lys(Fmoc) proporciona un nuevo enlazador con un total de tres anclajes amino potenciales (después de la desprotección secuencial) y la acilación de los dos grupos amino de la lisina del enlazador mediante Boc-Lys(Fmoc) proporciona un nuevo enlazador con un total de cuatro anclajes amino potenciales.

### 5.3.2 Topología del anclaje de compuestos de ensayo sintéticos y moléculas codificantes en la superficie de soportes sólidos

Se contemplan diversos enfoques para separar topológicamente el compuesto de ensayo sintético y las moléculas codificantes en un soporte sólido para generar bibliotecas.

La separación topológica del compuesto de ensayo sintético y la molécula codificante se refiere a la separación en el espacio para un soporte. Por ejemplo, si el soporte es una perla de resina, la separación puede ser entre la superficie y el interior de la perla de resina de una cantidad significativa de las moléculas candidatas a ligando de una cantidad significativa de las moléculas codificantes. Preferiblemente, la superficie del soporte contiene principalmente moléculas de compuesto de ensayo sintético y muy pocas moléculas codificantes. Más preferiblemente, la superficie del soporte contiene más de 90% de compuesto de ensayo sintético. Aún más preferiblemente, la superficie del soporte contiene más de 99% de moléculas de compuesto de ensayo sintético; más preferiblemente, contiene más de 99,9% de compuesto de ensayo sintético. La ventaja de dicha disposición es que limita la interferencia de la molécula codificante en un ensayo de selección de unión (véase la Sección 5.6, *infra*). No es necesario que el área topológica que contiene la secuencia codificante, es decir, el interior de una perla de resina, esté libre del compuesto de ensayo sintético.

En el ejemplo anterior, la molécula codificante se segrega en el interior de la partícula de soporte. También se contempla que la molécula codificante puede segregarse a la superficie de una partícula de soporte, o a un lado de una partícula de soporte.

5 Un enfoque general para la separación topológica de compuesto de ensayo sintético de las moléculas codificantes implica la derivatización selectiva de los sitios reactivos del soporte basándose en la accesibilidad diferencial de los sitios de acoplamiento para reactivos y disolventes. Por ejemplo, las regiones de baja accesibilidad en una perla de resina son el interior de la perla, por ejemplo, diversos canales y otras cavidades. La superficie de una perla de resina, que está en contacto con las moléculas de la solución en la que se suspende la perla, es una región de accesibilidad  
10 relativamente alta. Los métodos para realizar el enlace selectivo de precursores de compuesto de ensayo sintético y codificantes a un soporte en fase sólida adecuado incluyen, pero sin limitación, los siguientes.

(i) Derivatización selectiva de superficies de soporte sólido mediante fotólisis controlada: Pueden usarse dos enfoques. En uno, un soporte sólido funcionalizado se protege con un grupo protector fotoescindible, por ejemplo, nitroveratriloxicarbonilo (Nvoc) (Patchornik *et al.*, 1970, J. Am. Chem. Soc. 92: 6333). Las partículas de soporte derivatizadas con Nvoc se disponen en una formación de monocapa en una superficie adecuada. La monocapa se fotolisa usando luz de intensidad controlada de modo que el área de la perla con más probabilidad de desprotegerse por la luz será el área de la perla en contacto más directo con la luz, es decir, la superficie exterior de la perla. Las perlas parcialmente desprotegidas resultantes se lavan minuciosamente y se hacen reaccionar con un precursor del compuesto de ensayo sintético que contiene un grupo protector estable a la luz. Por ejemplo, en el caso de la síntesis de una biblioteca codificada de poliamidas, este precursor puede ser un aminoácido protegido con Boc, que a través de ciclos de síntesis adicionales se convierte en el compuesto de ensayo sintético de poliamida. Después de la reacción con el precursor del compuesto de ensayo sintético, las perlas se someten a fotólisis cuantitativa para retirar los grupos protectores sensibles a la luz restantes, exponiendo de este modo los grupos funcionales en entornos menos accesibles a la luz, por ejemplo, el interior de una perla de resina. Después de esta fotólisis cuantitativa, las partículas de soporte se derivatizan adicionalmente con un precursor protegido ortogonalmente de la molécula codificante, por ejemplo, un aminoácido protegido con Fmoc. La perla de soporte sólido resultante finalmente contendrá compuestos de ensayo sintéticos segregados principalmente en la superficie externa y moléculas codificantes situadas en el interior de la perla de soporte en fase sólida.  
20  
25  
30

Una técnica fotolítica alternativa para segregar moléculas de compuesto de ensayo sintético y codificantes en un soporte implica derivatizar el soporte con un enlazador ramificado, del que una ramificación es fotoescindible y unir el precursor de la molécula codificante a la ramificación fotosensible del enlazador. Una vez que use completa la síntesis, las perlas de soporte se disponen en una formación de monocapa y se fotolisan como se ha descrito anteriormente. Esta fotólisis proporciona perlas que contienen parches de moléculas de compuesto de ensayo sintético para la exploración selectiva con mínima interferencia de las moléculas codificantes.  
35

(ii) Derivatización selectiva de superficies de soporte sólido usando enfoques químicos o bioquímicos. La eficacia de estas derivatizaciones químicas y bioquímicas depende de la capacidad de los grupos funcionales de la superficie externa, que están expuestos, para reaccionar más rápido que otros grupos en el interior que no están expuestos. Se ha observado, por ejemplo, que los anticuerpos no pueden unirse a ligandos peptídicos en el interior de un soporte en fase sólida de resina. Por lo tanto, usando diferencias en el impedimento estérico impuesto por la estructura del soporte o modulando la hinchazón de una perla a través de la elección del disolvente de reacción, pueden hacerse reaccionar grupos reactivos del exterior de la perla que son accesibles a macromoléculas o a ciertos reactivos de forma selectiva con respecto a grupos reactivos en el interior de la perla. Por lo tanto, los grupos reactivos en el exterior de la perla pueden modificarse para la síntesis del compuesto de ensayo sintético, mientras que los grupos reactivos del interior pueden modificarse para la prolongación de las moléculas codificantes, o tanto de las moléculas codificantes como del compuesto de ensayo sintético. Puesto que la cantidad de grupos reactivos dentro de una perla de resina es mucho mayor que la cantidad de grupos en la superficie externa, el número real de moléculas codificantes será muy grande, proporcionando las suficientes moléculas codificantes para un análisis de secuencia preciso, y por lo tanto la decodificación de la estructura del compuesto de ensayo sintético. Se contemplan diversos enfoques químicos y bioquímicos, incluyendo los siguientes:  
40  
45  
50

(a) El uso de agentes de desprotección poliméricos para desproteger de forma selectiva partes del exterior de una perla de soporte sólido que lleva grupos funcionales protegidos. Los grupos funcionales desprotegidos se usan como anclajes para el compuesto de ensayo sintético. Los grupos funcionales que permanecen protegidos se desprotegen posteriormente usando un agente desprotector no polimérico y se usan como anclajes para la unión de las moléculas codificantes. En una realización específica, este método implica el uso de enzimas para activar de forma selectiva grupos situados en el exterior de perlas que se han derivatizado con un sustrato enzimático adecuado. Debido a su tamaño, las enzimas están excluidas del interior de la perla. En un ejemplo, *infra*, una enzima retira completamente un sustrato de la superficie de una perla de resina, sin afectar de forma significativa a la cantidad total de sustrato unido a la perla, es decir, el interior de la perla. La retirada de sustrato expone, y por lo tanto activa, un sitio reactivo de la perla. Los grupos modificados con enzima del soporte sólido se usan para anclar el compuesto de ensayo sintético y los grupos que escaparon a la modificación se usan para anclar la mayoría de las moléculas codificantes.  
55  
60  
65

(b) Uso de un grupo protector polimérico para bloquear de forma selectiva grupos funcionales no protegidos expuestos en el exterior de una perla de soporte. Los grupos funcionales no protegidos en el interior del soporte se usan para anclar la molécula codificante. El resto de los grupos funcionales protegidos se desprotegen después y se

usan como anclajes para el compuesto de ensayo sintético de la biblioteca. En un ejemplo específico, *infra*, el polímero ácido poliglutámico con un PM de 30 kd, bloquea completamente los grupos funcionales accesibles de la superficie sin afectar a la cantidad total de péptido unido a la perla. Si el polímero usado para el bloqueo se une mediante su grupo  $\alpha$ -carboxilo, después una degradación de Edman de una sola etapa realizada después de la desprotección del grupo  $\alpha$ -amino del polímero puede regenerar los grupos amino de la superficie.

(c) Creación de un estado diferente en el interior de la perla, por ejemplo, congelando agua dentro de las perlas, y después haciendo reaccionar las perlas en un disolvente orgánico a baja temperatura para mantener el agua congelada. De esta manera, la superficie de la perla, pero no el interior, puede hacerse reaccionar de forma específica.

#### 5.4 Estrategia para realizar síntesis alternativas de moléculas de los compuestos de ensayo codificantes y sintéticas durante la generación de bibliotecas codificadas

Una operación sintética importante durante la síntesis de una biblioteca codificada implica el uso de grupos protectores ortogonales. Para la síntesis eficaz de las moléculas codificantes en paralelo con la síntesis del compuesto de ensayo sintético de la biblioteca sobre la misma partícula de soporte sólido, los grupos protectores usados para cada síntesis deben ser ortogonales, es decir, durante todas las operaciones sintéticas sobre una molécula los grupos protectores de la otra molécula deben permanecer intactos.

Pueden usarse diversas combinaciones ortogonales de grupos protectores para la unión del compuesto de ensayo sintético y las moléculas codificantes de una biblioteca molecular. Se describen grupos protectores útiles en Geiger y König, 1981, "The Peptides" (Gross y Meinhofer, eds.) págs. 3-101, Academic Press: New York). Una combinación muy útil implica grupos protectores escindibles con base y ácido. Por ejemplo, para la síntesis de una biblioteca codificada de poliamidas, puede usarse el grupo protector de  $N^\alpha$ -[(9-fluorenilmetil)oxi]carbonilo (Fmoc-) sensible a base para unir las moléculas del compuesto de ensayo sintéticas, y puede usarse el grupo protector de  $N^\alpha$ -[[2-(3,5-dimetoxifenil)prop-2-il]oxi]carbonilo (Ddz) lábil al ácido para unir las moléculas de péptidos codificantes. Los grupos protectores de Fmoc y su uso en la síntesis de péptidos se han descrito por Carpino y Han (1972, J. Org. Chem. 37: 3403-3409) y los grupos protectores de Ddz se han descrito por Voss y Birr (*Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1981, 362, 717-725). Los dos tipos de grupos protectores se han usado tradicionalmente para bloquear los grupos  $\alpha$ -amino de  $\alpha$ -aminoácidos durante la síntesis de péptidos; sin embargo, otros grupos amino adecuados pueden protegerse por estos grupos durante la síntesis de una poliamida. Si las poliamidas de interés contienen cadenas laterales con grupos funcionales reactivos, puede ser útil la protección de los grupos reactivos como derivados de *t*-butoxicarbonilo (Boc) y *t*-butilo (*t*-Bu), o preferiblemente, como los derivados bencilo y benciloxicarbonilo más estables con ácido. Si los grupos reactivos de cadena lateral se protegen usando grupos de tipo *t*-butilo, el péptido codificante puede sintetizarse usando un grupo protector que es más lábil al ácido que Ddz, tal como Nps (Zervas *et al.*, 1963, J. Am. Chem. Soc. 85: 3660) o Trt (Zervas *et al.*, 1956, J. Am. Chem. Soc. 78: 1359).

Una combinación alternativa de grupos protectores ortogonales en la síntesis de una biblioteca codificada de poliamidas implica el uso de Fmoc u otros grupos lábiles a la base para unir los péptidos codificantes y Ddz u otros grupos lábiles al ácido para unir los candidatos de unión a ligandos.

Una combinación ortogonal alternativa de grupos protectores para la síntesis alterna y paralela de moléculas codificantes y compuestos de ensayo sintéticos implica tricloroetoxicarbonilo como un grupo protector de amina y tricloroetilo como un grupo protector de hidroxilo, que pueden retirarse usando un agente reductor tal como cinc en ácido acético, por ejemplo, para la síntesis de poliésteres en una biblioteca codificada de poliésteres, y Boc y *t*-Bu u otro grupo escindible con ácido para la síntesis de péptidos codificantes. Como antes, los dos conjuntos de grupos protectores ortogonales pueden ser intercambiables, es decir, se usan aminoácidos protegidos con  $N^\alpha$ -tricloroetoxicarbonilo para preparar los péptidos codificantes y se usan monómeros protegidos con  $N^\alpha$ -Boc para preparar las poliamidas de los compuestos de ensayo sintéticos.

Una combinación útil adicional de grupos protectores ortogonales implica el grupo trimetilsililetoxicarbonilo, que puede retirarse con iones fluoruro, y un grupo protector muy sensible a ácido tal como Ddz o Bpoc (2-Bifenil-2-propoxicarbonilo). Puede usarse cualquier tipo de grupo protector para la *N*-protección durante la unión de cualquier poliamida, en una síntesis de bibliotecas de poliamida codificadas, o el péptido codificante.

Para la síntesis de las moléculas codificantes de péptidos en bibliotecas codificadas preferidas, se usarán las técnicas bien conocidas de síntesis de péptidos en fase sólida incluyendo estrategias de grupos protectores adecuados. La técnica publicada pertinente de síntesis de péptidos es muy extensa e incluye entre otros Stewart y Young, 1984, "Solid Phase Synthesis", Segunda Edición, Pierce Chemical Co., Rockford Il.; Bodanszky, Y. Klausner, y M. Ondetti, "Peptide Synthesis", Segunda Edición, Wiley, New York, 1976; E. Gross y J. Meienhofer (editores), "The Peptides", vol. 1, serie continuada, Academic Press, New York, 1979.

#### 5.5 Bibliotecas específicas de compuestos de ensayo y métodos de síntesis de las mismas

A continuación se describen tipos específicos de engarces para las bibliotecas indicadas en la sección 5 así como reacciones sintéticas que pueden usarse para generar estas bibliotecas, es decir, reacciones que se usan para realizar la etapa (ii) del procedimiento general para generar bibliotecas (véase la sección 5.2). Como puede apreciarse fácilmente por un especialista en la técnica a partir del análisis anterior y del siguiente material ejemplar, puede usarse

5 cualquiera de las numerosas reacciones de condensación conocidas en la química sintética que puede realizarse por etapas con grupos de protección adecuados para preparar las bibliotecas de la invención. La lista de subunidades que pueden usarse para preparar tales bibliotecas es extensa; pueden obtenerse muchos reactivos en el mercado o pueden sintetizarse usando protocolos bien conocidos. Una lista parcial de estructuras de subunidades adecuadas se muestra en la Figura 5. Los ejemplos de reacciones sintéticas se describen en las siguientes subsecciones y Esquemas.

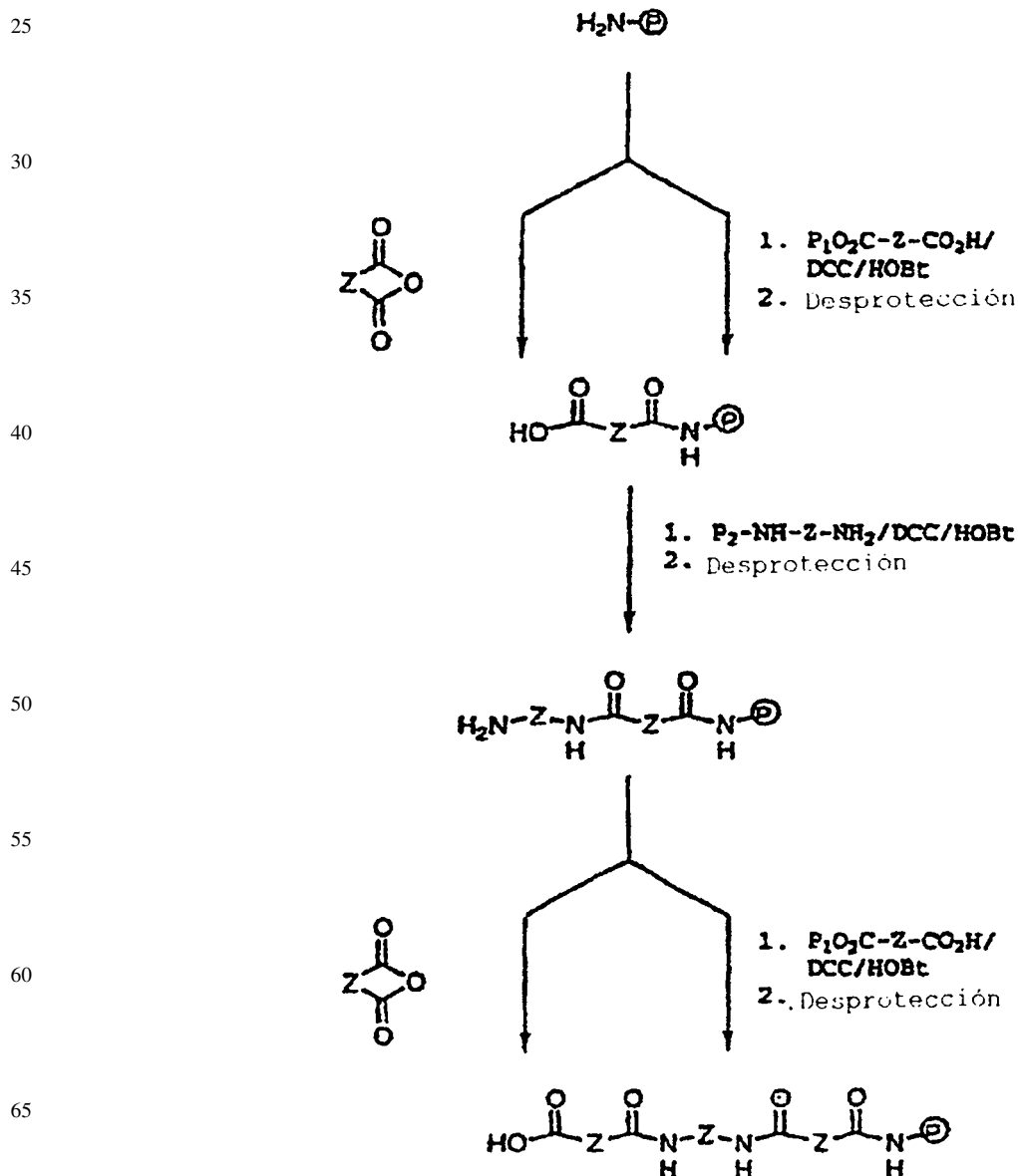
10 En los Esquemas de este documento, Z es cualquier grupo alquilo, arilo, heteroalquilo o heteroarilo, que contiene uno o más grupos incluyendo, pero sin limitación, H, -NH<sub>2</sub>, -OH, CO<sub>2</sub>H, -CO<sub>2</sub>R, -CONHR y similares. El término alquilo se refiere a un hidrocarburo saturado o insaturado, de C<sub>1</sub> a C<sub>20</sub>. El término arilo se refiere a un hidrocarburo aromático de C<sub>5</sub> a C<sub>20</sub>. P con un círculo se refiere a un soporte de fase separada, por ejemplo, un gránulo de resina. P (sin un círculo) se refiere a un grupo protector. El resto de símbolos tienen su significado convencional.

15 Estas estrategias pueden emplearse para preparar bibliotecas codificadas usando grupos protectores ortogonales adecuados como se ha descrito anteriormente.

5.5.1. *Bibliotecas que contienen enlaces amida con subunidades distintas de α-aminoácidos*

20 Se contempla una diversidad de bibliotecas que contienen uno o más enlaces amida, incluyendo bibliotecas de poliamidas cuyas estructuras contienen aminoácidos distintos de α-aminoácidos. El Esquema 1 muestra una estrategia sintética para poliamidas:

Esquema I



## ES 2 289 194 T3

Un soporte sólido adecuado, tal como uno de los soportes descritos en la sección 5.2, se acopla con un anhídrido de ácido carboxílico en un disolvente adecuado para dar un soporte de amida del ácido carboxílico. El ácido-amida soportado se prolonga adicionalmente por activación del grupo carboxilo, usando un compuesto tal como diciclohexilcarbodiimida (DCC) en presencia de hidroxibenzotriazol (HOBt), seguido de condensación con una diamina que contiene un grupo amino protegido; la desprotección del producto de condensación da una diamida-amina sobre el soporte sólido. La repetición de este ciclo sintético, es decir, la reacción secuencial con un anhídrido, la condensación con una diamina protegida unitaria y la desprotección, producen una poliamida que se desarrolla sobre el soporte sólido. Si la secuencia de poliamidas completa contiene grupos protectores, se desprotege sin separarse del soporte sólido.

Un procedimiento de síntesis alternativa de poliamidas implica la modificación de la síntesis anterior por reemplazo del anhídrido por un ácido dicarboxílico parcialmente protegido, por ejemplo, un semi-éster del ácido dicarboxílico adecuado. La resina de amida de éster resultante se desprotege y se activa, por ejemplo, con DCC/HOBt antes de la condensación con la diamina.

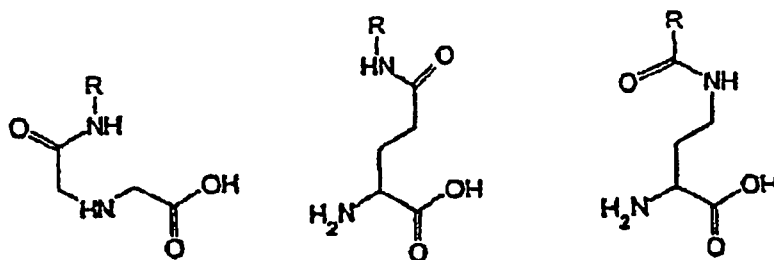
Para la síntesis de poliamidas sintéticas de los compuestos de ensayo cuyas estructuras contienen  $\alpha$ -aminoácidos, tales como péptidos y miméticos de péptidos, pueden usarse las técnicas de síntesis de péptidos descritas anteriormente.

En una realización, puede incluirse piroglutamato como el resto N-terminal de las poliamidas de ensayo sintéticas de la biblioteca.

En una realización adicional, se elegirán subunidades que confieran propiedades químicas y estructurales útiles para la incorporación en una secuencia de poliamidas sintéticas de ensayo. En particular, la presente invención prevé la preparación de bibliotecas de poliamidas que tienen propiedades estructurales mejor definidas que los péptidos nativos. En otra realización, una biblioteca de poliamidas puede generarse de manera que incorpore un enlace peptídico reducido, es decir,  $R_1-CH_2-NH-R_2$ , donde  $R_1$  y  $R_2$  son restos o secuencias de aminoácidos. Un enlace peptídico reducido puede introducirse como una subunidad dipéptido. Tal molécula será resistente a la hidrólisis del enlace peptídico, por ejemplo, a la actividad proteasa. Tales bibliotecas pueden proporcionar ligandos con función y actividad únicas comparadas con las de los péptidos nativos correspondientes, tales como semi-vidas *in vivo* prolongadas debido a la resistencia a la ruptura metabólica, o actividad proteasa.

Una poliamida forzada, cíclica o rígida puede prepararse de acuerdo con el método descrito anteriormente, *dado que*, en al menos dos posiciones de la secuencia de todos los compuestos de ensayo sintéticos, se insertan subunidades, por ejemplo, aminoácidos, que proporcionan grupos funcionales químicos que pueden reticularse para forzar, ciclar o hacer rígida la poliamida después del tratamiento para formar un reticulado. Los ejemplos de aminoácidos que pueden reticular un péptido son cisteína para formar disulfuros, ácido aspártico para formar una lactona o una lactama, y un quelante tal como ácido  $\gamma$ -carboxil-glutámico (Gla) (disponible en el mercado, por ejemplo, en Bachem) para quelar un metal de transición y formar un reticulado. El ácido  $\gamma$ -carboxil-glutámico protegido puede prepararse modificando la síntesis descrita por Zee-Cheng y Olson (1980, *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 94: 1128-1132). Una biblioteca en la que la secuencia de poliamidas comprende al menos dos subunidades que pueden reticularse puede tratarse, por ejemplo, por oxidación de restos de cisteína para formar un disulfuro o adición de un ión metálico para formar un quelado, para reticular el péptido y formar un péptido forzado, cíclico o rígido. Los motivos rígidos se describen con detalle en la Solicitud de Estados Unidos con N° de serie 07/717.454, presentada el 19 de junio de 1991.

Algunos aminoácidos simples que pueden usarse como subunidades para la incorporación en una biblioteca incluyen los siguientes:



Pueden usarse aminoácidos no clásicos durante la síntesis de poliamidas. Los siguientes aminoácidos no clásicos pueden incorporarse en una biblioteca de poliamidas con el fin de introducir motivos conformacionales particulares: 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato (Kazmierski *et al.*, 1991, *J. Am. Chem. Soc.* 113: 2275-2283); (2S,3S)-metil-fenilalanina, (2S,3R)-metil-fenilalanina, (2R,3S)-metil-fenilalanina y (2R,3R)-metil-fenilalanina (Kazmierski y Hruby, 1991, *Tetrahedron Lett.*); ácido 2-aminotetrahidronaftaleno-2-carboxílico (Landis, 1989, Ph. D. Thesis, Universidad de Arizona); hidroxil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato (Miyake *et al.*, 1984, *J. Takeda Res. Labs.* 43: 53-76);  $\beta$ -carbolina (D y L) (Kazmierski, 1988, Ph. D. Thesis, Universidad de Arizona); HIC (ácido histidina isoquinolina carboxílico) (Zechel *et al.*, 1991, *Int. J. Pep. Protein Res.* 38: 131-138).

Los siguientes análogos de aminoácidos y peptidomiméticos pueden incorporarse en la biblioteca del compuesto de ensayo sintético para inducir o favorecer estructuras secundarias específicas: LL-Acp (ácido LL-3-amino-2-propenidona-6-carboxílico), un análogo dipeptídico inductor de giro  $\beta$  (Kemp *et al.*, 1985, *J. Org. Chem.* 50: 5834-5838); análogos inductores de lámina  $\beta$  (Kemp *et al.*, 1988, *Tetrahedron Lett.* 28: 5081-5082); análogos inductores de giro  $\beta$  (Kemp *et al.*, 1988, *Tetrahedron Lett.* 29: 5057-5060); análogos inductores de hélice  $\alpha$  (Kemp *et al.*, 1988, *Tetrahedron Lett.* 29: 4935-4938); análogos inductores de giro  $\gamma$  (Kemp *et al.*, 1989, *J. Org. Chem.* 54: 109:115); y análogos proporcionados por las siguientes referencias: Nagai y Sato, 1985, *Tetrahedron Lett.* 26: 647-650; DiMaio *et al.*, 1989, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* pág. 1687; también un análogo de giro Gly-Ala (Kahn *et al.*, 1989, *Tetrahedron Lett.* 30: 2317); isómero de enlace amida (Jones *et al.*, 1988, *Tetrahedron Lett.* 29: 3853-3856); tetrazol (Zabrocki *et al.*, 1988, *J. Am. Chem. Soc.* 110: 585-5880); DTC (Samanen *et al.*, 1990, *Int. J. Protein Pep. Res.* 35: 501-509); y los análogos mostrados en Olson *et al.*, 1990, *J. Am. Chem. Soc.* 112: 323-333 y Garvey *et al.*, 1990, *J. Org. Chem.* 56: 436.

La presente invención proporciona adicionalmente la modificación o derivatización de poliamidas de los compuestos de ensayo sintéticos en una biblioteca tal como la descrita en la Solicitud de Estados Unidos con N° de serie 07/717.454, presentada el 19 de junio de 1991. Las modificaciones de péptidos son bien conocidas por un especialista en la técnica, e incluyen fosforilación, sulfatación, carboximetilación y acilación. Las modificaciones pueden realizarse por medios químicos o enzimáticos. Ya que tales modificaciones pueden producir péptidos no secuenciables, se prefiere el uso de una molécula codificante en tales bibliotecas.

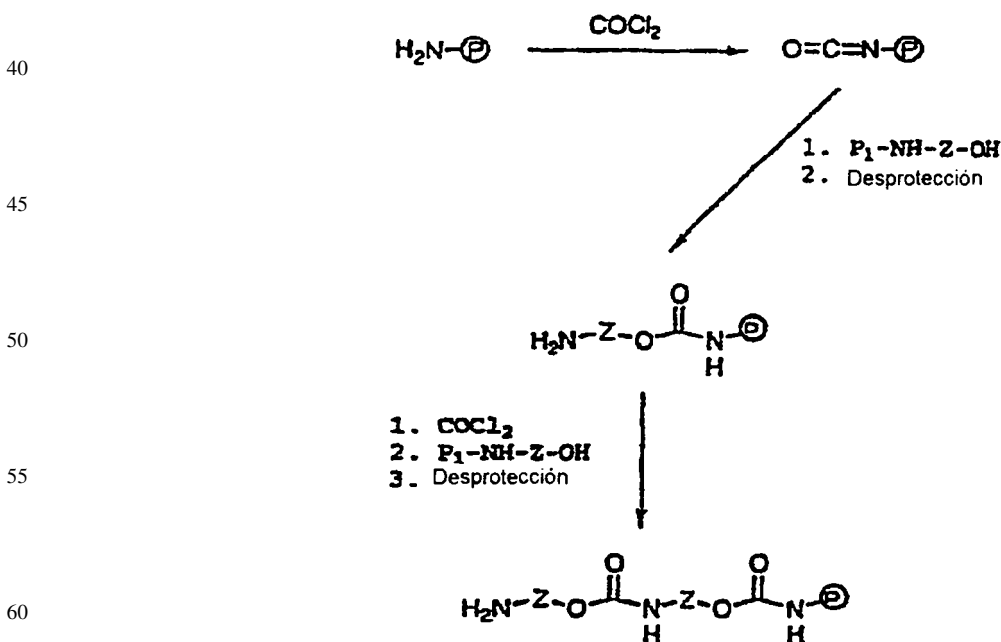
En otro aspecto, pueden prepararse derivados peptídicos glicosilados o acilados con grasas. La preparación de péptidos glicosilados o acilados con grasas se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, la Solicitud de Estados Unidos con N° de serie 07/717.454).

También pueden prepararse derivados de poliamida de ácidos grasos. Por ejemplo, y sin limitación, un grupo amino libre puede acilarse, por ejemplo, miristoilarse. Estos y otros conjugados de péptido-ácido graso adecuados para el uso en la presente invención se describen en la Patente de Reino Unido GB-8809162.4 y en la Solicitud de Patente Internacional PCT/AU89/00166.

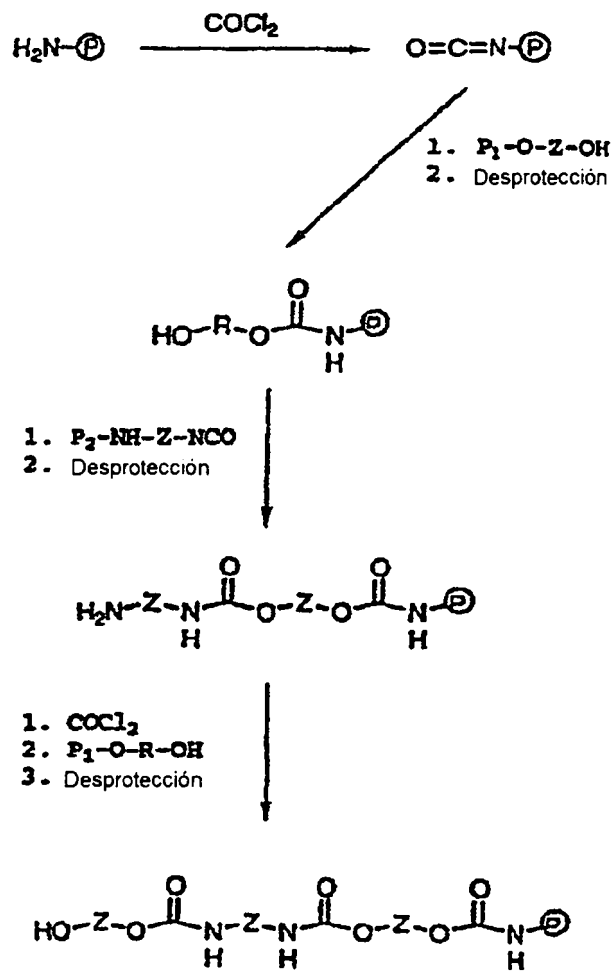
#### 5.5.2 Bibliotecas que contienen enlaces carbamato

La presente invención incluye compuestos de ensayo sintéticos que incluyen uno o más enlaces carbamato (es decir, poliuretano), incluyendo policarbamatos. En el Esquema II se muestran dos estrategias para formar carbamatos.

Esquema II



5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65



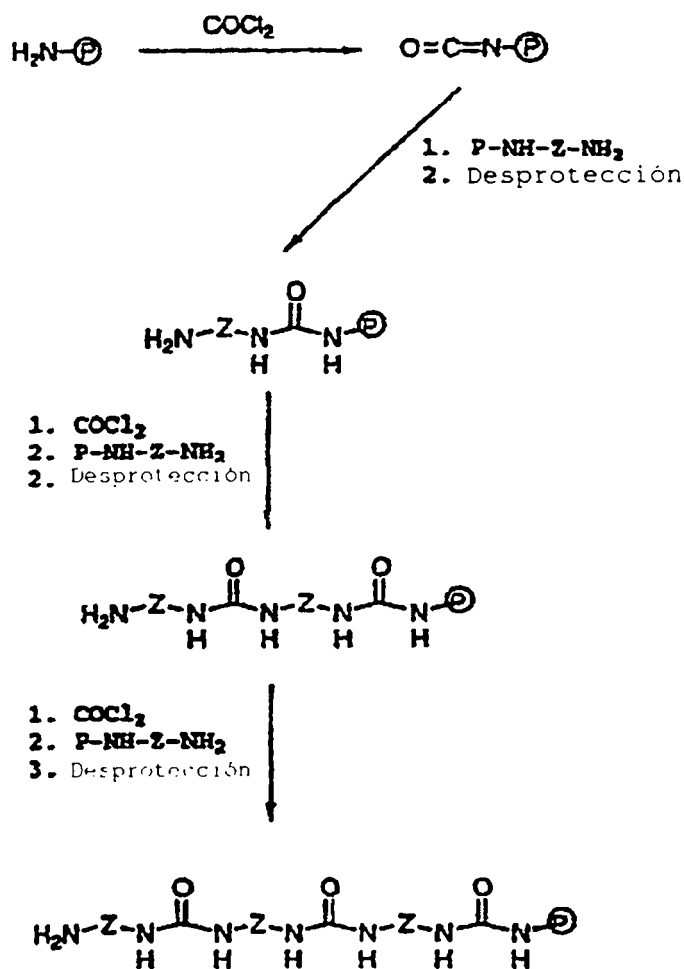
Para la síntesis de los dos tipos diferentes de carbamatos, pueden usarse acoplamiento de isocianatos y dioles o aminoalcoholes. Por ejemplo, una resina adecuada, tal como la resina funcionalizada usada para la síntesis de las poliamidas anteriores, se convierte en el isocianato por reacción con fosgeno, y después el isocianato se acopla con un aminoalcohol protegido con amino para dar el carbamato protegido. La desprotección de la resina de uretano forma una resina de aminouretano que se usa para repetir el mismo ciclo sintético que produce un poliuretano, es decir, la reacción con fosgeno seguido de acoplamiento con un aminoalcohol N-protegido y la desprotección produce una resina de aminodiuretano, etc.

Un segundo tipo de carbamato soportado se produce modificando el procedimiento sintético anterior como se indica a continuación. La resina de amino de partida se convierte en el isocianato, el isocianato se convierte en un carbamato protegido por reacción con un diol parcialmente protegido, la resina de carbamato protegida se desprotege para dar un hidroxycarbamato y el hidroxycarbamato se convierte en un aminodicarbamato por reacción con un aminoalquilisocianato protegido con amino, que va seguido de desprotección.

5.5.3 Bibliotecas que contienen enlaces urea

En el Esquema III se muestra una estrategia para la síntesis de una diversidad de estructuras que contienen enlaces urea.

Esquema III



Una resina adecuada funcionalizada con grupos isocianato, tal como la resina usada en la síntesis de los carbamatos descritos anteriormente, se convierte en una aminourea por reacción con una diamina parcialmente protegida seguido de desprotección, y la resina de aminourea se convierte en un isocianato usando fosgeno. La resina de isocianatourea se somete al ciclo sintético de tres etapas anterior el número deseado de veces para producir poliureas.

5.5.4 Bibliotecas que contienen enlaces éster

En el Esquema IV se muestra una estrategia para la síntesis de bibliotecas que contienen enlaces éster.

5

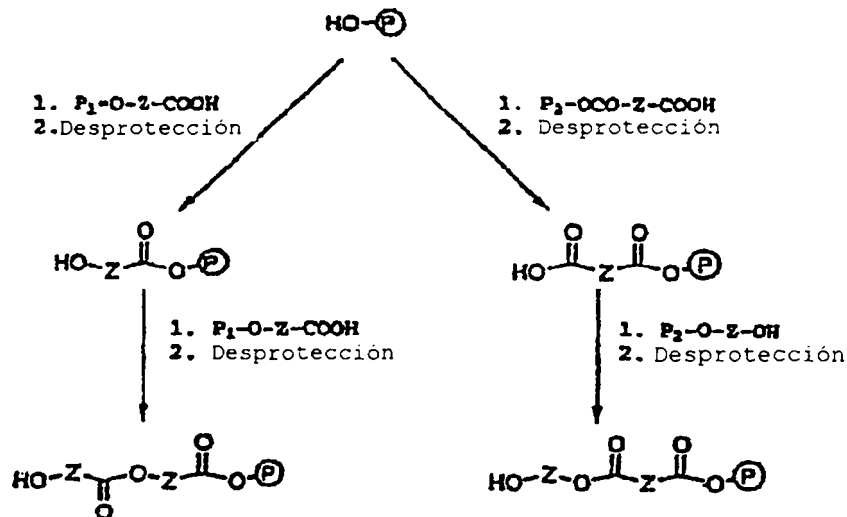
Esquema IV

10

15

20

25



30

Una resina adecuada, tal como la resina de hidroxialquilo usada en la síntesis de péptidos en fase sólida de Merrifield, en un disolvente hinchable tal como cloruro de metileno, se condensa con un ácido hidroxicarboxílico protegido adecuadamente, preferiblemente en presencia de un agente de condensación tal como DCC, para dar, después de la desprotección, un hidroxíster soportado que se prolonga adicionalmente usando los mismos ciclos de acilación-desprotección.

5.5.5 Bibliotecas que contienen enlaces amida

35

En el Esquema V se muestra una estrategia para la síntesis de aminas:

Esquema V

40

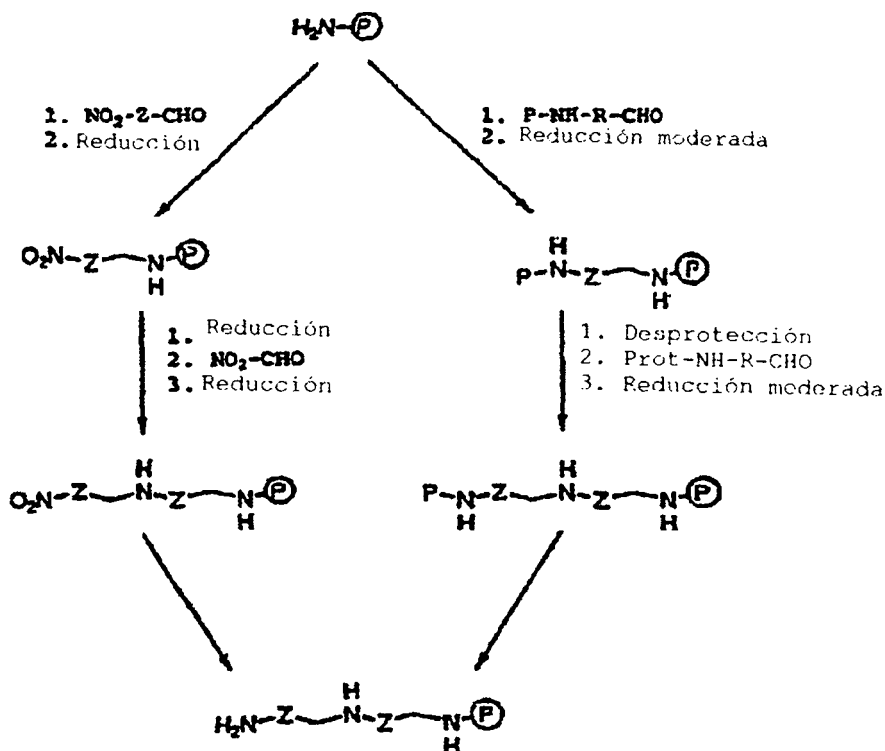
45

50

55

60

65



## ES 2 289 194 T3

Una resina adecuada, tal como la resina usada en la síntesis de amida anterior, se convierte en una resina de nitroalquilamina por aminación reductora usando un nitroaldehído, y se reduce adicionalmente para dar la amina primaria, usando una de las muchas reacciones conocidas para reducir nitroalquilaminas, para dar aminas primarias (por ejemplo, reducción con hidruro de litio y aluminio). La amina primaria de la resina se prolonga repitiendo la secuencia de alquilación reductora-reducción, produciendo la poliamina deseable.

5

La reducción de una resina de nitroalquilamina en el procedimiento anterior puede evitarse reemplazando el nitroaldehído de la aminación reductora por un aminoaldehído N-protégido y retirando el grupo protector del producto resultante en una etapa sintética separada.

10

### 5.5.6 Bibliotecas que contienen enlaces sulfuro y disulfuro

En el Esquema VI se muestra una estrategia para la síntesis de una diversidad de estructuras polisulfuro y polidisulfuro:

15

Esquema VI

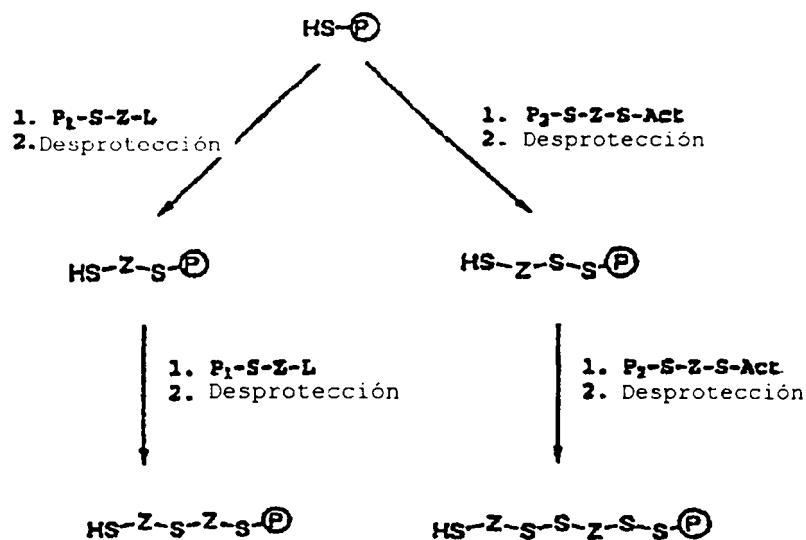
20

25

30

35

40



45

Una resina adecuada, por ejemplo, una resina usada en la síntesis de péptidos de fase sólida de Merrifield, se funcionaliza para que tenga grupos tiol libres. La resina de tiol se alquila con un haluro de tioalquilo protegido y el producto se desprotege para dar un sulfuro de resina de tioalquilo. La cadena de tioalquilsulfuro soportada se prolonga adicionalmente repitiendo el ciclo de alquilación-desprotección para formar un polisulfuro soportado.

50

La síntesis anterior puede producir disulfuros soportados si el haluro de tioalquilo protegido se reemplaza por un tioalquilclorosulfenato o tioalquilmetoxicarbonilsulfenato protegidos.

55

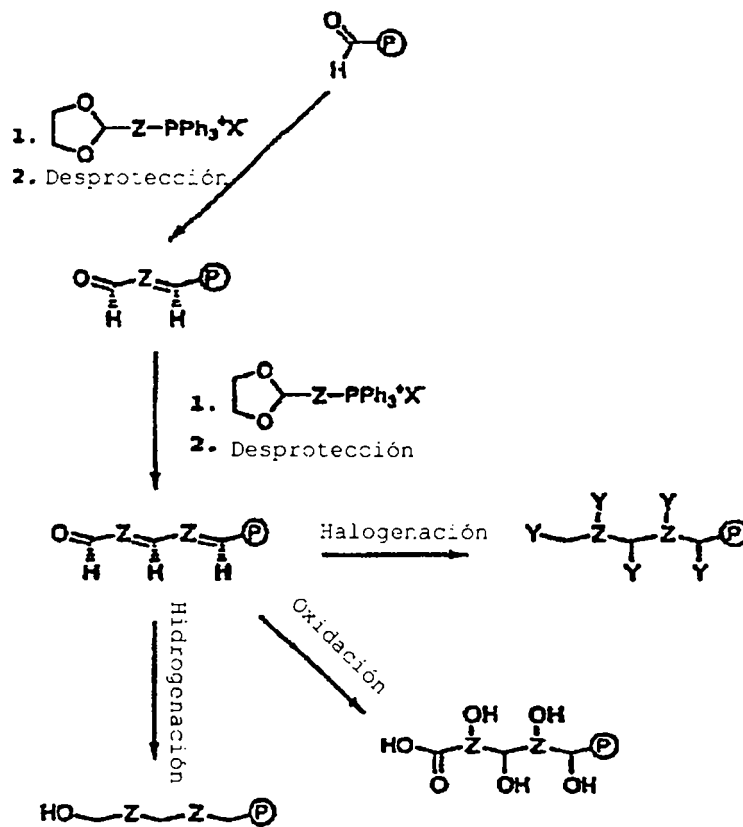
60

65

5.5.7 Bibliotecas que contienen enlaces carbono-carbono

Se contempla una diversidad de polialcanos, polialquenos, polihaloalquenos y polioles. En el Esquema VII se muestran estrategias para la síntesis de tales bibliotecas:

Esquema VII



Una resina adecuada se funcionaliza con grupos carbonilo (por ejemplo, por oxidación controlada de grupos hidroxialquilo de soporte), se condensa con un reactivo de Wittig, preparado a partir de trifenilfosfina y un haloalquil dialquil acetal, y se desprotege para dar una resina que contiene una cadena de aldehído insaturada. Esta cadena puede prolongarse para dar un aldehído de polieno usando la misma secuencia de condensación de Wittig-desprotección. El tratamiento del polieno soportado con un halógeno molecular, tal como cloro o bromo, produce un haloalcano sobre una resina. También se contempla la conversión de estos haloalcanos en sus derivados reducidos totalmente deshalogenados por reacción con hidruro de tributilestano o un metal electropositivo tal como cinc en presencia de un ácido débil. El tratamiento cuidadoso del polieno soportado con un agente oxidante, por ejemplo, permanganato o peryodato, produce polioles. Otros polioles pueden producirse sometiendo el polieno a una secuencia de hidroborcación-oxidación, una secuencia de epoxidación (con un perácido tal como ácido m-cloroperbenzoico)-hidrólisis o una secuencia de acetato de mercurio-borohidruro alcalino.

## ES 2 289 194 T3

### 5.5.8 Bibliotecas de compuestos policíclicos y compuestos policíclicos funcionalizados

Se contempla una diversidad de compuestos policíclicos y policíclicos funcionalizados. En el Esquema VIII se muestran estrategias para la síntesis de estructuras policíclicas y relacionadas, donde  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  se refieren a diversos grupos alquilo o arilo sustituidos como se han definido anteriormente:

Esquema VIII

10

15

20

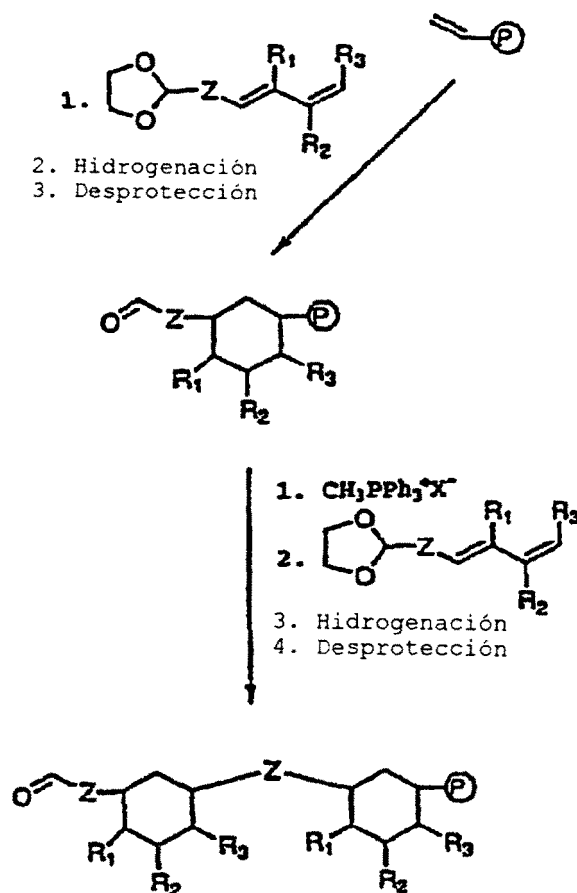
25

30

35

40

45



50

55

60

65

El Esquema VIII muestra la preparación de un hidrocarburo saturado. Como alternativa, también pueden prepararse estructuras insaturadas. Una resina adecuada, tal como la resina de carbonilo descrita anteriormente, se convierte en una resina de alqueno, por ejemplo, por una condensación de Wittig, y esta resina se usa en una reacción pericíclica de tipo Diels-Alder con un dieno dimetilacetal activado adecuadamente, por ejemplo electrófilo, para producir, después de la hidrólisis del grupo acetal, un ciclohexenilaldehído funcionalizado y soportado. Esta estructura soportada puede prolongarse adicionalmente por repetición de la secuencia de condensación de Wittig-Cicloadición-desprotección produciendo un policiclohexenoaldehído soportado que puede funcionalizarse adicionalmente como se indica a continuación (i) por halogenación, por ejemplo, bromación o cloración, para dar un poli-halociclohexanilaldehído, (ii) por reducción del poli-halociclohexanilaldehído, por ejemplo, usando hidruro de tributilestaño o un metal electropositivo (por ejemplo, Zn) y un ácido débil, produciendo un policiclohexanoaldehído o alcohol, y (iii) por oxidación controlada del policiclohexanoaldehído usando permanganato, una secuencia de hidroboreación-oxidación, o una secuencia de epoxidación-reducción (por ejemplo, epoxidación con ácido *m*-cloroperbenzoico seguido de reducción con hidruro de litio y aluminio) produciendo un poliol funcionalizado.

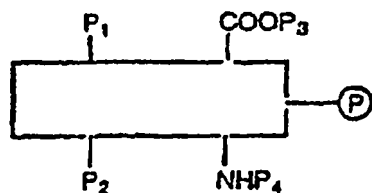
Otro ejemplo de una biblioteca cíclica se muestra en la Figura 6. Esta biblioteca se prepara por unión de ácido bromo-propiónico a un soporte, y unión de éster metílico de cisteína protegido con Boc con el soporte por sustitución del bromo con la cadena lateral de azufre para formar un engarce sulfuro. Pueden añadirse diaminoácidos protegidos con Boc/Fmoc, tales como ácido diaminobutírico o lisina. La desprotección de un grupo protector permite la sustitución con cualquier ácido carboxílico. La desprotección del otro grupo amino permite la adición de otro diaminoácido. Esta secuencia de etapas se repite el número deseado de veces. Finalmente, el grupo éster metílico se hidroliza en cisteína, permitiendo la reacción con un grupo amino desprotegido para ciclar la estructura.

5.5.9. Bibliotecas de estructuras de anillos polisustituídos que pueden servir como armazón

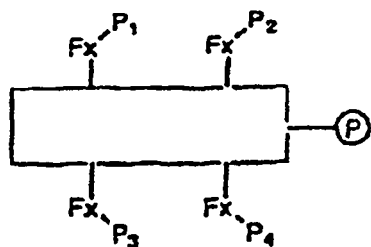
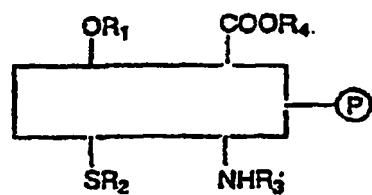
Se contempla una diversidad de estructuras polisustituídas que pueden servir como armazón. En el Esquema IX se muestra una estrategia general para la síntesis de tal estructura:

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

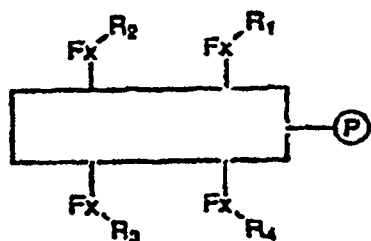
Esquema IX



1. Desprotección 1
2. Acoplamiento
3. Desprotección 2
4. Acoplamiento
5. Desprotección 3
6. Acoplamiento
7. Desprotección 4
8. Acoplamiento



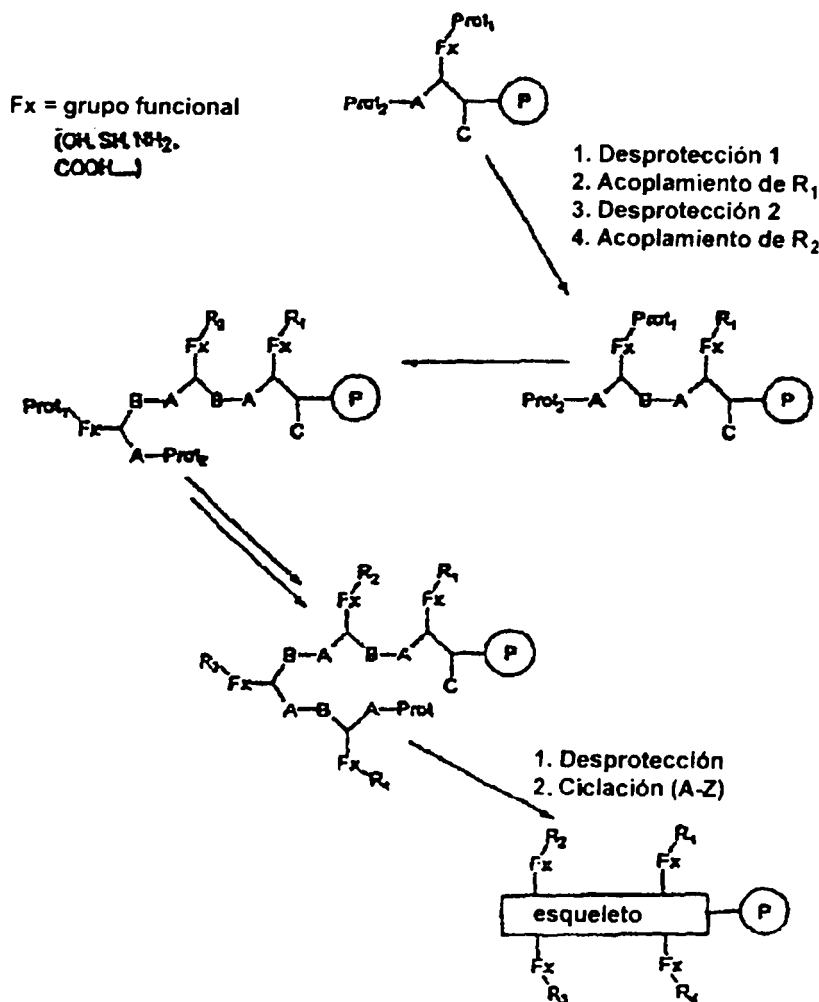
1. Desprotección 1
2. Acoplamiento de R1
3. Desprotección 2
4. Acoplamiento de R2
5. Desprotección 3
6. Acoplamiento de R3
7. Desprotección 4
8. Acoplamiento de R4



## ES 2 289 194 T3

En el Esquema X se muestra una estrategia general para la preparación de un tipo específico de bibliotecas de armazón:

Esquema X



Los armazones adecuados incluyen, pero sin limitación, ciclopentano, triácido de Kemp (Kemp y Petrakis, 1981, J. Org. Chem. 46: 5140-5143), una construcción ramificada preparada por acoplamiento consecutivo de ácidos diaminocarboxílicos, plantillas cíclicas tales como las descritas por Mutter, *et al.* (1992, J. Am. Chem. Soc. 114-1463-1470), esteroides, benzodiazepinas y similares.

Un enfoque para la unión de un derivado de ácido *cis*-1,3,5-ciclohexanotricarboxílico con una resina de tipo Merrifield seguido de derivatización de cada uno de los tres grupos carboxilo del triácido se describe en la Sección 9, *infra*, como un ejemplo de una síntesis de una estructura de anillos polisustituidos soportados capaz de servir como armazón (véase el Esquema XIV, *infra*).

Como un segundo ejemplo de una síntesis de una estructura de anillos polisustituidos capaz de servir como armazón, a continuación se muestran la unión y derivatización de 1,4-benzodiazepinas, basadas en el trabajo publicado de Ellman y Bunin (*Chemical & Engineering News*, Jan. 18, 1993, pág. 33). En una realización específica, una resina adecuada, tal como resina de tipo Merrifield funcionalizada con un enlazador de ácido 4-hidroximetilfenoxiacético, se funcionaliza adicionalmente con una 2-amino-4'-hidroxibenzofenona, cuyo grupo amino se protege con el grupo fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Después de la retirada de Fmoc, el acoplamiento de la anilina resultante con un aminoácido protegido con Fmoc, para producir una anilida, la retirada de Fmoc de la anilida y la ciclación, se produce una 1,4-benzodiazepina soportada que puede alquilarse adicionalmente sobre el nitrógeno de la anilida, usando una diversidad de electrófilos, para producir una diversidad de derivados de benzodiazepina para estudios adicionales.

Una de las posibles estructuras de anillo más pequeñas para uso como armazón es el anillo de ciclopentano (Figura 7).

Son realizaciones preferidas versiones codificadas de las bibliotecas de estructuras de anillo polisustituidas descritas anteriormente. Las más preferidas son bibliotecas codificadas en las que las moléculas codificantes son péptidos. Para la síntesis de las bibliotecas codificadas por péptidos se usan el procedimiento general de la sección 5.1 y las estrategias sintéticas indicadas en las secciones 5.2 y 5.3.

#### 5.5.10 Bibliotecas basadas en armazones construidos a partir de aminoácidos

Un armazón, que mapea un espacio conformacional más grande, que es una unión ramificada individual, se construye mediante el acoplamiento consecutivo de ácidos diaminocarboxílicos (véase la Figura 3). Diversos tipos de armazón que mapea un espacio extenso son armazones cíclicos o ramificados flexibles. Los principios de estas bibliotecas se ilustran en la Figura 3. Como ejemplo de la construcción de una biblioteca de armazón en este documento se muestra la síntesis de una biblioteca ramificada (Esquema XV, Sección 9, *infra*).

#### 5.6 Métodos de detección e identificación de ligandos en bibliotecas de compuestos de ensayo

Además de proporcionar bibliotecas de una gran diversidad de estructuras químicas como compuestos de ensayo sintético, y métodos de síntesis de los mismos, la presente invención comprende además métodos para seleccionar los compuestos de ensayo de una biblioteca para identificar ligandos dentro de la biblioteca, que demuestren una actividad biológica de interés, tal como unión, estimulación, inhibición, toxicidad, sabor, etc. Otras bibliotecas pueden explorarse de acuerdo con los métodos descritos *infra* para actividad enzimática, actividad inhibidora de enzimas y propiedades químicas y físicas de interés. En la técnica se conocen muchos ensayos de exploración; también se describen numerosos ensayos de exploración en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con N° de serie 07/717.454, presentada el 19 de junio de 1991).

Los ligandos descubiertos durante una exploración inicial pueden no ser los ligandos óptimos. De hecho, a menudo es preferible sintetizar una segunda biblioteca basada en las estructuras de los ligandos seleccionados durante la primera exploración. De esta manera, se pueden identificar ligandos de mayor actividad.

##### 5.6.1 Ensayos de unión

La presente invención permite la identificación de compuestos de ensayo sintéticos que se unen a moléculas aceptoras. Como se usa en este documento, la expresión "molécula aceptora" se refiere a cualquier molécula que se une a un ligando. Las moléculas aceptoras pueden ser macromoléculas biológicas tales como anticuerpos, receptores, enzimas, ácidos nucleicos o moléculas más pequeñas tales como algunos carbohidratos, lípidos, compuestos orgánicos que sirven como fármacos, metales, etc.

El compuesto de ensayo sintético en las bibliotecas de la invención puede interactuar potencialmente con muchas moléculas aceptoras diferentes. Identificando las especies de ligando particulares a las que se une una molécula aceptora específica, se hace posible aislar físicamente las especies de ligando de interés.

Puesto que sólo se retirará una pequeña cantidad de perlas de soporte sólido durante cada etapa de exploración/detección/aislamiento, la mayoría de las perlas permanecerán en la reserva de perlas. Por lo tanto, la biblioteca puede reutilizarse muchas veces. Si se usan diferentes esquemas de color o identificación para diferentes moléculas aceptoras (por ejemplo, con grupos que presentan fluorescencia tales como fluoresceína (verde), Rojo Tejas (rojo), DAPI (azul) y BODIPY marcado sobre los aceptores), y con filtros de excitación adecuados en el microscopio de fluorescencia o en el detector de fluorescencia, pueden añadirse diferentes aceptores (receptores) a una biblioteca y pueden evaluarse de forma simultánea para facilitar la selección rápida de dianas específicas. Estas estrategias no sólo reducen el coste, sino que también aumentan la cantidad de moléculas aceptoras que pueden seleccionarse.

En el método de la invención, una molécula aceptora de interés se introduce en la biblioteca donde reconocerá y se unirá a una o más especies de ligando dentro de la biblioteca. Cada especie de ligando a la que se une la molécula aceptora se encontrará en un solo soporte en fase sólida de modo que el soporte y por tanto el ligando, pueden identificarse y aislarse fácilmente.

El ligando deseado puede aislarse mediante cualquier medio convencional conocido por los especialistas en la técnica y la invención no está limitada por el método de aislamiento. Por ejemplo y no a modo de limitación, es posible aislar físicamente una combinación de ligando y perla de soporte sólido que muestre la interacción físico-química más fuerte con la molécula específica. En una realización, se añade una solución de moléculas aceptoras específicas a una biblioteca que contiene de  $10^5$  a  $10^7$  perlas de soporte en fase sólida. La molécula aceptora se incuba con las perlas durante un periodo suficiente para permitir que se produzca la unión. En lo sucesivo, se aísla el complejo de la molécula aceptora y el ligando unido a la perla de soporte. En los siguientes métodos se muestran realizaciones más específicas, que describen el uso de un anticuerpo monoclonal, como molécula aceptora soluble para unirse a un ligando que es un péptido. Está claro que estos métodos son fácilmente adaptables para detectar la unión de cualquier molécula aceptora.

Además de usar moléculas aceptoras solubles, en otra realización, es posible detectar ligandos que se unen a receptores de la superficie celular usando células intactas. Se prefiere el uso de células intactas para su uso con receptores que son de múltiples subunidades o lábiles o con receptores que requieren el dominio lipídico de la membrana celu-

lar para ser funcionales. Las células usadas en esta técnica pueden ser células vivas o células fijadas. Las células se incubarán con la biblioteca y se unirán a algunos péptidos en la biblioteca para formar una “roseta” entre las células diana y el péptido-perla relevante. En lo sucesivo, puede aislarse la roseta mediante centrifugado diferencial o puede retirarse físicamente con un microscopio de disección.

5 Como alternativa, puede explorarse la biblioteca usando un procedimiento de selección con líneas celulares tales como (i) una línea celular “parental” donde el receptor de interés está ausente en su superficie celular y (ii) una línea celular positiva para el receptor, por ejemplo, una línea celular que se obtiene transfectando la línea celular parental con el gen que codifica el receptor de interés. Después es posible explorar la biblioteca mediante la siguiente estrategia:  
 10 (i) en primer lugar, empobreciendo la biblioteca en sus perlas no específicas que se unirán a las células que carecen del receptor introduciendo una monocapa de línea celular parental mediante la “técnica de selección” convencional para dejar perlas específicas del receptor que no se unen, o perlas irrelevantes que no se unen, (ii) retirar las perlas que no se unen que incluirán las perlas específicas del receptor o irrelevantes e introducir las perlas en una monocapa de la línea celular positiva para el receptor en la que la perla específica para el receptor se unirá a la línea celular positiva para el receptor, (iii) retirar las restantes perlas irrelevantes que no se unen lavando suavemente y decantando, y (iv) retirar la  
 15 (s) perla(s) específica(s) para el receptor con un micromanipulador tal como una micropipeta.

Como alternativa a los ensayos de células completas para receptores de unión a la membrana o receptores que requieran el dominio lipídico de la membrana celular para ser funcionales, las moléculas receptoras pueden reconstituirse en liposomas donde puedan unirse el grupo informador o la enzima.

Los ejemplos anteriores se refieren a compuestos de ensayo sintéticos, y en la práctica puede usarse cualquiera de los compuestos descritos en las secciones *supra*, para la presente invención. De esta manera, una molécula aceptora puede unirse a uno de diversas poliamidas, poliuretanos, poliésteres, estructura polifuncionalizada capaz de actuar  
 25 como almacén, etc.

En una realización, la molécula aceptora puede marcarse directamente. En otra realización, puede usarse un reactivo secundario marcado para detectar la unión de una molécula aceptora a una partícula soporte en fase sólida que contiene un ligando de interés. La unión puede detectarse mediante la formación *in situ* de un cromóforo mediante  
 30 una marca enzimática. Las enzimas adecuadas incluyen, pero sin limitación, fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano rusticano. En una realización adicional, puede usarse un ensayo de dos colores, usando dos sustratos cromogénicos con dos marcas enzimáticas en diferentes moléculasceptoras de interés. Pueden identificarse ligandos de reactividad cruzada y de reactividad única con un ensayo de dos colores.

Otras marcas para su uso en la invención incluyen perlas de látex coloreadas, perlas magnéticas, perlas fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), rojo Tejas (TR), rodamina, sales de la serie de los lantánidos libres o queladas, especialmente  $\text{Eu}^{3+}$ , por mencionar varios fluoróforos), moléculas quimioluminiscentes, radioisótopos o marcas formadoras de imágenes de resonancia magnética. Pueden realizarse ensayos de dos colores con dos o más perlas de látex coloreado, o fluoróforos que emiten a diferentes longitudes de onda. Las perlas  
 40 marcadas pueden aislarse de forma manual o por medios mecánicos. Los medios mecánicos incluyen la clasificación activada por fluorescencia, es decir, análoga a FACS, y medios de retirada con micromanipulador.

En los ejemplos específicos, *infra*, se usan marcas de enzima-cromógeno y marcas fluorescentes (FITC).

Pueden aislarse perlas reactivas en base a la intensidad de la marca, por ejemplo, intensidad del color, intensidad de la fluorescencia, potencia magnética o radiactividad, por mencionar varios criterios. Pueden seleccionarse las perlas marcadas más intensamente y el ligando unido a la perla puede caracterizarse estructuralmente de forma directa, por ejemplo, mediante secuenciación de Edman o mediante análisis del espectro de masas, si fuera aplicable, o de forma indirecta secuenciando el péptido codificante correspondiente al ligando de interés. En otra realización, puede seleccionarse una selección aleatoria de perlas con una intensidad de marca por encima de un límite arbitrario y puede someterse a análisis estructural. Puede usarse potencialmente la microscopía moderna de análisis de imágenes para cuantificar la intensidad del color, y de este modo definir de forma precisa la afinidad relativa del ligando por la molécula aceptora antes del análisis estructural del ligando de la perla. Análogamente, puede aplicarse microscopía de inmunofluorescencia cuantitativa si el receptor está marcado con una marca fluorescente. En otra realización  
 50 más, se seleccionan perlas que demuestran una cierta intensidad de marca para un análisis de la composición, por ejemplo, análisis de la composición de aminoácidos en el caso de ligandos peptídicos. Después, puede prepararse y seleccionarse una biblioteca de perfeccionamiento que comprende un conjunto restringido de subunidades de aminoácidos identificadas como importantes para el análisis de aminoácidos. En otra realización, el(los) ligando(s) con la mayor afinidad de unión puede(n) identificarse diluyendo progresivamente la molécula aceptora de interés hasta que se detecte la unión a solamente unas pocas perlas de soporte en fase sólida de la biblioteca. Como alternativa, puede aumentarse la rigurosidad de la unión con la molécula aceptora. Un especialista en la técnica entendería que la rigurosidad de la unión puede aumentarse (i) aumentando la fuerza iónica de la solución; (ii) aumentando la concentración de compuestos desnaturizantes tales como urea; (iii) aumentando o disminuyendo el pH de la solución de ensayo; (iii) mediante el uso de una molécula aceptora monovalente; (iv) mediante la inclusión en la mezcla de reacción de una concentración definida de un competidor conocido; y (v) rebajando la concentración de receptor. Otros medios para  
 65 cambiar los componentes de la solución para cambiar las interacciones de unión se conocen bien en la técnica.

En otra realización, pueden ser de interés ligandos que demuestran una baja afinidad de unión. Éstos pueden seleccionarse retirando en primer lugar todos los ligandos de alta afinidad y después detectando la unión en condiciones de baja rigurosidad o de menor dilución.

5 En una realización preferida, puede usarse un ensayo de doble marca. La primera marca puede usarse para detectar la unión no específica de una molécula aceptora de interés a perlas en presencia de un ligando soluble. Después se retiran las perlas marcadas de la biblioteca y se retira el ligando soluble. Después se detecta la unión específica de la molécula aceptora con el resto de perlas. Puede esperarse que los ligandos en dichas perlas se unan a la molécula aceptora en el mismo sitio de unión que el ligando de interés, y que imiten por lo tanto al ligando de interés. El  
10 ensayo de doble marca proporciona la ventaja de que la molécula aceptora de interés no necesita purificarse, puesto que la primera etapa del ensayo permite la retirada de perlas que reaccionan de forma positiva no específicas. En una realización preferida, las moléculasceptoras marcadas con fluorescencia pueden usarse como sonda para explorar una biblioteca de ensayo sintética, por ejemplo usando FACS.

### 15 5.6.2 Ensayos de bioactividad

La presente invención proporciona además ensayos para la actividad biológica de un candidato a ligando de una biblioteca tratada para retirar cualquier molécula tóxica que permanezca después de la síntesis, por ejemplo, mediante neutralización y lavado prolongado con un disolvente, agua estéril y medio de cultivo. Las actividades biológicas que  
20 pueden ensayarse incluyen toxicidad y destrucción, estimulación y fomento del crecimiento, transducción de señales, cambios bioquímicos y biofísicos y cambio fisiológico.

En una realización preferida, los compuestos de ensayo sintéticos de la biblioteca pueden escindirse de forma selectiva del soporte en fase sólida, también denominado en este documento "perla". Preferiblemente, los compuestos  
25 de ensayo sintéticos se unen al soporte de fase separada mediante múltiples enlazadores escindibles para permitir más de un ensayo de liberación y de exploración. En una realización, se preparan perlas de modo que solamente una fracción del compuesto de ensayo sintético sea escindible de forma selectiva. Los candidatos a ligando, enlazadores y perlas escindibles de forma selectiva se describen en la Sección 5.3.2 *supra*. Se trata una biblioteca con un agente de escisión de modo que se produzca la escisión de una fracción de los compuestos de ensayo sintéticos. Los ejemplos  
30 de agentes de escisión incluyen, pero sin limitación, luz UV, ácido, base, enzima o catalizador. En una realización, la biblioteca se trata de modo que se libere 10-90% del compuesto de ensayo sintético. En una realización más preferida, se libera 25-50% del compuesto de ensayo sintético. Cuando todas las moléculas del compuesto de ensayo sintético son escindibles, puede realizarse una escisión no cuantitativa limitando el agente de escisión. En un aspecto, se limitan el tiempo de exposición y la intensidad de la luz UV. En otra realización, la concentración de reactivo está limitada.  
35 Después del tratamiento para realizar la escisión, puede tratarse adicionalmente la biblioteca, por ejemplo, mediante neutralización, para hacerla biológicamente compatible con el ensayo deseado. En la práctica, un especialista en la técnica sería capaz de determinar fácilmente las condiciones de escisión apropiadas para la escisión parcial cuando todas las moléculas de compuesto de ensayo sintético de la biblioteca estén unidas a la fase sólida mediante enlazadores o enlaces escindibles. Un especialista en la técnica entendería además que la concentración relativa de compuesto de  
40 ensayo sintético liberado puede verse afectada variando las condiciones de escisión.

Puesto que las perlas de la biblioteca están inmovilizadas, se formará un gradiente de concentración de un candidato a ligando particular. Las concentraciones elevadas de compuesto de ensayo sintético se encontrarán en las proximidades de la perla de la que se liberaron. Por lo tanto, la demostración de actividad biológica de interés, en  
45 las proximidades de una perla, permitirá la identificación y aislamiento de la perla, y la caracterización estructural secuenciando la molécula codificante correspondiente al compuesto de ensayo sintético o a otra técnica. La identificación del compuesto de ensayo sintético es posible puesto que quedará lo suficiente en la perla después de la escisión parcial para la secuenciación o para otra caracterización. En otra realización, las perlas pueden repartirse en pocillos de microtitulación (por ejemplo, 10 perlas/pocillo) y puede liberarse y ensayarse la actividad biológica de una fracción  
50 de candidato a ligando, eliminando de esta manera el problema potencial de la difusión. Pueden unirse diferentes porciones de compuesto de ensayo sintético al soporte o perla en fase sólida mediante diferentes enlazadores escindibles para ensayos secuenciales. En estos ejemplos, el término "perla" se refiere a una partícula de soporte de fase separada.

También se prevén ensayos biológicos con compuestos de ensayo sintéticos sin escindir. Después, puede explorarse  
55 se la actividad biológica de perlas recubiertas con el compuesto de ensayo sintético completo. En un aspecto, puede introducirse una biblioteca en un animal. Las perlas de interés pueden aislarse a partir de un tejido específico. Pueden aislarse perlas que se absorbieron específicamente después de la administración oral, nasal o cutánea. En una realización preferida, dichas perlas son magnéticas, o tienen alguna otra característica identificativa, y por lo tanto se aíslan fácilmente a partir del tejido. En otra realización, el propio ligando inmovilizado puede provocar cambios bioquímicos  
60 con receptores de superficie apropiados.

Un especialista en la técnica entenderá además que cualquier célula que pueda mantenerse en cultivo tisular, durante un plazo corto o largo, puede usarse en ensayos biológicos. El término "célula", como se usa en este documento, pretende incluir células procariotas (por ejemplo, bacterianas) y eucariotas, levaduras, mohos y hongos. Pueden usarse  
65 células primarias o líneas mantenidas en cultivo. Además, los solicitantes prevén que pueden realizarse ensayos biológicos en virus infectando o transformando células con virus. Por ejemplo, y no a modo de limitación, puede ensayarse la capacidad de un ligando para inhibir la actividad lisogénica del bacteriófago lambda identificando colonias de *E. coli* transfectadas que no formen placas transparentes cuando se infectan.

## ES 2 289 194 T3

Los métodos de la presente invención para ensayar la actividad de una molécula del compuesto de ensayo sintético de una biblioteca no se limitan a los ejemplos anteriores; los solicitantes prevén que puede modificarse cualquier sistema de ensayo para incorporarlo a la invención descrita actualmente. Los solicitantes prevén que dichas modificaciones están dentro del alcance de su invención.

### 5.6.3 *Miméticos enzimáticos/inhibidores enzimáticos*

La presente invención comprende adicionalmente bibliotecas que son capaces de catalizar reacciones, es decir, bibliotecas enzimáticas; bibliotecas de moléculas que sirven como coenzimas; y bibliotecas de moléculas que pueden inhibir reacciones enzimáticas. De esta manera, la invención también proporciona métodos que se usarán para ensayar la actividad enzimática o coenzimática o la inhibición de actividad enzimática.

La actividad enzimática puede observarse mediante la formación de un producto de reacción detectable. En una realización particular, una enzima de una biblioteca enzimática cataliza la reacción catalizada por fosfatasa alcalina, por ejemplo hidrólisis de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indóilo (BCIP) y forma un producto de reacción azul insoluble en el soporte en fase sólida (véase el Ejemplo 13, *infra*).

En otra realización, puede formarse una zona de producto observable, por ejemplo, color o fluorescencia, en una matriz semisólida. Se dispone en capas una biblioteca en una matriz semisólida, por ejemplo gel de agarosa, y se añade un sustrato cromogénico u otro sustrato indicador. Donde un complejo de enzima-perla de una biblioteca enzimática muestra la actividad enzimática deseable, se formará una zona de producto. Por ejemplo, y no a modo de limitación, puede identificarse una molécula de una biblioteca que sea un análogo de peroxidasa de rábano rústico añadiendo una solución de aminoantipireno (0,25 mg/ml; Kodak), fenol (8 mg/ml) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (al 0,005%) en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0. Las perlas con actividad enzimática formarán una zona de color púrpura. En otra realización, pueden identificarse perlas con actividad proteasa mediante la adición de los sustratos de proteasa colorimétricos bien conocidos. La actividad coenzimática puede observarse ensayando la actividad enzimática mediada por una coenzima, donde la coenzima natural o común esté ausente.

La actividad inhibidora de enzimas puede detectarse con un compuesto de ensayo sintético liberado parcialmente. En una realización, y no a modo de limitación, se dispone en capas una biblioteca en una matriz semisólida que contiene una enzima. La biblioteca se trata para liberar parcialmente moléculas candidatas a ligando. Cuando la molécula inhibe la actividad enzimática, puede identificarse una zona que carece de producto. En una realización, el sustrato enzimático es cromogénico y se forma un producto coloreado. De esta manera, la presencia de un inhibidor enzimático produciría una zona sin color. En otra realización, la inhibición de la proteólisis de hemoglobina o de una enzima indicadora tal como fosfatasa alcalina, puede detectarse por la presencia de una zona opaca en la matriz semisólida. Esto es porque la presencia del inhibidor de la proteólisis evitará la degradación de la hemoglobina o de la enzima indicadora.

Un especialista en la técnica conocerá bien que una molécula de compuesto de ensayo sintético que demuestre actividad enzimática, actividad coenzimática o que inhiba la actividad enzimática puede ser un péptido, un peptidomimético, uno de diversos polímeros o cualquiera de los compuestos descritos en la Sección 5. Son de particular interés los polímeros forzados incluyendo, pero sin limitación, estructuras cíclicas, bicíclicas o tricíclicas, o estructuras forzadas con ciertos armazones, que pueden crear un bolsillo o superficie de unión catalítica única.

### 5.6.4 *Segregación topológica*

La invención incluye adicionalmente un método para segregar la molécula codificante en el interior del soporte sólido y el compuesto de ensayo en el exterior, accesible a una molécula aceptora macromolecular de interés. El método incluye las etapas de sintetizar un enlazador, que en la realización preferida es un péptido. El enlazador contiene una secuencia que puede hidrolizarse mediante una enzima disponible de forma conveniente tal como quimotripsina u otra endopeptidasa. En una realización, la enzima es quimotripsina y el enlazador contiene una fenilalanina. Después de que se sintetice el enlazador, la función N<sup>o</sup> amino se deja protegida y el soporte se expone a la endopeptidasa. La endopeptidasa actúa solamente sobre enlazadores que podrían ser accesibles a otras macromoléculas, tales como aceptores.

Después de la hidrólisis enzimática del enlazador peptídico, el compuesto de ensayo y los compuestos codificantes pueden sintetizarse usando grupos protectores ortogonales cualesquiera.

### 5.7 *Métodos para caracterizar un compuesto de ensayo sintético a partir de una biblioteca*

Una vez que se ha seleccionado un soporte que contiene un ligando de interés de acuerdo con un método cualquiera de la Sección 5.6, *supra*, la presente invención proporciona un medio para determinar la estructura del ligando.

Existen dos enfoques generales para determinar la estructura de un compuesto de ensayo: la estructura del polímero puede analizarse directamente mediante técnicas convencionales, por ejemplo, degradación de Edman o espectrometría de masas; como alternativa, puede sintetizarse una segunda molécula o grupo de moléculas durante la construcción de la biblioteca de modo que la(s) estructura(s) de la segunda especie molecular indica(n) de modo inequívoco (codifica(n)) la estructura del compuesto de ensayo unido al mismo soporte. Mediante esta segunda técnica, puede determinarse fácilmente la estructura de polímeros que no pueden secuenciarse ellos mismos.

Otra realización más de la presente invención incluye una tercera técnica codificante, denominada “codificación fraccional” que difiere de las realizaciones anteriores en que no hay una molécula codificante distinta diferente del compuesto de ensayo. La codificación funcional se usa cuando las subunidades específicas del compuesto de ensayo no pueden resolverse con el análisis convencional, por ejemplo, los estereoisómeros D y L de un aminoácido. La codificación fraccional proporciona un método en el que las subunidades pueden distinguirse mezclando una pequeña cantidad de una subunidad diferente, que no se utilizó de otra manera en la construcción de la biblioteca, en el momento en el que se sintetiza la biblioteca. De esta manera, la codificación fraccional crea un grado de heterogeneidad menor y detectable, del compuesto de ensayo con respecto al soporte cuando se usa una de las dos subunidades indistinguibles. Para los fines de la presente invención, dicho grado de heterogeneidad, típicamente de aproximadamente 5%, es compatible con la enseñanza de la solicitud de que sólo hay una especie de compuesto de ensayo en cada soporte.

#### 5.7.1 Caracterización por medio de códigos secuenciales sencillos y múltiples

En una realización preferida de las bibliotecas moleculares codificadas, el soporte de fase separada que contiene el compuesto de ensayo sintético de interés también contiene una molécula, preferiblemente un péptido, cuya secuencia codifica la estructura del ligando, por ejemplo, la determinación de la secuencia del péptido codificante muestra la identidad del ligando. Un método preferido para determinar la secuenciación del péptido es la degradación de Edman. Un método particularmente preferido emplea el secuenciador de proteínas 477A de Applied Biosystems. La secuencia de aminoácidos de los péptidos también puede determinarse mediante espectrometría de masas de bombardeo atómico rápido (FAB-MS) o usando otras técnicas analíticas.

Los péptidos codificantes pueden secuenciarse unidos al o escindidos del soporte sólido. Para escindir los péptidos, se tratan las perlas aisladas con agentes de escisión tradicionales conocidos por los especialistas en la técnica para separar los péptidos de los soportes en fase sólida. La elección del agente de escisión seleccionado dependerá del soporte en fase sólida empleado.

Como alternativa, en otra realización dentro del alcance de la invención, es posible aislar una única partícula de soporte en fase sólida, tal como una perla, con su secuencia peptídica codificante unida e introducir la perla en un secuenciador para secuenciar el péptido sin escindir previamente el péptido codificante de la perla. Se estima que una sola perla de resina de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro con 0,5 mequiv./gramo de sitios funcionalizables contiene aproximadamente 100 pmoles de péptido si se usan la mitad de los sitios para unir péptidos codificantes. Para un grado similar de sustitución con péptidos codificantes, una sola perla de resina PAM de 250  $\mu\text{m}$  de diámetro con 0,5 mequiv./gramo de resina de sitios funcionalizables contiene aproximadamente 1500 pmoles de péptido codificante. Con un secuenciador de péptidos del estado de la técnica, solamente se requieren 5-10 pmoles para la secuenciación adecuada. Por lo tanto, para una resina PAM convencional puede introducirse una única perla de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro para contener una cantidad más que adecuada de péptido codificante para secuenciar.

Además de la secuenciación de Edman, la espectrometría de masas de bombardeo iónico rápido es una herramienta analítica muy potente y puede usarse a menudo de forma eficaz para analizar las estructuras de péptidos y de diversas moléculas diferentes. La espectrometría de masas de pulverización de electrones de alta resolución también puede ser muy útil en el análisis estructural. Preferiblemente, la espectrometría de masas para determinar la estructura de una molécula codificante se realiza como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de serie 07/939.811, presentada el 3 de septiembre de 1992.

Los especialistas en la técnica entenderán que a veces la cantidad de especies de subunidades en cualquier posición del compuesto de ensayo es mayor que la cantidad de monómeros usados para construir el polímero codificante. Por ejemplo, un péptido codificante puede construirse con un conjunto limitado de aminoácidos que se distinguen fácilmente después de la degradación de Edman. En estas circunstancias, la molécula codificante puede construirse introduciendo una mezcla de aminoácidos en una posición dada. Por ejemplo, un código de singlete/doblete, es decir, que tiene uno o dos restos codificantes por posición del compuesto de ensayo, en el que el polipéptido codificante que contiene solamente 8 aminoácidos puede codificar hasta 36 subunidades; un código de triplete/doblete/singlete con la misma cantidad de restos codifica 84 subunidades por posición.

El análisis de los productos de degradación de Edman de dichos péptidos codificantes mostrará uno o dos, o uno, dos o tres aminoácidos en cada posición de la secuencia codificante.

#### 5.7.2 Caracterización por medio de un código no secuencial

Una realización preferida alternativa, denominada codificación no secuencial, permite la “lectura” de la molécula codificante sin una determinación de la secuencia de sus subunidades. Los códigos secuenciales son intrínsecamente laboriosos de descodificar. La secuenciación de una molécula requiere reiteradas etapas de degradación. Por el contrario, los análisis de la composición de una molécula polimérica pueden realizarse mediante una sola degradación y un solo análisis de las subunidades resultantes o sus derivados.

Además, la etapa de las necesarias para secuenciar una molécula codificante peptídica que requiere más tiempo es el análisis cromatográfico de cada una de las feniltiohidantoínas escindidas. Aunque toda la información reside en tiempo de retención único del pico eluido individual, debe realizarse una etapa de cromatografía diferente sobre los productos de cada degradación por etapas. Por lo tanto, la mayor parte del tiempo del análisis de gradiente se “malgas-

## ES 2 289 194 T3

ta” esperando la aparición del pico individual correspondiente al resto en esta posición. Claramente, el proceso no es lo más eficaz posible. Si en lugar de la degradación secuencial de Edman seguida de análisis por HPLC, fuera posible escindir simultáneamente todas las subunidades codificantes, distinguir entre ellas en una sola vuelta de HPLC y después descodificar los resultados para determinar la identidad del compuesto de ensayo, el proceso podría acelerarse enormemente.

La lectura de un código no secuencial solamente requiere determinar si una señal dada está presente o no. La resolución de referencia de dos picos que difieren en aproximadamente 0,3 minutos de tiempo de retención puede conseguirse usando análisis de HPLC de fase inversa convencional con elución en gradiente. Por lo tanto, un gradiente de 45 minutos puede distinguir entre 150 compuestos. Una molécula codificante compuesta por subunidades seleccionadas entre un grupo de 150 restos codificantes diferentes es equivalente a una cifra binaria de 150 dígitos. De hecho, podrían codificarse de este modo  $2^{150}$  o aproximadamente  $10^{45}$  especies diferentes de compuestos de ensayo. De este modo, los códigos no secuenciales son muy adecuados para codificar la secuencia y la identidad de las subunidades de los compuestos de ensayo, incluso de las mayores bibliotecas factibles.

Puede construirse un código no secuencial de la siguiente manera. Dejando que C000 a C099 sean los elementos del conjunto de 100 restos codificantes que se usan para codificar la estructura de un compuesto de ensayo que tiene hasta 20 restos seleccionados entre hasta 32 subunidades diferentes, denominadas en este documento S00-S31. En este esquema, la identidad del resto en la primera posición se determina mediante la presencia o ausencia de elementos codificantes C000-C004; si no está presente ninguno, S00 está presente en la primera posición del compuesto de ensayo, si todos están presentes, S31 está presente en la posición 1. Las posiciones sucesivas se codifican mediante restos C005-C009, C010-C014 ... C095-C099. Los especialistas en la técnica entenderán que, en el caso frecuente en el que se requieren bibliotecas considerablemente más pequeñas que la capacidad codificante máxima de un código de 100 dígitos; puede aumentarse la fidelidad del código reduciendo el tamaño del conjunto de moléculas codificantes, es decir, aumentando el intervalo entre restos en el análisis cromatográfico o mediante el uso de un código redundante, por ejemplo, puede introducirse un resto “de paridad” en el código para cada posición codificada.

Más frecuentemente, se requerirán entre 4 y 8 restos codificantes, correspondientes a entre 16 subunidades y 128 subunidades más un resto de paridad para codificar cada posición en el compuesto de ensayo.

Los restos codificantes necesitan disponerse en la estructura codificante de forma que se permita su escisión y análisis simultáneos. Una posibilidad obvia es la hidrólisis total, seguida de modificación y análisis selectivos de la mezcla. En este caso, la estructura del compuesto codificante no es importante. Los restos codificantes pueden estar conectados entre sí, o unidos a ramificaciones diferentes de una estructura ramificada, o cualquier combinación siempre que la unión a cada resto sea hidrolizable. Este enfoque, sin embargo, puede estar comprometido por la presencia de productos hidrolíticos del compuesto de ensayo. Por lo tanto, el uso del método de degradación muy selectiva diseñado por Edman, 1950, Acta Chem Scand, 4: 283-293; Edman, *et al.*, 1967, Euro J Biochem, 1: 80-91 parecía la elección óptima.

La degradación de Edman escinde de forma selectiva el aminoácido N-terminal de la cadena peptídica. Si pudiera identificarse una cantidad razonable de aminoácidos y derivados de aminoácidos que cumplieran los requerimientos cromatográficos definidos anteriormente, y fueran sintetizados como una estructura codificante en una disposición que permitiera su escisión simultánea, sería posible analizar la composición de una estructura no peptídica en solo un ciclo de degradación de Edman y análisis por HPLC.

El tiempo de retención de feniltiohidantoínas de aminoácidos en fase inversa sigue la lipofilia de la cadena lateral del aminoácido. Por lo tanto, para diseñar un conjunto de derivados de aminoácidos con los tiempos de retención apropiados, sólo es necesario diseñar la cadena lateral de cada uno con diferencias apropiadas de lipofilia. Una manera simple de conseguir las diferencias apropiadas es sustituir el grupo funcional de las cadenas laterales de aminoácidos trifuncionales por sustituyentes apropiados. Por consiguiente, se exploró el efecto de acilar el grupo amino de la cadena lateral de ácidos diaminocarboxílicos - ácido diaminopropiónico, ácido diaminobutírico, ornitina y lisina. Como alternativa, los conjuntos de restos codificantes tales como derivados de dicarboxiaminoácidos y SH - que contenían aminoácidos, serán muy evidentes para los especialistas en la técnica. El resto descrito anteriormente se prefiere solamente porque puede sintetizarse convenientemente por los que tienen acceso fácil a la síntesis de péptidos en fase sólida.

Una realización para conseguir la escisión simultánea de restos codificantes dispone que cada resto codificante es un  $\alpha$ -aminoácido unido como un aminoácido N-terminal con su grupo amino libre. La cadena principal de dicha estructura codificante puede construirse a partir de ácidos diaminocarboxílicos (Daa), dicarboxiaminoácidos u otras subunidades trifuncionales. Los grupos amino de estos aminoácidos son acilados por los aminoácidos N-protectados usados para la codificación. La acilación se realiza usando una mezcla de los restos definidos como el código para la subunidad dada y su posición en el compuesto de ensayo. Como se ilustra en el Esquema XIC, *infra*, no se necesita especificar la química posicional de las reacciones de los ácidos diaminocarboxílicos. El polímero y los restos codificantes pueden acoplarse a cualquiera de los grupos amino o los diaminoácidos que forman el polímero de la molécula codificante.

En el caso de los ácidos diaminocarboxílicos sustituidos descritos e ilustrados en el Ejemplo 13, *infra*, las reactividades de acoplamiento eran independientes de las sustituciones de las cadenas laterales. Sin embargo, si se usan

5 otras subunidades codificantes, hay dos métodos que pueden conseguir la incorporación equimolar de los restos codificantes incluso aunque puedan tener reactividades significativamente diferentes, por ejemplo, alanina e isoleucina. El primer método se basa en compensar las diferencias de reactividad usando una mayor concentración del aminoácido que reacciona más lentamente (por ejemplo, Eichler J. y Houghten, R., 1993, *Biochemistry* 32: 11035; Rutter Patente de Estados Unidos N° 5.010.175). Como alternativa, puede usarse una cantidad subequimolar de la mezcla de forma repetitiva de modo que aunque un resto pueda reaccionar más rápido, quedan suficientes sitios de acoplamiento para que se acople el aminoácido que reacciona más lentamente, hasta que después de las suficientes repeticiones del acoplamiento se consuman todos los sitios reactivos. Andrews *et al.*, 1994, *Techniques in Protein Chemistry*, 5: 485-492.

10 Hay varias estrategias básicas para la construcción de una molécula codificante como se ha descrito anteriormente. Dos de ellas se ilustran en el esquema XIA. La primera se basa en el uso del grupo protector Alloc (Loffet A. y Zhang H., 1993, *Int. Pep. & Prot. Res.* 42: 346); (Stevens y Watanabe, 1950 *J. Am. Chem. Soc.* 72: 725); (Guibe, F. y Saint M'Leux Y., 1981, *Te. Lett.* 21: 3591) para construir la estructura codificante y el grupo Fmoc o similar a Fmoc (Carpino y Han, 1972 *J. Org. Chem.* 37: 3404) para la protección de grupos funcionales del compuesto de ensayo. En este caso, puede usarse el grupo Boc como el grupo protector permanente para la síntesis del compuesto de ensayo y la síntesis codificante. Es ventajoso usar subunidades codificantes formadas previamente de la forma general del "bloque A" representado en el esquema XIA. Como alternativa, si no se usan subunidades codificantes formadas previamente, se requiere otro nivel de ortogonalidad durante la síntesis. Esto puede conseguirse usando ácidos diaminocarboxílicos protegidos con Alloc/Ddz para construir la cadena principal codificante, puesto que el grupo Ddz es escindible de forma selectiva por ácido trifluoroacético al 2% en diclorometano (Birr C., *et al.*, 1972, *Liebig's Ann. Chem.* 763: 162-73). Sin embargo, este enfoque se complica por la necesidad de compensar las diferentes reactividades de acoplamiento de los aminoácidos codificantes unidos en forma de mezcla. Una segunda estrategia se basa en el uso de una combinación de grupos Fmoc y Boc para la protección ortogonal temporal de grupos funcionales en el compuesto de ensayo y en las moléculas codificantes, y en el uso de benzoxicarbonilo (Z) o grupos similares a Z para la protección permanente. La subunidad codificante puede construirse durante la síntesis usando ácidos diaminocarboxílicos protegidos con Fmoc/Dde (o Fmoc/Alloc o Fmoc/Ddz) puesto que el grupo Dde se escinde mediante una solución de hidrazina en dimetilformamida y es estable en condiciones usadas para retirar el grupo Boc o Fmoc (Hone, N. D. *et al.*, Poster P63 a 22ª Eur. Pept. Symp., Interlaken, Suiza, septiembre de 1992).

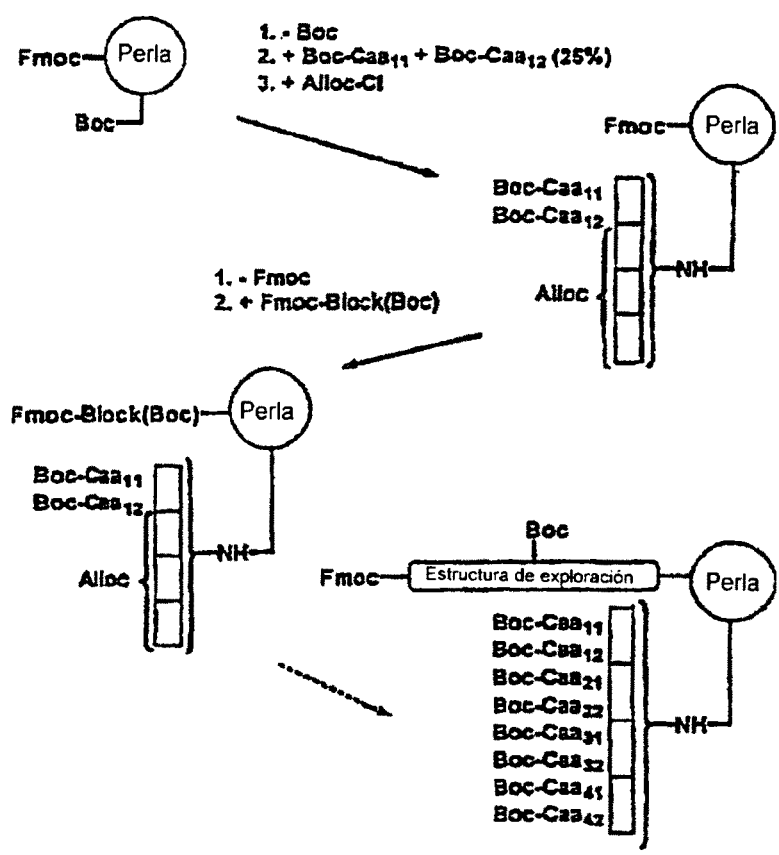
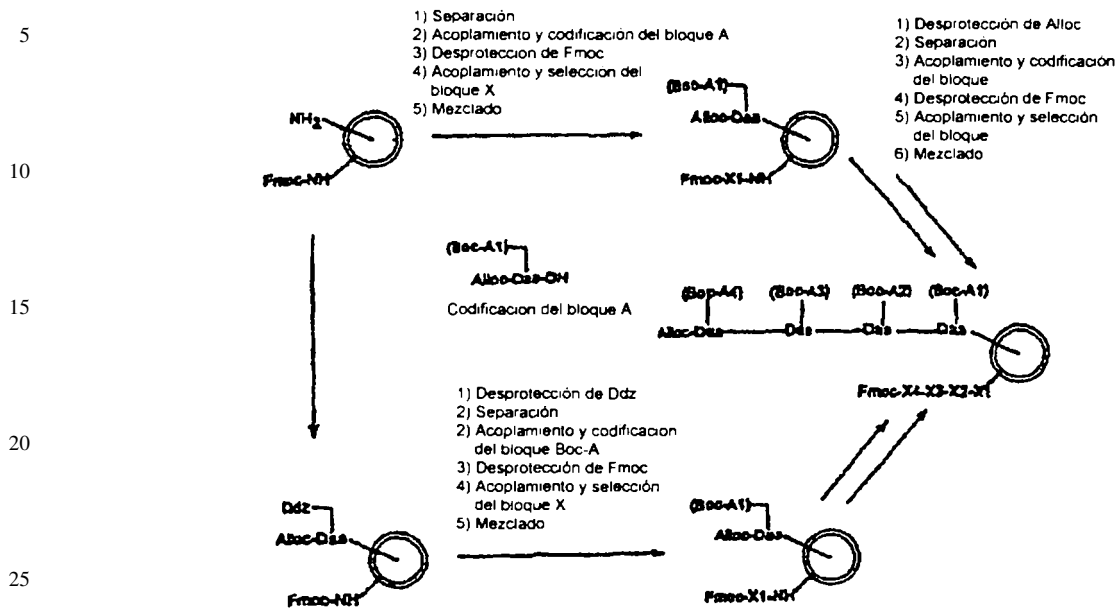
30 Un enfoque alternativo para la codificación se ilustra en el Esquema XIB. En este caso, una fracción de los grupos amino disponibles para codificar se acilan mediante la mezcla codificante y los grupos amino restantes se protegen de nuevo mediante un grupo escindible de forma ortogonal (por ejemplo, Alloc) antes de que se realice la siguiente etapa de aleatorización. En este esquema es ventajoso acoplar la mezcla codificante antes de la subunidad del compuesto de ensayo, puesto que la desprotección de Alloc puede realizarse en la etapa recombinada.

40 Una tercera realización alternativa la proporciona el Esquema XIC. En este esquema, no es necesario que los elementos codificantes se formen previamente con una estructura principal de ácido diaminocarboxílico, como en el Esquema XIA, ni es necesario que haya bloqueos y desbloqueos repetitivos como en el Esquema XIB. El esquema proporciona un compuesto de ensayo protegido con Fmoc y una molécula codificante protegida con Alloc, con los grupos reactivos del compuesto de ensayo y codificante protegidos permanentemente durante la síntesis con Boc. La molécula codificante se sintetiza mediante las etapas sucesivas de retirada de la protección de Alloc de las funcionalidades N<sup>α</sup> y N' de la lisina; la adición y el acoplamiento de una mezcla de elementos codificantes Boc-*caa*<sub>11</sub> y Boc-*caa*<sub>12</sub>, cada uno en la cantidad de 0,5 equivalentes, la adición y acoplamiento de 1,0 equivalente de Alloc-Lys(Alloc). Véase que en esta realización, los elementos codificantes, es decir, el Boc-*caa* pueden acoplarse a la N<sup>α</sup> y/o N' de cualquier lisina particular en la estructura principal de la molécula codificante. Sin embargo, ni la estequiometría ni la estequiometría del acoplamiento afectan a la funcionalidad de la realización, puesto que para todos los fines de la invención las funcionalidades N<sup>α</sup> y N' de la lisina son equivalentes.

50 Otra realización alternativa más de la invención incluye la lectura de un código no secuencial mediante espectrometría de masas. Las moléculas codificantes se liberan del soporte en fase sólida mediante la escisión específica de un enlazador. Estas moléculas pueden fragmentarse adicionalmente mediante pulverización de electrones o bombardeo iónico y los restos codificantes individuales pueden identificarse mediante sus pesos moleculares.

55 Los especialistas en la técnica entenderán que el uso de espectrometría de masas para leer un código no secuencial implica que los restos codificantes pueden estar unidos a las moléculas codificantes mediante diversos enlaces químicos diferentes de los que pueden degradarse específicamente, tales como enlaces peptídicos.

A continuación se presentan los Esquemas XIA, XIB y XIC:





## ES 2 289 194 T3

Los agentes terapéuticos de la invención incluyen, por ejemplo, moléculas efectoras que se unen a un receptor de interés farmacológico tal como receptores de factores de crecimiento, receptores de neurotransmisores o receptores hormonales. Estas moléculas efectoras pueden usarse como agonistas o antagonistas de la acción del ligando del receptor natural.

Otra aplicación de las moléculas efectoras que se unen a receptores podría ser usar la unión para bloquear el acoplamiento de virus o microbios que consiguen acceder a una célula acoplándose a un receptor celular normal y siendo interiorizados. Los ejemplos de este fenómeno incluyen la unión del virus de inmunodeficiencia humana al receptor CD4 y el del virus del herpes simplex al receptor del factor de crecimiento de fibroblastos. Las moléculas efectoras que ocupan al receptor podrían usarse como agentes farmacológicos para bloquear la infección vírica de células diana. Podría inhibirse análogamente la invasión parasitaria de células, después de que se identificaran moléculas efectoras adecuadas de acuerdo con esta invención.

En otra realización, puede usarse una molécula efectora que comprende una estructura que se une a una molécula aceptora de interés, para fijar como objetivo un fármaco o toxina. En una realización preferida, la molécula aceptora de interés es un receptor o antígeno descubierto en la superficie de una célula tumoral, parásito animal o microbio, por ejemplo, bacteria, virus, parásito unicelular, patógeno unicelular, hongo o moho. En otra realización, la entidad fijada como objetivo es un receptor intracelular.

Además, es posible que unas pocas de los millones de moléculas de compuesto de ensayo en la reserva puedan proporcionar estructuras que tengan actividad biológica. Pueden aislarse moléculas que posean actividades antitumorales, antiparásitos animales o antimicrobianas, por ejemplo, actividades anti-malas hierbas, antiparásitos vegetales, antifúngica, antibacteriana, antiparásitos unicelulares, antipatógenos unicelulares o antivirales. Además, algunos de estos ligandos pueden actuar como agonistas o antagonistas de factores de crecimiento, por ejemplo, eritropoyetina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de los fibroblastos, factores de crecimiento tumoral, por mencionar unos pocos, así como hormonas, neurotransmisores, agonistas de los receptores, inmunomoduladores u otras moléculas reguladoras.

Los agentes terapéuticos de la invención también incluyen moléculas efectoras que comprenden una estructura que tiene una gran afinidad por fármacos, por ejemplo dioxina, benzodiazepam, heroína, cocaína o teofilina. Dichas moléculas pueden usarse como antídoto para sobredosis de dichos fármacos. Análogamente, los agentes terapéuticos incluyen moléculas efectoras que se unen a pequeñas moléculas o iones metálicos, incluyendo metales pesados. Las moléculas con gran afinidad por bilirrubina serán útiles en el tratamiento de neonatos con hiperbilirrubinemia.

En general, la presente invención prevé proporcionar métodos para identificar moléculas para terapia de enfermedades o dolencias tales como las que se presentan en el Product Category Index del The Physicians Desk Reference (PDR, 1993, 47ª Edición, Medical Economics Data: Oradell, NJ, págs. 201-202). Por ejemplo, puede identificarse una molécula efectora con actividad anticancerosa, antiparásito, anticoagulante, antagonista de anticoagulante, agente antidiabético, anticonvulsiva, antidepresiva, antidiarreica, antídoto, antigonadotropina, antihistamínica, antihipertensiva, antiinflamatoria, antináuseas, antimigraña, antipárkinson, antiplaquetaria, antiprurítica, antipsicótica, antipirética, antitoxina (por ejemplo, antivenina), broncodilatadora, vasodilatadora, agente quelante, contraceptiva, relajante muscular, agente antiglaucomatoso o sedante.

Los agentes terapéuticos de la invención también pueden contener vehículos, diluyentes y adyuvantes farmacéuticamente aceptables apropiados. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y soluciones de dextrosa y glicerol acuosas como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche descremada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. Estas composiciones pueden tomar forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en el documento "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto activo junto con una cantidad adecuada de un vehículo para proporcionar la forma adecuada para la administración al paciente. Aunque la inyección intravenosa es una forma muy eficaz de administración, pueden emplearse otros modos, tales como mediante inyección o mediante administración oral, nasal o parenteral.

También puede usarse una molécula que comprende una estructura determinada de acuerdo con esta invención para formar agentes de diagnóstico. El agente de diagnóstico también puede ser una molécula que comprende una o más estructuras identificadas como resultado de la exploración de la biblioteca, por ejemplo, más de una secuencia de poliamida o secuencia de polialcano. Además, el agente de diagnóstico puede contener cualquiera de los vehículos descritos anteriormente para agentes terapéuticos.

Como se usa en este documento, la expresión "agente de diagnóstico" se refiere a un agente que puede usarse para la detección de afecciones tales como, pero sin limitación, cáncer tal como linfoma de células T o B y enfermedades infecciosas como se han mostrado anteriormente. La detección se usa en su sentido más amplio para abarcar la in-

dicación de existencia de afección, la situación de la parte del cuerpo implicada en la afección o la indicación de la gravedad de la afección. Por ejemplo, podría usarse un complejo de péptido-inmunoperoxidasa de rábano rusticano o un agente inmunohistoquímico relacionado para detectar y cuantificar moléculas de anticuerpo o receptor específicas en tejidos, suero o fluidos corporales. Los agentes de diagnóstico pueden ser adecuados para uso *in vitro* o *in vivo*. Particularmente, la presente invención proporcionará reactivos de diagnóstico útiles para uso en inmunoensayos, hibridación de Southern o Northern y ensayos *in situ*.

Además, el agente de diagnóstico puede contener uno o más marcadores tales como, pero sin limitación, radioisótopo, marcas fluorescentes, sustancias paramagnéticas u otros agentes potenciadores de la imagen. Los especialistas en la técnica estarán familiarizados con la gama de marcadores y métodos a incorporar en el agente para formar agentes de diagnóstico.

Los agentes terapéuticos y agentes de diagnóstico de la presente invención pueden usarse para el tratamiento y/o diagnóstico de animales, y más preferiblemente mamíferos, incluyendo seres humanos, perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, cobayas, ratones y ratas. Los agentes terapéuticos o de diagnóstico también pueden usarse para tratar y/o diagnosticar enfermedades vegetales.

Las enfermedades y afecciones susceptibles a la terapia o diagnóstico con moléculas descubiertas de acuerdo con la presente invención son tan variadas y de tan amplio intervalo como las permutaciones de estructuras en una biblioteca.

En otra realización, pueden seleccionarse perlas de unión de baja afinidad, y puede prepararse una biblioteca limitada en base a la estructura de los ligandos de las perlas. En otra realización, puede usarse en separaciones cromatográficas un soporte a medida de baja afinidad o alta afinidad que comprende uno de varios ligandos identificados entre los millones de compuestos de ensayo sintéticos proporcionados por la invención.

La invención se aclarará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que pretenden ser puramente ejemplares de la invención.

#### 6. Ejemplo: Una biblioteca codificada modelo

El presente Ejemplo demuestra que pueden prepararse simultáneamente dos moléculas, un “compuesto de ensayo sintético” y una “molécula codificante” en una única perla de resina. Además, puede prepararse una biblioteca de dichos compuestos, en la que cada perla de resina en la biblioteca contiene una única especie del “compuesto de ensayo sintético” y una única especie de “molécula codificante”. En este ejemplo, están presentes en una proporción molar de 2:1 respectivamente. La secuencia de la “molécula codificante” corresponde con la secuencia del “compuesto de ensayo sintético”.

Para este sistema modelo, el “compuesto de ensayo sintético” y la “molécula codificante” eran péptidos. La síntesis paralela del péptido de ensayo y el péptido codificante se realizó con el uso de grupos de bloque ortogonal Boc y Fmoc.

#### 6.1 Materiales y métodos

Se realizó la síntesis en fase sólida de forma manual en jeringas de polipropileno de acuerdo con lo descrito por Krchnak y Vagner (1990, Peptide Res. 3: 102-193). Las síntesis se realizaron en TentaGel (TG) (Rapp Polymere, Tübingen, Alemania, 130 u 80  $\mu\text{m}$ , 0,23 mmol/g) modificado con un asa de SCAL (Patek y Lebl, 1991, Tetrahedron Lett. 32: 3891-3894) (enlazador amida de seguridad) o con un enlazador apropiado. Las escisiones de los grupos protectores Fmoc se realizaron con piperidina al 50%/DMF durante 1 x 10 min. El grupo protector Boc se escindió con TFA al 30%/DCM que contenía 3% de anisol durante 20 min. Se usó una solución de DIEA/DCM (al 10%) para la neutralización después de la escisión de Boc. Se usó una mezcla de BOP/HOBt/DIEA (1:1:2 equiv.) en DMF para la activación de los  $N\alpha$ -aminoácidos de Fmoc y Boc. La finalización de cada reacción de condensación (1,5 - 40 h) se comprobó mediante el ensayo de ninhidrina o mediante el ensayo de cloranilo en los casos de acoplamiento a grupos amino secundarios. El protocolo de acoplamiento incluía lavar con DMF (6-8 veces) (seguido de lavado con DCM en el caso de aminoácidos protegidos con Boc) entre el acoplamiento y la desprotección y entre la desprotección y el acoplamiento. La reducción del enlazador SCAL se realizó mediante  $(\text{EtO})_2\text{P}(\text{S})\text{SH}$  al 20% en DMPU durante 2 horas. La escisión final se realizó mediante una mezcla de TFA al 95% - agua al 5%.

Se usaron disolventes de calidad comercial sin purificación adicional. Los aminoácidos protegidos se obtuvieron de Bachem (Torrance, CA), Advanced ChemTech (Louisville, KY) o Propeptide (Vert-le-Petit, Francia).

#### 6.2 Resultados

##### 6.2.1 Síntesis de biblioteca modelo y desprotección de los dos grupos protectores

Se acopló Boc-Lys(Fmoc)-OH como primer aminoácido a SCAL-TG, el grupo  $N\epsilon$ -Fmoc se desprotegió y se acopló Fmoc-Lys(Fmoc)-OH a la cadena lateral de la primera lisina. Los grupos Fmoc de  $N\alpha$  y  $N\epsilon$  de la lisina se escindieron y la resina se dividió en tres partes. Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Phe-OH y Fmoc-Val-OH, respectivamente, se acoplaron a cada porción de la resina. Los aminoácidos Boc correspondientes (Gly, Tyr y Leu - Boc-Tyr-OH se usó con un grupo hidroxilo no protegido) se acoplaron en la etapa siguiente al grupo  $\alpha$ -amino de la lisina después de la desprotección

## ES 2 289 194 T3

de Boc, mientras que la “ramificación Fmoc” se dejaba protegida. Después de la finalización de las condensaciones de aminoácidos Boc, las tres porciones de la resina se combinaron y la “ramificación Fmoc” se desprotegió. La siguiente aleatorización se realizó exactamente de la misma manera que la primera, después de la división de la resina en las tres porciones iguales. Después de la aleatorización de tres posiciones (acoplamiento de tres aminoácidos diferentes en cada posición), la resina se dividió en porciones separadas para el análisis posterior.

Dos perlas completamente desprotegidas seleccionadas al azar se sometieron por separado a análisis de secuencia. Se descubrieron aminoácidos “complementarios” correctos en los tres ciclos en la proporción esperada de 2:1. Resultados (valores en pmoles): 1ª perla: 1º ciclo: V 251, L 146, 2º ciclo: V 244, L 147, 3º ciclo: V 245, L 119; 2ª perla: 1º ciclo: A 102, G 39, 2º ciclo: V 121, L 59, 3º ciclo: F 125, Y 50.

Parte de la resina (aproximadamente 100 mg) se trató con dietilditiofosfato al 20% en DMPU (2 x 1 h en agitación) para reducir el asa de SCAL. La mezcla de péptidos se escindió del SCAL reducido con TFA/H<sub>2</sub>O (95:5) durante 1 h. La mezcla de escisión se concentró al vacío y se precipitó con Et<sub>2</sub>O. El precipitado se recogió por centrifugado y se secó. La mezcla de péptidos se disolvió en TFA al 0,1%/H<sub>2</sub>O y se analizó por HPLC. Un gradiente lento de acetonitrilo al 0-50% y TFA al 0,1% durante 200 minutos eluyó los 27 picos esperados. Se identificaron varios picos secundarios adicionales, cuya formación se atribuyó al uso de tirosina con cadena lateral desprotegida durante la síntesis. Puesto que existía peligro de eliminación (o al menos de disminución del contenido) de algunas secuencias por precipitación de éter, la segunda escisión de la mezcla evitaba esta etapa. La mezcla de escisión de TFA y agua se diluyó con agua adicional, se concentró en una centrífuga al vacío y se liofilizó. La evaluación por HPLC de la mezcla demostró la representación aproximadamente equimolar de todos los picos esperados.

### 6.2.2 Desprotección del grupo Fmoc N-terminal y acetilación de la “ramificación Fmoc”

La desprotección del grupo Fmoc se continuaba con la acetilación de grupos amino N-terminales libres. La acetilación se realizó con una solución 0,3 M de N-acetilimidazol en DMF durante 20 min (ensayo de ninhidrina negativo). Los grupos Boc N-terminales de la otra ramificación se desprotegeron después de la acetilación. Se secuenciaron tres perlas elegidas aleatoriamente y proporcionaron las siguientes lecturas (valores en pmoles): 1º ciclo: Y 213 (perla 1), G 161 (perla 2), Y 201 (perla 3), 2º ciclo: L 165 (1) Y 166 (2), Y 205 (3), 3º ciclo: Y 188 (1), L 128 (2) G 162 (3). Las lecturas no estaban contaminadas por los aminoácidos presentes en el brazo acetilado.

Una parte de las perlas acetiladas (aproximadamente 100 mg) se trató como se ha descrito anteriormente (precipitación de la mezcla mediante éter etílico y/o evaporación de la mezcla de escisión y liofilización) para reducir el asa y escindir los péptidos acetilados. El análisis por HPLC en las mismas condiciones ha demostrado que durante la precipitación de éter se perdió una proporción significativa de la biblioteca debido a su solubilidad en éter. La muestra evaporada y liofilizada proporcionó la misma cantidad de picos de aproximadamente el mismo patrón que en el caso de la biblioteca desprotegida, aunque los tiempos de retención cambiaron a valores más altos debido a la acetilación de la “ramificación” Fmoc.

### 6.2.3 Sustitución del grupo protector Boc con el grupo TFA

El grupo trifluoroacetilo sustituyó al grupo Boc en el extremo N para permitir un experimento de secuenciación por etapas. En primer lugar, el grupo Boc N-terminal se escindió de una muestra de resina (50 mg) mientras que la “ramificación Fmoc” se dejaba protegida. Los grupos amino libres se protegieron con trifluoroacetilo mediante tratamiento con 10 equivalentes (0,14 mmol, 21 µl) de anhídrido del ácido trifluoroacético en diclorometano (0,5 ml) en presencia de DIEA (0,16 mmol, 28 µl). La reacción se completó después de 1 h (ensayo de ninhidrina negativo). Después de la trifluoroacetilación, se retiró el grupo Fmoc en la otra ramificación y tres perlas se sometieron a secuenciación. Se determinó la secuencia de la ramificación Fmoc. Después de secuenciar la ramificación Fmoc, la perla que se secuenció se retiró del secuenciador y la perla se trató con una solución 0,2 M de NaOH (3 h, 20°C), se secó y se sometió a tres ciclos adicionales de secuenciación. Se obtuvieron las secuencias apropiadas de la ramificación Boc predicha a partir de la secuenciación de la ramificación Fmoc. 1ª perla (valores en pmoles): 1. F (735), 2. V (643), 3. A (837); después de la retirada del TFA: 1. Y (207), 2. L (187), 3. G (76), secuencia FVA/YLG; 2ª perla: 1. A (215), 2. A (230), 3. F (193); después de la retirada del TFA: 1. G (88), 2. G (86), 3. Y (80), secuencia AAF/GGY; 3ª perla: 1. F (63), 2. F (67), 3. V (41); después de la retirada del TFA: 1. Y (15), 2. Y (12), 3. L (4), secuencia FFV/YYL.

### 6.2.4 Escisión de un péptido de una perla

Se colocaron por separado varias perlas de resina que contenían secuencias completamente desprotegidas del asa SCAL reducida, en pequeños viales de vidrio y se trataron durante una noche con 30 µl de TFA puro. Se retiraron alícuotas (3 µl) y se diluyeron con H<sub>2</sub>O hasta el volumen total de 20 µl y se analizaron por HPLC en microbore para HPLC (Míchrom apparatus) (gradiente de acetonitrilo al 5-60% en TFA al 0,1% en agua durante 20 min). Los cálculos basados en el coeficiente de extinción medio de péptidos en la vuelta 215 han demostrado que se liberaron aproximadamente 100-200 pmoles de péptido de una perla polimérica.

## 6.3 Análisis

La biblioteca codificada modelo se ilustra en la Figura 2. Un enlazador de ramificación une el péptido del compuesto de ensayo sintético y el péptido codificante al soporte en fase sólida. Generalmente, el compuesto de ensayo

sintético puede ser un compuesto que no experimenta la degradación de Edman, de modo que la información de secuencia de la secuencia codificante proporciona la determinación de la estructura del compuesto de ensayo. Cada una de las subunidades del compuesto de ensayo sintético se asocia sin lugar a dudas con un aminoácido en el brazo codificante, de una manera específica para la posición, permitiendo de este modo el análisis de la estructura.

5 Existen varios enfoques para construir la secuencia codificante. Un procedimiento (Figura 1A) usa una distribución estadística de las dos estructuras en la perla polimérica. En este caso, puede conseguirse cualquier proporción posible, y puede minimizarse la posibilidad de producir un efecto de cooperación de las dos secuencias. En el segundo procedimiento (Figura 1B), las estructuras de selección y codificantes se construyen en la unión ramificada al soporte sólido, realizada por ejemplo mediante un ácido diamino carboxílico (lisina). Las dos “secuencias” están presentes en la proporción molar definida y en una disposición especial definida accesible a las moléculasceptoras que se están seleccionando. En las aplicaciones en las que usa la liberación del péptido seleccionado en solución, la localización del compuesto de selección y codificante en la perla no es relevante, ya que debido al uso de enlazadores diferentes, la secuencia codificante nunca se libera a la solución.

15 Se buscó un esquema simple para demostrar de forma concluyente la síntesis química de compuestos de ensayo sintéticos y secuencias codificantes. Se construyó un “compuesto de ensayo sintético” a partir de A, F y V. Estos aminoácidos se codificaron con G, Y y L respectivamente en la secuencia “codificante”. El compuesto de ensayo sintético se construyó en ramificaciones “de ensayo”, es decir, los dos grupos amino de la lisina se unieron a otra cadena lateral de lisina usando la química Fmoc (véase la Figura 2). La resina se dividió en tres partes y los aminoácidos protegidos con  $N\alpha$ -Fmoc se acoplaron en las ramificaciones de ensayo y se dejaron en estado protegido. Los aminoácidos  $N\alpha$ -Boc (codificantes) correspondientes se acoplaron en la ramificación codificante. Todo el soporte de resina se mezcló conjuntamente y se dividió de nuevo en tres partes. La desprotección del grupo  $N\alpha$ -Fmoc y el acoplamiento del posterior aminoácido  $N\alpha$ -Fmoc se realizaron en presencia de protección Boc en la otra ramificación. El grupo protector Boc es estable en esas condiciones. En la siguiente etapa, se escindió el grupo  $N\alpha$ -Boc y el aminoácido  $N\alpha$ -Boc correspondiente al aminoácido Fmoc acoplado a la ramificación de ensayo se acopló en la ramificación codificante en cada reacción. El procedimiento de mezcla, división y acoplamiento por separado de aminoácidos Fmoc y Boc se repitió una vez más. La síntesis se realizó en un asa SCAL, que es estable en las condiciones de las estrategias tanto Boc como Fmoc. Este asa, sin embargo, puede escindirse en condiciones acidolíticas relativamente suaves después de la reducción de sus restos sulfóxido (Patek y Lebl, 1991, Tetrahedron Lett. 32:3891-3894).

20 La secuenciación de las perlas preparadas de esta manera demostró una proporción molar de 2:1 entre la secuencia de selección y la secuencia codificante y la correspondencia apropiada de aminoácidos particulares (Figura 2A). Usando una alícuota de perlas, la secuencia “de selección” se acetiló y se obtuvo la lectura de secuencia limpia a partir de la secuencia “codificante” (Figura 2B). Usando un alícuota diferente de perlas, la secuencia “codificante” se bloqueó mediante un grupo trifluoroacetilo, se realizó la secuenciación de la ramificación “de selección”, el grupo trifluoroacetilo se escindió de las perlas secuenciadas y se determinó la secuencia del péptido “codificante”, confirmando los resultados de la secuenciación del péptido “de selección” (Figura 2C).

35 Para verificar que la estrategia sintética genera la proporción equimolar prevista de la cantidad definida de estructuras, se escindió la “minibiblioteca” representada en una alícuota del soporte. La HPLC de fase inversa confirmó la presencia de 27 péptidos diferentes. Los picos identificados en el gráfico se recogieron y se sometieron a análisis de secuencia, que confirmó la pureza de cada péptido y su composición. También se realizó la escisión de péptidos a partir de las perlas individuales y se confirmó la viabilidad del análisis de péptidos liberados solamente de una perla.

#### 45 7. Ejemplo: Bibliotecas no peptídicas codificadas por una estructura peptídica

Este ejemplo demuestra que una molécula codificante de un péptido puede codificar sin ninguna duda un compuesto de ensayo no peptídico cuando cada uno se sintetiza en paralelo en una sola perla. En este ejemplo, las subunidades del compuesto de ensayo se han seleccionado de modo que cada compuesto tenga un peso molecular único. La comparación del peso molecular observado del compuesto de ensayo con la secuencia del péptido codificante demuestra que un péptido codificante codifica un compuesto de ensayo.

#### 55 7.1 Materiales y métodos

Se realizaron acoplamientos de aminoácidos mediante un método manual usando el protocolo convencional a temperatura ambiente; se mezcló aminoácido protegido (3 equivalentes) en DMF con DIC (3 equivalentes) o DIC y HOBT (3 equivalentes de cada uno) con la resina y el acoplamiento se continuó por ensayos analíticos. Se usaron anhídridos simétricos cuando se especificó.

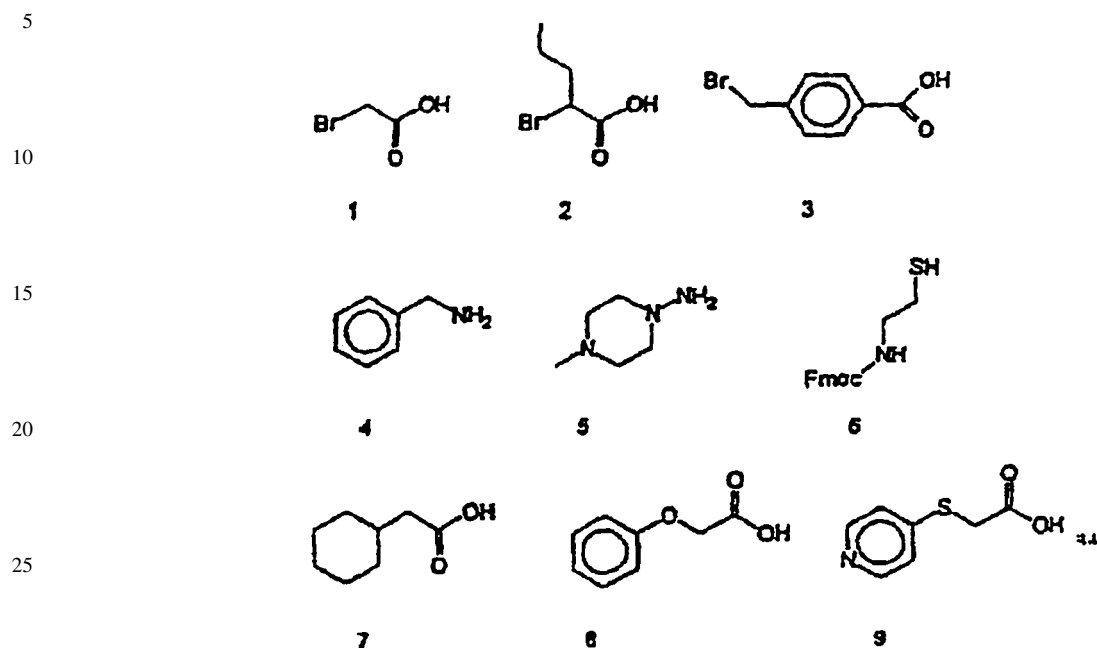
60

65

## ES 2 289 194 T3

En el Esquema XII se muestran las subunidades usadas para preparar la biblioteca no peptídica:

Esquema XII



30 Se acoplaron el enlazador Fmoc-SCAL y Boc-Lys (Fmoc) en primer lugar a la resina (TentaGel S NH<sub>2</sub>, 1 g) usando DIC y HOBT. Después de la escisión del grupo Fmoc, se acopló Fmoc-Trp y el nuevo grupo Fmoc se desprotegió. La resina-péptido se dividió en tres porciones iguales, y se acoplaron 3 bromoácidos diferentes (uno en cada recipiente de reacción, 3 equivalentes de cada uno) mediante el uso de DIC en DMF (3 equivalentes). Los tres ácidos fueron ácido  $\alpha$ -bromoacético,  $\alpha$ -bromoalérico y ácido bromotoluico. El acoplamiento del último ácido se repitió debido a su baja reactividad, usando un exceso de 6 veces de ácido y DIC. La protección de BOC del grupo  $\alpha$ -amino de Lys se retiró mediante TFA y los primeros aminoácidos protegidos con BOC de la secuencia codificante (Gly, Ala, Leu) se acoplaron mediante DIC. Los aminoácidos codificantes se seleccionaron de acuerdo con el peso molecular de los bloques de construcción no peptídicos, de modo que el bloque más ligero (ácido bromoacético en este caso) estaba codificado por Gly, el más pesado (bromotoluico) estaba codificado por Leu y el medio ( $\alpha$ -bromoalérico) estaba codificado por Ala.

45 Las tres partes de resina se reunieron, se lavaron minuciosamente con DCM y se desprotegeron mediante TFA/DCM en la preparación para el acoplamiento de los siguientes aminoácidos codificantes. Después de la desprotección, la resina se dividió de nuevo en tres porciones. Se realizaron acoplamientos de aminoácidos protegidos con Boc (de nuevo Gly, Ala y Leu) de la manera habitual por medio de DIC. Después del acoplamiento de los aminoácidos del péptido codificante, se añadieron las subunidades no peptídico. Dos partes de la resina se trataron con soluciones 2 M de aminas (bencilamina y 1-amino-4-metilpiperazina) en DMF durante una noche. La tercera parte se trató con solución 2 M de fluorenilmetiloxycarbonilaminoetilol, y después de la finalización de la reacción, se retiró el grupo Fmoc. La codificación de las aminas se basó de nuevo en sus pesos moleculares.

55 La resina se reunió una vez más, se mezcló y se dividió en tres porciones para los acoplamientos finales. Los ácidos carboxílicos (ácido ciclohexilacético, ácido feniloxiacético y ácido 4-piridiltioacético) se acoplaron a las aminas obtenidas (primaria y secundaria) mediante DIC y las reacciones de acoplamiento se repitieron dos veces usando anhídridos simétricos formados previamente en un exceso de 3-5 veces. Después de obtener un ensayo de cloranilo negativo, los tres lotes de resina se trataron por separado mediante TFA, se neutralizaron y los últimos aminoácidos protegidos con Boc codificantes se acoplaron usando DIC y HOBT. La codificación de los últimos ácidos carboxílicos se basó en el mismo esquema que anteriormente. Finalmente, se reunió toda la resina.

60 Se realizaron mediciones de espectrometría de masas de bombardeo atómico rápido (FAB) en un espectrómetro ZAB EQ (VG Analytical Ltd, Manchester, UK). Se obtuvieron espectros de <sup>1</sup>H RMN en un instrumento QE 300 de la General Electric. Se realizó la secuenciación mediante la degradación de Edman en un secuenciador de proteínas ABI 4778 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y un instrumento Porton PI 3010 (Porton Instruments, Tarzana, CA). Se realizaron HPLC analítica y preparativa en un sistema Waters 625 LC con un detector de múltiples longitudes de onda programable Waters 490E usando columnas Vydac Peptide y Protein C18 analíticas (0,46 x 250 mm, 5  $\mu$ m, 1 ml/min) y preparativas (10 x 250 mm, 10  $\mu$ m, 3 ml/min) respectivamente. Los análisis de las mezclas liberadas de una perla se realizaron en un analizador Ultrafast Microprotein (Michrom BioResources, Pleasanton, CA) usando una columna Reliasil C18 (5  $\mu$ m, 300<sup>Å</sup>, 1 x 150 mm). Todos los espectros se presentan en ppm en relación con tetrametilsilano ( $\delta$ )



## ES 2 289 194 T3

La primera biblioteca (A) contenía el enlazador SCAL en el N-ε de Lys, que estaba unido directamente a la resina, y por lo tanto Trp-amida era el último aminoácido en todos los compuestos de esta biblioteca. En esta biblioteca, los péptidos codificantes permanecían en las perlas de resina después de la escisión. En la segunda biblioteca (B), el enlazador SCAL estaba unido a la resina, y el último aminoácido en todos los compuestos era Lys. Cada uno de los compuestos liberados de esta biblioteca incluía el compuesto sintético y el péptido de secuencia codificante.

Los bloques de construcción no aminoacídicos usados para construir el compuesto de ensayo sintético se han mostrado anteriormente en el Esquema XII. Estos bloques de construcción se seleccionaron para formar compuestos de ensayo de peso molecular único. Los compuestos de ensayo, pesos moleculares y secuencias codificantes se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

Combinación de Bloques de Construcción Usados en la Construcción de una Biblioteca No Peptídica Modelo			
P.M.			
Combinación	No codificante	Con codificación*	Secuencia codificante
167	444,6	743,9	GGG
168	454,5	767,9	AGG
169	471,6	827,0	LGG
147	474,6	787,9	GAG
148	484,5	811,9	AAG
149	501,6	871,1	LAG
157	482,6	838,0	GLG
158	492,6	862,0	ALG
159	509,6	921,2	LLG
267	486,7	800,0	GGA
268	496,6	824,0	AGA
269	513,7	883,1	LGA
247	516,7	844,1	GAA
248	526,6	868,0	AAA
249	543,7	927,2	LAA

ES 2 289 194 T3

	257	524,7	984,1	GLA
	258	534,7	918,1	ALA
5	259	551,7	977,3	LLA
	367	520,7	876,1	GGL
10	368	530,6	900,1	AGL
	369	547,7	959,2	LGL
15	347	550,7	920,1	GAL
	348	560,6	944,1	AAL
	349	577,7	1003,3	LAL
20	357	558,7	970,2	GLL
	358	568,7	994,2	ALL
	359	585,7	1053,3	LLL
25	*	P.M. del compuesto ramificado que contiene el compuesto de ensayo y el péptido codificante.		

30 Se trataron perlas de la primera biblioteca (Esquema XIII, Panel Superior) con agente reductor y se tomaron perlas individuales para la escisión y el análisis de secuencia por separado. Se estudiaron cinco perlas. Después de la escisión de la parte no peptídica, las perlas se secuenciaron con éxito (véase Tabla 2) y pudo deducirse la estructura del compuesto no peptídico. Las soluciones que contenían los compuestos escindidos se analizaron en un sistema de micro HPLC.

35 TABLA 2

Estructuras Contenidas en Perlas Seleccionadas Aleatoriamente de una Biblioteca de Estructuras no Peptídicas						
Perla N°	Combinación de subunidades	P.M (m/z)	Aminoácido Detectado (pmol)			
			1 <sup>er</sup> Ciclo	2 <sup>o</sup> Ciclo	3 <sup>er</sup> Ciclo	
45	1	149	501,6	L (50)	A (55)	G (72)
	2	169	471,6	L (34)	G (319)	G (29)
	3	258	534,7	A (101)	L (83)	A (98)
50	4	147	474,6	G (45)	A (41)	G (25)
55	5	157	444,6	G (39)	G (30)	G (22)

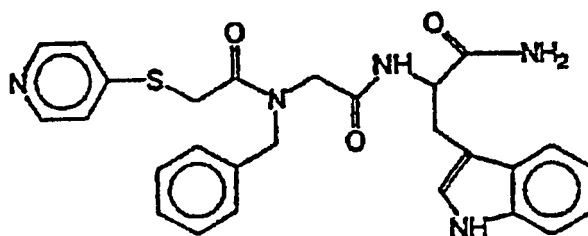
60 Una muestra (800 mg) de la segunda biblioteca (Esquema XIII, Panel Inferior) se trató con TFA al 95% después de la reducción del enlazador SCAL, se liofilizó, se disolvió en agua y se separó en un columna de HPLC semipreparativa en 44 picos usando un gradiente de 0-60% de acetonitrilo en TFA al 0,1% en agua durante 200 minutos. Las fracciones se liofilizaron y se analizaron varios picos mediante FAB MS y se secuenciaron para mostrar la correspondencia entre la estructura prevista a partir de la secuencia codificante de aminoácidos y el peso molecular de la construcción. A continuación se proporcionan ejemplos de picos seleccionados al azar para el análisis adicional: Pico 4: RT 25,31 min, secuenciación: 1. (Leu (364 pmol), 2. Gly (139), 3. Gly (422); FAB MS - 827,0 (combinación de bloques de construcción 169); Pico 8: RT 28,69 minutos, secuenciación: 1. Gly (261), 2. Leu (176), 3. Ala (225); FAB MS - 770,2 (combinación de bloques de construcción 257 sin bloque 7); Pico 13; RT 31,47 min, secuenciación: 1. Leu

## ES 2 289 194 T3

(792), 2. Leu (551), 3. Gly (128); FAB MS - 921,0 (combinación de bloques de construcción 159); Pico 14: RT 32,27 minutos, secuenciación: 1. - Leu (7930), 2. Gly (1810), 3. Ala (1763); FAB MS - 883,0 (combinación de bloques de construcción 269); Pico 15: RT 32,77 min, secuenciación: 1. - Leu (784), 2. Ala (447), 3. Ala (360); FAB MS - 776,2 (combinación de bloques de construcción 249 sin bloque 9); Pico 16: RT 33,16 min, secuenciación: 1. Leu (1286), 2. Ala (918), 3. Ala (688); FAB MS - 776,2 (combinación de bloques de construcción 249 sin bloque 9); Pico 17: RT 33,51 min, secuenciación: 1. Leu (298), 2. Leu (280), 3. Ala (202); FAB MS - 826,2 (combinación de bloques de construcción 259 sin bloque 9); Pico 19: RT 34,80 minutos, secuenciación: 1. Leu (641), 2. Gly (412), 3. Ala (460); FAB MS - 883,1 (combinación de bloques de construcción 269); Pico 20: RT 36,66 minutos, secuenciación: 1. Leu (150), 2. Leu (119), 3. Leu (80); FAB MS - 902,2 (combinación de bloques de construcción 359 sin bloque 9); Pico 26: RT 41,77 minutos, secuenciación: 1. Gly (39), 2. Gly (38), 3. Gly (23); FAB MS - 744,1 (combinación de bloques de construcción 167); Pico 31: RT 48,86 minutos, secuenciación: 1. Ala (180), 2. Gly (98), 3. Ala (106); FAB MS - 824,0 (combinación de bloques de construcción 268); Pico 32: RT 49,46 min, secuenciación: 1. Leu (234), 2. Leu (320), 3. Ala (277); FAB MS - 826,1 (combinación de bloques de construcción 259 sin bloque 9); Pico 33: RT 50,70 minutos, secuenciación: 1. Gly (152), 2. Gly (120), 3. Ala (94); FAB MS - 800,1 (combinación de bloques de construcción 267).

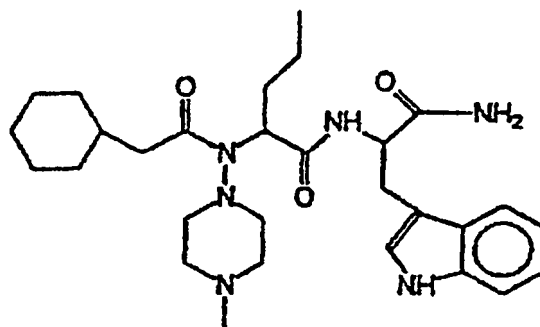
### 7.2.2. Síntesis de compuestos representativos de la biblioteca no peptídica

Se sintetizó un componente de la primera biblioteca (A), compuesto I:



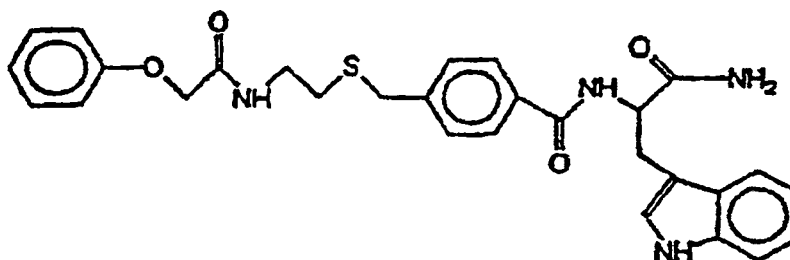
en 0,23 g de resina Knorr (0,5 meq/g). En primer lugar se acopló Fmoc-Trp de acuerdo con el protocolo general, usando DIC y HOBT. Después de la desprotección del grupo amino, se acopló ácido  $\alpha$ -bromoacético (50 mg) usando DIC (50  $\mu$ l) en DMF (0,5 ml). Se disolvió bencilamina (100  $\mu$ l) en 0,05 ml de DMSO y se trató bromo-resina con esta solución durante una noche. El ácido carboxílico final, ácido 4-piridiltioacético (80 mg), se disolvió en 0,85 ml de DMPT y se preactivó con DIC (80  $\mu$ l) y HOBT (80 mg) y se acopló a la amino-resina durante 10 horas. El acoplamiento se repitió usando PyBrop y DIEA para la activación. La escisión del compuesto I se consiguió en TFA al 95%. Después de la escisión, se evaporó al vacío el TFA y el residuo se disolvió en acetonitrilo acuoso al 30% y se liofilizó. El producto obtenido después del secado se redisolvió en acetonitrilo puro y se precipitó con éter. Esta operación se repitió dos veces y se obtuvo un precipitado casi blanco. El producto mostró dos picos en HPLC de fase inversa (RP). El segundo pico dio el espectro de masas esperado del compuesto I. El rendimiento del componente I después de la purificación en HPLC RP semipreparativa era de 18 mg. Fórmula:  $C_{27}H_{27}N_5O_3S$ , MS esperado 501,6, MS encontrado - 502,2 (M+H)<sup>+</sup>. Datos de <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): 10,804 d (1H, N<sup>o</sup>H); B. 49 d (2H, C<sub>2</sub>H y C<sub>6</sub>H de piridilo); 8,35 d (1H, NH); 7,62 d (2H, C<sub>3</sub>H y C<sub>9</sub>H de piridilo); 6,9 - 7,7 mm (protones aromáticos de Bzl y Trp); 4,59 m (1H, Trp, C<sup>o</sup>H); 3,75-4,55 m (protones alifáticos); 3,19 dd y 2,91 dd (2H, Trp C<sup>o</sup>H).

Se sintetizó un segundo componente de la primera biblioteca (Esquema XII, A), compuesto II:



de acuerdo con el mismo esquema que el compuesto I, usando como subunidades ácido  $\alpha$ -bromoacético (40  $\mu$ l), 4-metil-aminopiperazina (100  $\mu$ l) y ácido ciclohexilacético (80 mg). Fórmula:  $C_{29}H_{44}N_6O_3$ , MS esperada - 524,7, MS encontrada - 525,3 (M+H)<sup>+</sup>, 558,2 (M+Na)<sup>+</sup> y 573,2 (M+K)<sup>+</sup>.

El tercer componente de la primera biblioteca (A), compuesto III:



se sintetizó de acuerdo con un esquema similar al del compuesto I, usando como bloques de construcción ácido  $\alpha$ -bromotoluico (120 mg), fluorenilmetiloxycarbonil-aminoetilmercaptano (280 mg) (desprotección después del acoplamiento con piperidina/DMF) y ácido fenoxiacético (80 mg). Fórmula  $C_{29}H_{30}H_4O_4S$ , MS esperado 530,6, MS encontrado - 553,0 ( $M+Na$ )<sup>+</sup>.

### 7.3 Análisis

Este ejemplo demuestra la capacidad de construir estructuras no peptídicas en paralelo con la secuencia codificante. La diferencia en las bibliotecas estaba en la colocación del enlazador SCAL, que permitía la escisión selectiva del producto. En el primer caso (Esquema XIII Panel Superior), la escisión del enlazador conduce a la liberación de compuesto no peptídico  $x_3-x_2-x_1$ -TRP (el Trp está unido para fines de control espectroscópico) conectado a su estructura peptídica codificante a través de un resto de lisina. La escisión del enlazador en el segundo caso (Esquema XIII, Panel Inferior) conduce a la liberación del compuesto no peptídico  $X_3-X_2-X_1$ -Trp sin ningún péptido codificante unido. La construcción del compuesto no peptídico implicaba (i) la unión de un ácido carboxílico  $\alpha$ -bromo sustituido o un ácido bromometilbenzoico al grupo amino disponible del vehículo sólido, (ii) alquilación de un grupo amino (Zuckerman *et al.*, 1992, J. Am. Chem. Soc. 114: 10646-10647) o tiol de una amina o aminomercaptano N-prottegido, y (iii) la acilación de un grupo amino generado por un derivado de ácido carboxílico. Los bloques de construcción para este experimento se seleccionaron de manera que permitiera la asignación de la estructura de las moléculas de selección construidas basándose solamente en el peso molecular de la construcción (véase la Tabla I). La introducción de cualquier bloque de construcción no natural en la estructura de selección se continuó (o iba precedida) por el acoplamiento de un aminoácido codificante al otro brazo de la molécula. Solamente se usó glicina, alanina y leucina para la codificación (estos aminoácidos por lo tanto codificaban un elemento estructural diferente en cada etapa de la aleatorización). La asignación de estos aminoácidos al elemento estructural particular se da en el Esquema IX. La alquilación de aminas o tiol usada en este experimento por el ácido 2-bromopentanoico unido a la matriz polimérica conduce a la generación de compuestos con un centro quiral, por lo tanto la cantidad de combinaciones estructurales es 36 en lugar de 27. Sin embargo, se generan solamente 27 tipos de perlas diferentes (con secuencias de selección de diferente peso molecular), de los que 9 contienen una mezcla de compuestos diastereoisoméricos. Para simplificar el análisis de las mezclas y para demostrar la capacidad de realizar este tipo de síntesis en un soporte polimérico, tres de las estructuras posibles se resintetizaron como compuestos individuales, usando el mismo soporte químico y polimérico que en la síntesis de la biblioteca modelo.

Las mezclas generadas se escindieron del vehículo después de la reducción del enlazador SCAL y se analizaron mediante HPLC de fase inversa. La cantidad de picos obtenidos corresponde aproximadamente a la cantidad prevista de 36. Se recogieron los picos individuales del primer tipo de biblioteca. Parte de cada fracción recogida se sometió a degradación de Edman y parte se analizó mediante espectroscopía de masas. Los resultados obtenidos confirman la correlación de la determinación de la secuencia con la determinación del peso molecular mediante espectroscopía de masas, confirmando la viabilidad del principio de codificación por la secuencia peptídica (Tabla 2).

Se realizó un análisis alternativo sobre perlas seleccionadas aleatoriamente de la segunda biblioteca. Las perlas individuales se trataron con un agente reductor para desestabilizar el enlazador SCAL y la estructura no peptídica se escindió por una mezcla de TFA/agua. Después de este tratamiento, las perlas se secuenciaron con éxito (véase la Tabla II) y pudo deducirse la estructura del compuesto no peptídico. Los compuestos escindidos se analizaron en un sistema de micro HPLC.

### 8. Ejemplo: Biblioteca: XXXX-Lys(XXXX)-Lys(ZZ)- $\beta$ Ala-Gly- $\beta$ Ala-Gly-TG

El presente ejemplo demuestra el uso de un péptido codificante para codificar una porción no secuenciable de un péptido simultáneamente con la porción secuenciable del péptido compuesto de ensayo.

#### 8.1 Materiales y métodos

##### 8.1.1 Síntesis de la biblioteca

La biblioteca se sintetizó de acuerdo con el siguiente protocolo. 1. Acoplamiento de Fmoc-Lys (Boc) a H- $\beta$ Ala-Gly- $\beta$ Ala-Gly-TG; 2. Escisión de Fmoc; 3. Acoplamiento de Fmoc-Lys (Fmoc); 4. Escisión de Boc; 5. Después

## ES 2 289 194 T3

división de la resina en 9 porciones y acoplamiento de los siguientes aminoácidos protegidos con Ddz en reacciones diferentes: A, D, I, K, M, N, S, T, V; 6. Escisión de Fmoc; 7. Acoplamiento de 9 aminoácidos protegidos con Fmoc: Y, G, F, L, H, P, Q, R, E (Y se acopló a la parte de resina que ya se había unido a A, etc.); 8. Combinación de resina y escisión de Ddz; 9. Repetición de las etapas 5-7; 10. Escisión de Fmoc; 11. Acoplamiento de 9 aminoácidos protegidos con Fmoc: Y, G, F, L, H, P, Q, R, E; 12. Repetición de las etapas 10-11; 13. Escisión de Fmoc; 14. Eliminación de los grupos protectores de la cadena lateral y Ddz mediante la mezcla K (King *et al.*, 1990, Int. J. Pep. Protein Res. 36:255-266).

Una perla se sometió a cuatro ciclos de degradación de Edman: 1<sup>er</sup> ciclo: Arg (64); Ile (67); 2<sup>o</sup> ciclo: Gly (45), Thr (14), 3<sup>er</sup> ciclo: Phe (42), 4<sup>o</sup> ciclo: Arg (35). La Ile estaba protegida con Ddz para el acoplamiento y se encontró en el primer ciclo. Codificaba Phe, que se detectó en el tercer ciclo. En el segundo ciclo se detectó Thr como el aminoácido que se había acoplado protegido con Ddz. De acuerdo con esto, Arg, codificado por Thr, se encontró en el cuarto ciclo de secuenciación.

### 8.1.2 Protocolo de selección de la biblioteca

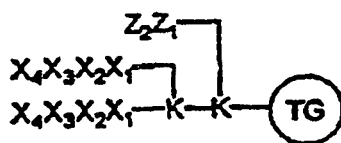
La biblioteca de péptidos se exploró de acuerdo con procedimientos publicados (Lam y Lebl, 1992, Immunomet-hods 1:11-15). Las perlas peptídicas se mezclaron en primer lugar con agua doblemente destilada para retirar la DMF. Después de un lavado minucioso con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM, pH 7,2), las perlas se recubrieron con gelatina al 0,05% (p/v) para bloquear cualquier unión no específica. Después se incubaron las perlas con una dilución de 1:100.000 de estreptavidina-fosfatasa alcalina a 2 mg/ml (Pierce; Rockford, IL) en 2 x PBS/Tween/gelatina (2 x PBS, Tween 20 al 0,1% (v/v), y gelatina al 0,05% (p/v)). Después, las perlas se lavaron minuciosamente con TBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, base Tris 25 mM, pH 7,4) y se añadió el sustrato convencional 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato. Las perlas, junto con el sustrato, se transfirieron después a placas de Petri para que desarrollaran color. Después de un periodo de 30 minutos a 1 hora, se recogieron las perlas coloreadas con la ayuda de una micropipeta, se lavaron con clorhidrato de guanidina 6 M, pH 1,0, y se sometieron a secuenciación como se describe.

La biblioteca de perlas incoloras restante se recicló con clorhidrato de guanidina 8 M, pH 2,0, se lavó minucio-samente con PBS y se incubó con anti- $\beta$ -endorfina biotinilada 60 pM (clon 3-E 7, Boehringer Mannheim) en 2 x PBS/Tween/gelatina durante una noche. Después de lavar minuciosamente, se añadió estreptavidina-fosfatasa alcali-na. Una hora después, la perlas se lavaron, se añadió sustrato y se produjo desarrollo del color como se ha descrito anteriormente. Las perlas de color después se aislaron físicamente y se sometieron a secuenciación. En estos dos experimentos, solamente se secuenciaron las perlas más oscuras.

### 8.2 Resultados y análisis

Las secciones 6 y 7, *supra*, muestran que un “compuesto de ensayo” puede codificarse por una secuencia peptídica “codificante”. Este principio también puede usarse para la determinación de la estructura de péptidos que contienen un componente no secuenciable en la cadena peptídica. En este caso, es necesario codificar solamente los restos de aminoácidos situados en el extremo carboxilo de la molécula, después de la parte no secuenciable. Se construyó una biblioteca que imitaba a esta situación, aunque el “compuesto de ensayo” no contiene realmente un componente no secuenciable. La estructura de la biblioteca se proporciona en el Esquema XIV.

Esquema XIV



**X = YGFLHPQRE**

**Z = ADIKMNSTV**

Los restos de aminoácidos X<sub>4</sub> y X<sub>3</sub>, en el brazo del “compuesto de ensayo” no están codificados por ningún homólogo en el brazo “codificante”. Los aminoácidos Z<sub>1</sub> y Z<sub>2</sub> codifican restos X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> y están presentes a la mitad de la concentración de los aminoácidos en la secuencia “de ensayo”. Dos ciclos de degradación de Edman pueden revelar la estructura del péptido de interés. El aminoácido detectado en mayor cantidad es el resto de la posición 1 ó 2 de la secuencia “de ensayo”. El aminoácido detectado en menor cantidad es el resto que codifica la posición 4 ó 3 de esta secuencia. El aminoácido codificante puede ser el mismo que aquel para el que codifica, o puede ser un aminoácido diferente. El conjunto de aminoácidos codificantes y de selección usados en este ejemplo se proporciona en el Esquema XIV.

TABLA 3

Resultados de Secuenciación				
	1 <sup>er</sup> Ciclo	2 <sup>o</sup> Ciclo	Secuencia Deducida	Diana
5				
10	Y, D	G, I	YGGF	anti- $\beta$ -endorfina
	Y, N	G, I	YGPF	anti- $\beta$ -endorfina
	Y, D	G, K	YGGL (3x)	anti- $\beta$ -endorfina
15	H, S	P, I	HPQF (5x)	estreptavidina

La síntesis de la biblioteca se realizó con el uso de una combinación de tres grupos protectores de amino. La protección temporal del grupo  $\alpha$ -amino en la secuencia "de selección" se proporcionó por el grupo Fmoc, que se puede escindir por piperidina en dimetilformamida. La protección temporal de la secuencia "codificante" se consiguió mediante el uso del grupo Ddz (Birr *et al.*, 1972, *Liebig's Ann. Chem.* 763: 162-173), escindible con ácido trifluoroacético diluido (al 2%). Los grupos funcionales de la cadena lateral se protegieron con grupos protectores de tipo *tert*-butilo escindibles mediante ácido trifluoroacético de mayor concentración (50%). Un ciclo de aleatorización con señalización de secuencias consistía en (i) división de resina en la cantidad de recipientes de reacción correspondiente a la cantidad de aminoácidos aleatorizados en esta etapa, (ii) acoplamiento de aminoácidos protegidos con Fmoc (Y, G, F, L, H, P, Q, R, E); (iii) lavado, escisión del grupo Ddz y neutralización, (iv) acoplamiento de aminoácidos protegidos con Ddz correspondientes (A, D, I, K, M, N, S, T, V), (v) mezcla del soporte sólido y desprotección del grupo Fmoc.

Esta biblioteca se usó en la exploración frente a dos dianas modelo, anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -endorfina y estreptavidina. Las perlas positivas se identificaron mediante la técnica de tinción convencional (Lam y Lebl, 1992, *Inmunomethods*, 1:11-15; Lam *et al.*, 1991, *Nature* 354: 82-85), y las perlas (5 para cada diana) identificadas en esta exploración se sometieron a dos ciclos de degradación de Edman. Los resultados de los dos ciclos de degradación de Edman se proporcionan en la Tabla 3. Como puede verse, las perlas positivas para estreptavidina dieron en todos los casos H ( $X_1$ ) y S ( $Z_1$ ) (que codifican Q,  $X_3$ ) en el primer ciclo y P ( $X_2$ ) e I ( $Z_2$ ) (que codifican F,  $X_4$ ) en el segundo ciclo. Por lo tanto, la secuencia del brazo de selección HPQF podía decodificarse fácilmente. Las perlas identificadas en la exploración anti- $\beta$ -endorfina dieron resultados más variados. Además de Y ( $X_1$ ) y D ( $Z_1$ ) (que codifica G,  $X_3$ ), también se encontró N ( $Z_1$ ) (que codifica P,  $X_3$ ) en el primer ciclo, y se encontraron G ( $X_2$ ) e I ( $Z_2$ ) (que codifica F,  $X_4$ ) y K ( $Z_2$ ) (que codifica L,  $X_4$ ) en el segundo ciclo. Por lo tanto, las secuencias YGGL (3x), YGGF e YGPF podían construirse a partir de estos datos. Estas secuencias están de acuerdo con los datos obtenidos anteriormente (Lam y Lebl, *supra*; Lam *et al.*, 1991, *supra*, Lam *et al.*, 1993, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2:419-429).

Estos experimentos establecen claramente que pueden usarse péptidos para codificar otras estructuras, que son parcial o totalmente insecuenciables. Esta tecnología tendrá mayor importancia debido a su amplia aplicabilidad al estudio de interacciones moleculares ligado-aceptor y al desarrollo de fármacos. Las bibliotecas codificadas abren la puerta a la aplicación de enfoques paralelos amplios a la síntesis de fármacos y la exploración de bibliotecas no peptídicas.

#### 9. Ejemplo: Bibliotecas de estructuras no peptídicas basadas en química de síntesis de péptidos en fase sólida

El presente ejemplo combina la simplicidad de la síntesis de estructuras peptídicas con la diversidad disponible usando subunidades alternativas además de aminoácidos convencionales. Las subunidades más sencillas para la construcción de bibliotecas se describen en la sección 5.5.9, *supra*.

La síntesis de la presente biblioteca implicaba el uso de aminoácidos trifuncionales y la modificación de una cadena lateral para conseguir la multiplicidad estructural. Los aminoácidos tales como el ácido diaminobutírico, ácido aspártico, cistina y/o ácido iminodiacético son las subunidades más pequeñas en cuyas cadenas laterales pueden unirse ácidos carboxílicos, aminas, isocianatos o haluros (alifáticos, aromáticos o heterocíclicos). Estos aminoácidos pueden actuar por sí mismos como armazón para una derivatización adicional.

Para conseguir una unión razonable a un aceptor (por ejemplo receptor, anticuerpo, enzima, ácido nucleico, etc.) debe realizarse la disposición espacial apropiada de las estructuras de interacción. La representación lineal de cadenas laterales de aminoácidos en bibliotecas peptídicas puede no ser un formato óptimo para la selección de las mejores estructuras de unión. La estrategia óptima para presentar las estructuras que interaccionan puede ser su colocación en un armazón molecular, que podría mapear el espacio conformacional apropiado. Las interrelaciones de los mismos bloques de construcción individuales en las disposiciones de armazón pueden modificarse usando diferentes formaciones de armazones así como diferentes cadenas laterales.

## 9.1. Materiales y métodos

## 9.1.1 Instrumentos

5 Se realizaron mediciones de espectrometría de masas de bombardeo atómico rápido (FAB) en un espectrómetro ZAB EQ (VG Analytical Ltd, Manchester, UK). Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN se obtuvieron en un instrumento QE 300 de la General Electric (Fullerton, CA). La secuenciación mediante degradación de Edman se realizó en un secuenciador de proteínas ABI 4778 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y un instrumento Porton PI 3010 (Porton Instruments, Tarzana, CA). Tanto la HPLC analítica como la preparativa se realizaron en un sistema Waters 625 LC con un detector de múltiples longitudes de onda programable Waters 490 E usando columnas Vydac Peptide y Protein C18 analítica  
10 (4,6 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 1 ml/min) y preparativa (10 x 250 mm, 10  $\mu\text{m}$ , 3 ml/mi) respectivamente. Los análisis de las mezclas liberadas de una perla se realizaron en un analizador Ultrafast Microprotein (Michrom BioResources, Pleasanton, CA) usando una columna Reliasil C18 (5  $\mu\text{M}$ , 300A, 1 x 150 mm). Todos los espectros se presentaron en ppm en relación con tetrametilsilano ( $\delta$ ) usando  $\text{CDCl}_3$  o  $\text{CD}_3\text{SOCD}_3$  como disolventes. Los espectros de absorción  
15 UV/VIS se registraron en un espectrofotómetro Hewlett Packard HP 8452&Aring; con serie de diodos usando una cubeta de cuarzo de 1 cm. Los análisis de aminoácidos se realizaron en un sistema D-500, (Durrum Corp., Palo Alto, CA).

## 9.1.2 Procedimientos

20 La síntesis en fase sólida se realizó de forma manual en jeringas de polipropileno como describen Krechnak y Vagner (1990, Peptide Res 3:182-193). Las síntesis se realizaron en resina TentaGel S  $\text{NH}_2$  (TG) (Rapp Polymere, Tübingen, Alemania, 130 o 80  $\mu\text{m}$ , 0,23 mmol/g) modificada con un tirador SCAL (Patek y Lebl, 1991, Tetrahedron Lett. 22:3891-3894) (enlazador amida de seguridad) o con un enlazador apropiado. Los grupos protectores Fmoc se escindieron con piperidina al 50%/DMF durante 1 x 10 minutos, los grupos Tfa mediante tratamiento repetido (3 x 1 minuto + 90 minutos) con piperidina al 10%/agua. Los grupos Npys se retiraron mediante solución 0,3 M de HCl en dioxano durante 5 + 30 minutos, el grupo Alloc mediante  $(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Pd}$  en DMF/AcOH/N-Me-morfolina (10:2:1), y los grupos Boc se escindieron con TFA al 30%/DCM que contenía 3% de anisol durante 20 minutos. Se usó una solución de DIEA/DCM (10%) para la neutralización después de la escisión de Boc. Se usó una mezcla de BOP/HOBt/DIEA  
30 (1:1:2 equivalentes) en DMF para la activación de los aminoácidos N- $\alpha$ -Fmoc y Boc. La finalización de cada reacción de condensación (1,5 -40 horas) se comprobó mediante ensayo de ninhidrina o mediante ensayo de cloranilo en los casos de acoplamiento a grupos amino secundarios. El protocolo de acoplamiento incluía lavar con DMF (6-8 veces) [seguido de lavado con DCM en el caso de aminoácidos protegidos con Boc] entre acoplamiento y desprotección y entre desprotección y acoplamiento. El enlazador SCAL se redujo por  $(\text{EtO})_2\text{P(S)SH}$  al 20% en DMPU durante 2  
35 horas. La escisión final se realizó mediante una mezcla de TFA al 95%- agua al 5%.

## 9.1.3. Reactivos

40 Se usaron disolventes de calidad comercial sin purificación adicional. Los aminoácidos protegidos se obtuvieron en Bachem (Torrance, CA) Advanced ChemTech (Louisville, KY) o propéptido (Vert-le-Petit, Francia). Las aminas y los ácidos carboxílicos se obtuvieron en Aldrich (Milwaukee, WI).

## 9.1.4. Síntesis de una biblioteca no peptídica en armazón no peptídico

45 Mono *tert*-butiloxicarboniletilendiamina. Este compuesto se preparó como se ha descrito anteriormente (Krapcho *et al.*, 1990, Synthetic Commun. 20:2559-2564). En resumen, se añadió lentamente una solución de dicarbonato de *tert*-butilo (5,0 g, 0,023 mol) en dioxano (50 ml) a etilendiamina (11,0 ml, 0,165 mol) en dioxano (60 ml). Después de 24 horas de agitación, el disolvente se evaporó y el residuo se disolvió en agua (80 ml), el subproducto insoluble se retiró por filtración y el filtrado se extrajo con diclorometano (3 x 100 ml). Después de la evaporación del disolvente,  
50 el producto se cristalizó en una mezcla de disolvente de dietiléter-éter de petróleo o acetato de etilo-éter de petróleo. Rendimiento 2,6 g (71%). RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C)  $\delta$ : 1,39 (s, 9H, tBu), 2,83 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,16 (q, 2H,  $\text{C}^b\text{H}_2$ ), 6,93 (t, 1H, NH), 7,77 (a, 2H,  $\text{NH}_2$ ). P.f. 75°C.

55 N-*tert*-butiloxicarbonil-N'-fluorenilmetiloxicarboniletilendiamina. Se añadió lentamente una solución de carbonato de fluorenilmetil succinimidilo (31,0 g, 0,092 mol) en acetonitrilo (300,0 ml) a mono *tert*-butiloxicarboniletilendiamina (10,0 g, 0,063 mol) disuelta en  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  acuoso al 10% (250 ml). Se evaporó el acetonitrilo y el producto se extrajo con acetato de etilo, la fase orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , se concentró y se dejó cristalizar el producto añadiendo éter de petróleo. El producto se recogió en un filtro y se lavó con éter de petróleo. Rendimiento 20,0 g (84%).  
60 TLC éter de petróleo - dietiléter 88:12 R<sub>f</sub> 0,64. RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C)  $\delta$ : 1,37 (s, 9H, tBu), 2,99 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 4,20-4,29 (m, 3H, Fmoc  $\text{OCH}_2\text{CH}$ -), 6,76 (t, 1H, NH); 7-25 (t, 1H, NH), 7,33-7,89 (m, 8H, Fmoc). P.f. 146-148°C.

65 Trifluoroacetato de mono N-fluorenilmetiloxicarboniletilendiamina. Se trató N-*tert*-butiloxicarbonil-N'-fluorenilmetiloxicarboniletilendiamina (20,0 g, 0,052 mol) con ácido trifluoroacético y anisol en diclorometano (10:10:1) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la evaporación a sequedad, el producto bruto se cristalizó en una mezcla de disolventes de acetato de etilo-n-hexano. Rendimiento 15,0 g (73%). RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C)  $\delta$ : 2,85 (m, 2H,  $\text{C}^a\text{H}_2$ ), 3,22 (m, 2H,  $\text{C}^b\text{H}_2$ ), 4,23-4,36 (m, 3H, Fmoc  $\text{OCH}_2\text{CH}$ -), 7,37 (m, 1H, NH), 7,34-7,89 (m, 8H, Fmoc), 7,77 (a, 2H,  $\text{NH}_2$ ). P.f. 128-129°C.

## ES 2 289 194 T3

Anhídrido 1,3-dicarboxílico del ácido *cis,cis*-1,3,5-trimetilciclohexano-5-carboxílico (1). El compuesto (1) se preparó como se ha descrito (Askew *et al.*, 1989, J. Am. Chem. Soc. 111:1082-1090). En resumen; se calentó a reflujo ácido *cis,cis*-1,3,5-trimetilciclohexano-1,3,5-tricarboxílico (1,0 g, 0,004 mol) en xileno (50 ml) durante 19 horas en nitrógeno usando una válvula Firestone y trampa Dean-Stark. La solución resultante se concentró al vacío y el producto se dejó cristalizar. Después de recogerse en un filtro, el producto se secó al vacío a 70°C durante una hora. Rendimiento 0,78 g (82%). RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25°C) δ: 1,10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,16 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 1,33, 2,39 (d, d, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 1,33, 2,15 (d, d, 2H, CH<sub>2</sub>), 12,60 (s, 1H, COOH), P.f. 252-253°C, lit. (32) p.f. 252-254°C.

Ácido 5-(*N-terc*-butiloxycarbonilaminoetilcarboxamida)-*cis,cis*-1,3,5-trimetilciclohexano-1,3-dicarboxílico (2). El anhídrido del ácido (1) (0,5 g, 0,002 mol) se disolvió en DMF (4 ml) y se añadió mono *terc*-butiloxycarboniletilendiamina (0,33 g, 0,002 mol) disuelta en DMF (4 ml) en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó durante aproximadamente 5 horas (control de TLC) y después se evaporó la DMF. El producto se cristalizó en la mezcla disolvente de acetato de etilo-éter de petróleo. Rendimiento 0,38 g (47%). RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25°C) δ: 1,08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,13 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 1,34 (s, 9H, tBu), 1,07, 2,51 (d, d, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 2,43 (d, 2H, CH<sub>3</sub>), 2,96 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 6,70 (t, 1h, NH), 7,71 (t, 1H, NH); 12,10 (s, 1H, COOH). P.f. 161-164°C.

Anhídrido 5-(*N-terc*-butiloxycarbonilaminoetilcarboxamida)-*cis,cis*-1,3,5-trimetilciclohexano-1,3-dicarboxílico (3). Se añadió dicitohexilcarbodiimida (0,55 g, 0,002 mol) a la solución de diácido (2) (1,0 g, 0,0025 mol) en DCM (70 ml) en una atmósfera de nitrógeno. Después de 4 horas de agitación, la mezcla de reacción se concentró y se retiró por filtración la ciclohexilurea. El filtrado se evaporó a sequedad y residuo se cristalizó en la mezcla disolvente de acetato de etilo - éter de petróleo, y se secó en un desecador (KOH, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) al vacío. Rendimiento 0,9 g (95%).

Ácido 5-(*N-terc*-butiloxycarbonilaminoetilcarboxamida)-3-(*N*-fluorenilmetiloxycarbonilaminoetilcarboxamida)-*cis,cis*-1,3,5-trimetilciclohexano-1-carboxílico (4). El anhídrido (3) (0,85 g, 0,002 mol) se disolvió en DMF (10 ml) y se añadió solución de trifluoroacetato de mono *N*-fluorenilmetiloxycarboniletilendiamina (0,88 g, 0,002 mol) en DMF (15 ml) en presencia de trietilamina (pH 8,5 ajustado) en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó durante 4 horas (control con TLC) y después se evaporó a sequedad. El producto bruto se sometió a cromatografía ultrarrápida (gel de sílice Merck 60 de malla 230-400) en el sistema de disolvente de DCM-MeOH 25:1. Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron, se evaporaron a sequedad y el producto se cristalizó en la mezcla disolvente de acetato de etilo-éter de petróleo. Rendimiento 0,32 g (24%). RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25°C) δ: 1,08 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 1,14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,35 (s, 9H, tBu), 4,25 (m, 3H, Fmoc OCH<sub>2</sub>CH-), 6,86 (t, 1H, NH), 7,32-7,89 (m, 8H, Fmoc). P.f. 118-121.

Biblioteca no peptídica en armazón no peptídico. El compuesto (4) se usó como armazón para una biblioteca no peptídica. Se sometió TentaGel S NH<sub>2</sub> (0,4 g, sustitución de 0,21 mequiv de NH<sub>2</sub>/g) a síntesis en fase sólida usando el siguiente protocolo.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 289 194 T3

Etapa	Reactivo	Tiempo
1	DIEA al 5%/DMF	2 x 5 minutos
2	lavado con DMF	10 x 2 minutos
3	Fmoc-Lys (Boc)/BOP	hasta que el ensayo de ninhidrina sea negativo
4	repetir la etapa 2	
5	DCM	10 x 2 minutos
6	TFA/DCM/anisol	1 x 30 minutos
7	Repetir la etapa 5	
8	DIEA al 5%/DCM	3 x 2 minutos
9	repetir la etapa 2	
10	la resina se dividió en 20 porciones y los ácidos se definieron antes de acoplarlos. Los anhídridos se usaron como tales, se acoplaron otros ácidos carboxílicos usando reactivo BOP.	
	ácido piválico	
	ácido fenilacético	
	ácido difenilacético	
	ácido 1-adamantanoacético	
	Z-Gly	
	Clz-β-Ala	
	Clz-ácido aminocaproico	
	diBoc-ácido guanidinoacético	
	diBoc-ε-ácido guanidinopentanoico	
	ácido succinámico	
	ácido 2-furoico	
	ácido p-hidroxibenzoico	

## ES 2 289 194 T3

	ácido isonicotínico	
	ácido 4-fenilbutírico	
5	anhídrido acético	
	anhídrido n-butírico	
	anhídrido n-caproico	
10	anhídrido benzoico	
	anhídrido succínico	
15	anhídrido glutámico	
	11 repetir la etapa 2	
	12 piperidina al 50%/DMF	10 minutos
20	13 repetir la etapa 2	
	14a compuesto 4/DIC/HOBt	30 minutos
		(preactivación)
25	14b producto de la etapa 14a	hasta que el ensayo Kaiser sea negativo
	15 repetir la etapa 11-13	
30	16 resina dividida en 20 porciones y ácidos definidos en la etapa 10 acoplados. Los anhídridos se usaron como tales y otros ácidos carboxílicos primero se activaron por la mezcla DIC/HOBt	
35		
	17 lavado con DMF	10 x 2 minutos
40	18 DCM	3 x 2 minutos
	19 TFA/DCM/anisol	1 x 30 minutos
45	25 DCM	5 x 2 minutos
	26 DIEA al 5%/DCM	3 x 2 minutos
	27 lavado con DMF	4 x 2 minutos
50	28 resina dividida en 20 porciones y ácidos definidos en la etapa 10 acoplados. Los anhídridos se usaron como tales y otros ácidos carboxílicos primero se preactivaron por la mezcla DIC/HOBt	
55		
	29 lavado con DMF	10 x 2 minutos
60	30 lavado con DCM	3 x 2 minutos
	31 TFA/TFMSA/TA	30 minutos
	32 lavado con DCM	3 x 2 minutos
65	33 lavado con DMF	5 x 2 minutos

## 9.1.5 Biblioteca ramificada en Tentagel

Se hinchó previamente TentaGel S NH<sub>2</sub> (5 g, 0,23 mol/g, 130 μm de tamaño de perla) en DMF y se construyó la biblioteca ramificada de acuerdo con el siguiente protocolo: (1) acoplamiento del enlazador SCAL; (2) Desprotección de Fmoc; (3) acoplamiento de Fmoc-Lys (Tfa); (4) Desprotección de Fmoc; (5) acoplamiento de Fmoc-β-Ala; (6) desprotección de Fmoc; (7) acoplamiento de Fmoc-Lys (Boc); (8) desprotección de Fmoc; (9) acoplamiento de Fmoc-β-Ala; (10) desprotección de Boc; (11) primera aleatorización; (12) desprotección de Fmoc; (13) segunda aleatorización; (14) desprotección de Tfa; (15) acoplamiento de Fmoc-Lys(Tfa); (16) desprotección de Fmoc; (17) acoplamiento de Fmoc-β-Ala; (18) desprotección de Fmoc; (19) tercera aleatorización; (20) desprotección de Tfa, (21) cuarta aleatorización; (22) desprotección de cadenas laterales. En cada aleatorización se acoplaron los siguientes ácidos: acético, n-butírico, pivalico, n-caproico, benzoico, fenilacético, 4-fenilbutírico, difenilacético, 1-adamantanoacético, succínico, glutámico, glicina, β-alanina, épsilon-amino-n-caproico, guanidoacético, gamma-guanidinobutírico, succinámico, p-hidroxibenzoico, 2-furoico y ácido isonicotínico. Estas subunidades y los aminoácidos correspondientes que codifican cada subunidad se presentan en la Tabla 4. Los aminoácidos se acoplaron como anhídridos cuando estaban disponibles en el mercado (10 equivalentes de anhídrido, 1,2 equivalentes de DIEA), o se preactivaron durante 20 minutos (ácido 12 equivalentes, DIC 10 equivalentes, HOBt 10 equivalentes). Debido a que tenían una solubilidad muy mala en DMF, los ácidos guanidino (12 equivalentes) se disolvieron en DMF que contenía HOBt y LiCl y se activaron por DIC. Sin embargo, en un experimento de control solamente se observó un acoplamiento de aproximadamente 70 a 90% en esas condiciones. Después de finalizar la síntesis, la biblioteca se lavó con TFA (3x), DCM (5x), DMF (5x), DMF/HCl al 0,1%, (1:1) (3x) y HCl al 0,02%.

TABLA 4

Esquema de protección, activación y codificación por ácidos			
Ácido	Prot.	Activ.	Codificado por
Ácido acético		Anhídr.	Ala
Ácido n-butírico		Anhídr.	Asn
Ácido pivalico		Anhídr.	Asp
Ácido n-caproico		Anhídr.	Glu
Ácido benzoico		Anhídr.	Gln
Ácido fenilacético		DIC, HOBt	Gly
Ácido 4-fenilbutírico		DIC, HOBt	His
Ácido difenilacético		DIC, HOBt	Ile
Ácido 1-adamantanoacético		DIC, HOBt	Leu
Ácido succínico		Anhídr.	Lys
Ácido glutámico		Anhídr.	Met
Glicina	Boc	DIC, HOBt	Orn
Beta-alanina	Boc	DIC, HOBt	Phe
Ácido ε-amino-n-caproico	Boc	DIC, HOBt	Pro
Ácido guanidoacético	diBoc	DIC, HOBt	Ser
Ácido γ-guanidinopentanoico	diBoc	DIC, HOBt	Thr
Ácido succinámico		DIC, HOBt	Trp
Ácido p-hidroxibenzoico		DIC, HOBt	Tyr
Ácido 2-furoico		DIC, HOBt	Val
Ácido isonicotínico		DIC, HOBt	Nva

## ES 2 289 194 T3

### 9.1.6 Biblioteca codificada ramificada en Tentagel

Se hinchó previamente TentaGel S NH<sub>2</sub> (5 g, 0,23 mmol/g, 130 μm de tamaño de perla) en DMF y se construyó la biblioteca ramificada con secuencia codificante de acuerdo con el siguiente protocolo: (1) acoplamiento de Fmoc-Lys (Ddz-Gly); (2) desprotección de Fmoc; (3) acoplamiento de Fmoc-Lys(Tfa); (4) desprotección de Fmoc; (5) acoplamiento de Fmoc-β-Ala; (6) desprotección de Fmoc; (7) acoplamiento de Fmoc-Lys (Npys); (8) desprotección de Fmoc; (9) acoplamiento de Fmoc-β-Ala; (10) desprotección de Fmoc; (11) primera aleatorización; (12) desprotección de Ddz en cada recipiente de reacción por separado; (13) acoplamiento de aminoácido codificante protegido con Fmoc; (14) desprotección de Npys; (15) segunda aleatorización; (16) desprotección de Fmoc-en cada recipiente de reacción por separado; (17) acoplamiento de aminoácido codificante protegido con Fmoc; (18) desprotección de Fmoc del brazo codificante; (19) acoplamiento de Ddz-Phe; (20) desprotección de Tfa, (21) acoplamiento de Fmoc-Lys (Npys); (22) desprotección de Fmoc; (23) acoplamiento de Fmoc-β-Ala; (24) desprotección de Fmoc; (25) tercera aleatorización; (26) desprotección de Ddz en cada recipiente de reacción por separado; (27) acoplamiento de aminoácido codificante protegido con Fmoc; (28) desprotección de Npys; (29) cuarta aleatorización; (30) desprotección de Fmoc en cada recipiente de reacción por separado; (31) acoplamiento de aminoácido codificante protegido con Fmoc; (32) desprotección de Fmoc; (33) desprotección de cadenas laterales. La biblioteca se lavó con TFA (3x), DCM (5x), DMF (5x), DMF/HCl al 0,1% (1:1) (3x), y HCl al 0,02%.

### 9.1.7 Biblioteca ramificada con codificación en Sepharose Fast Flow (FFS)

Se tamizó FFS para obtener una distribución de tamaño de partícula más estrecha (tamaño de perla 85-125 μm), se puso en un recipiente de reacción para la síntesis peptídica y se lavó 10 veces con DMF. Se activó Fmoc-Gly (2,97 g) en DMF mediante DIC (1,57 ml) y HOBt (1,35 g) y se añadió a 10 ml de FFS. La reacción se catalizó con 0,25 g de dimetilaminopiridina y la suspensión se agitó durante una noche. Se lavó el Fmoc-Gly-FFS 10 veces con DMF, se escindió Fmoc, se lavó la resina con DMF y se calculó la sustitución de acuerdo con la absorbancia de la solución de desprotección a 320 nm. La sustitución típica fue de 0,1 mmol/ml. Después se activó la mezcla de Fmoc-β-Ala y Boc-β-Ala (proporción molar 3:1) mediante DIC y HOBt y se acopló a Gly-FFS en exceso 3 molar. Se lavó la FFS 10 veces con DMF, se retiraron los grupos Fmoc y los grupos amino libres se acetilaron con Ac<sub>2</sub>O/Py (1:1) durante 10 minutos. Después de lavar 10 veces con DMF y DCM, se retiró Boc mediante TFA/DCM/anisol (45:45:10) durante 5 + 30 minutos, la FFS se lavó con DCM (10 veces), se neutralizó con DIEA al 2%/DCM (3 veces 1 minuto) y se lavó 10 veces con DMF.

La biblioteca ramificada con la secuencia codificante se construyó de acuerdo con el siguiente protocolo: (1) acoplamiento de Fmoc-Lys (Ddz-Gly); (2) desprotección de Fmoc; (3) acoplamiento de Fmoc-Lys (Alloc); (4) desprotección de Fmoc; (5) acoplamiento de Fmoc-β-Ala; (6) desprotección de Fmoc; (7) acoplamiento de Fmoc-Lys (Npys); (8) desprotección de Fmoc; (9) acoplamiento de Fmoc-β-Ala; (10) desprotección de Fmoc; (11) primera aleatorización; (12) desprotección de Ddz en cada recipiente de reacción por separado, (13) acoplamiento de aminoácido codificante protegido con Fmoc; (14) desprotección de Npys; (15) segunda aleatorización; (16) desprotección de Fmoc en cada recipiente de reacción por separado, (17) acoplamiento de aminoácido codificante protegido con Fmoc, (18) desprotección de Fmoc del brazo codificante, (19) acoplamiento de Ddz-Phe, (20) desprotección de Alloc; (21) acoplamiento de Fmoc-Lys(Npys); (22) desprotección de Fmoc; (23) acoplamiento de Fmoc-β-Ala; (24) desprotección de Fmoc; (25) tercera aleatorización; (26) desprotección de Ddz en cada recipiente de reacción por separado, (27) acoplamiento de aminoácido codificante protegido con Fmoc, (28) desprotección de Npys; (29) cuarta aleatorización; (30) desprotección de Fmoc en cada recipiente de reacción por separado, (31) acoplamiento de aminoácido codificante protegido con Fmoc, (32) desprotección de Fmoc, (33) desprotección de cadenas laterales. La biblioteca se lavó con TFA (3x), DCM (5x), DMF (5x) DMF/HCl al 0,1%, (1:1) (3x) y HCl al 0,02%.

### 9.1.8 Biblioteca de subunidades peptídicas y no peptídicas mezcladas

La biblioteca se sintetizó en TentaGel S NH<sub>2</sub>, 90 μm, (Rapp Polymere, Alemania) (2 g, sustitución 0,25 mmol/g, 0,5 mmol). En primer lugar, la secuencia Gly-βAla-Gly-βAla-Gly-Lys(Tfa)-TG idéntica para todas las secuencias se sintetizó usando un exceso de cinco equivalentes de Fmoc-aminoácidos activados (activación DIC/HOBt). Después de la desprotección de Fmoc-N-terminal, la resina se dividió en 9 porciones en la proporción 17:8:5:1:1:1:1:1:1 (36 partes, 0,014 mmol por parte). Las estructuras de las subunidades usadas en esta biblioteca se muestran en la Figura 8, junto con el dipéptido de aminoácidos que codifica cada una de las subunidades. Las subunidades que se añadieron a cada porción se indican entre paréntesis. Estas porciones se trataron adicionalmente de la siguiente manera:

porción de 17 partes (x<sub>2</sub> = 1-17): se acopló Fmoc-Dab(Boc)-OH (exceso de 5 equivalentes), el grupo protector de la cadena lateral Boc se retiró mediante TFA/DCM/anisol (50:50:2, 15 minutos) y, después de las etapas de lavado, esta porción se dividió en 17 partes. Los ácidos correspondientes se acoplaron al grupo amino de la cadena lateral libre mediante activación con DIC/HOBt convencional.

porción de 8 partes (x<sub>2</sub> = 18-25): se acopló Fmoc-Asp(OBu')-OH (exceso de 5 equivalentes), el grupo protector de la cadena lateral Bu' se retiró mediante TFA/DCM/anisol (50:50:2, 15 minutos) y, después de las etapas de lavado, esta porción se dividió en 8 partes. Las aminas correspondientes se acoplaron a la cadena lateral de acuerdo con el procedimiento que se describe a continuación.

## ES 2 289 194 T3

porción de 5 partes ( $x_2 = 30-34$ ): se añadió una solución de Fmoc-IDA-anhídrido (10 equivalentes, 0,7 mmol en 2 ml de DMF) a la resina y se agitó durante 30 minutos. El procedimiento se repitió una vez más, la resina se lavó con DMF y se dividió en 5 partes. Las aminas se acoplaron de acuerdo con el siguiente procedimiento.

5 El procedimiento general para el acoplamiento de aminas en la cadena lateral, usado para unir las estructuras 18-25 y 30-34, es el siguiente: los grupos carboxi unidos a la resina (0,014 mmol por parte) se activaron mediante una mezcla de DIC/HOBt (10 equivalentes) en 0,4 ml de DMF durante 30 minutos. Esta mezcla se retiró sin lavar y se añadieron 30 equivalentes de la amina apropiada en 0,2 ml de DMF. En el caso de p-toluidina, se añadió una cantidad equimolar de DIEA para la neutralización del clorhidrato. La resina se agitó durante una hora y se lavó con DMF.

10 Porciones de 1 parte (individuales) ( $x_2 = 26-29, 35, 36$ ): las monoamidas protegidas con N-Fmoc del ácido iminodiacético (para las estructuras 26-29) (10 equivalentes, 0,014 mmol por parte) y Fmoc-Cys (Bzl)-OH y Fmoc-D-Pen (Bzl)-OH (5 equivalentes, 0,07 mmol) se acoplaron mediante activación con DIC/HOBt a las porciones individuales, respectivamente.

15 Procedimientos adicionales para las 36 porciones: el grupo Fmoc N-terminal se escindió mediante piperidina/DMF. A las subunidades 1-25, 35 y 36 se acopló Boc-Gly-OH mediante activación con DIC/HOBt (5 equivalentes, 0,07 mmol por parte). Las subunidades 26-34 se hicieron reaccionar con anhídrido simétrico de Boc-Gly-OH (10 equivalentes, 0,12 mmol por parte) en DMF durante una noche.

20 El procedimiento de codificación: escisión del grupo protector Lys (Tfa)- (idéntica para las 36 partes): la resina se lavó con agua y se trató con piperidina al 20%/H<sub>2</sub>O (dos veces, 10+30 minutos). Las resinas se lavaron después con agua y DMF. Posteriormente, se sintetizó la marca para todas las secuencias mediante estrategia Fmoc (activación con DIC-HOBt, 10 equivalentes, 0,14 mmol por parte) sin escisión del grupo protector Fmoc N-terminal de la marca. 25 Las secuencias codificantes para la marca se muestran en la Figura 8. Después se recogieron las 36 porciones, se mezclaron y se dividieron en dos porciones. Solamente a una mitad se le acopló Boc-Gly después de la desprotección del grupo Boc- en la cadena principal. Las dos porciones se mezclaron, se retiró el grupo protector Boc y la resina se dividió en 13 porciones. Se acoplaron Fmoc-Tyr(Bu')-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Thr(Bu')-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Ser(Bu')-OH, 30 Fmoc-Glu(OBu')-OH, Fmoc-Asp(OBu')-OH y Fmoc-Gln-OH (10 equivalentes, 0,38 mmol) mediante activación con DIC/HOBt a esas 13 porciones. Desprotección de la cadena lateral: los grupos de protección de la cadena lateral Boc y Bu' se escindieron mediante TFA/DCM/anisol (50:50:2) (exposición durante 15 minutos) y el grupo Trt se escindió mediante la misma mezcla con adición de una gota de <sup>1</sup>Pr<sub>3</sub>SiH durante 15 minutos. El grupo Pmc se escindió mediante la mezcla K durante una hora. Después de las etapas de lavado y neutralización (DCM, DIEA al 7%/DCM, DMF), 35 las 13 porciones se recogieron y se escindió el grupo Fmoc N-terminal. Después se lavó a la biblioteca con DMF y se transfirió a HCl acuoso al 0,1%.

### 9.1.9 Protocolo de exploración de la biblioteca

40 La biblioteca peptídica se exploró de acuerdo con el procedimiento publicado (Lam y Lebl, 1992, Immunomethods 1:11-15). En primer lugar, se mezclaron las perlas peptídicas con agua doblemente destilada para retirar el DMF. Después se un lavado minucioso con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM, pH 7,2), las perlas se recubrieron con gelatina al 0,05% (p/v) para bloquear cualquier unión no específica. Después, las perlas se incubaron con anticuerpo anti-β-endorfina biotinilado 60 pM (clon 3-E 7, Boehringer Mannheim) en 2 x 45 PBS/Tween/gelatina durante una noche. Después de un lavado minucioso, se añadió estreptavidina-fosfatasa alcalina. Una hora después, se lavaron las perlas y se añadió el sustrato y continuó el desarrollo del color como se ha descrito anteriormente. Después se aislaron físicamente las perlas coloreadas y se sometieron a secuenciación.

50

(Esquema pasa a página siguiente)

55

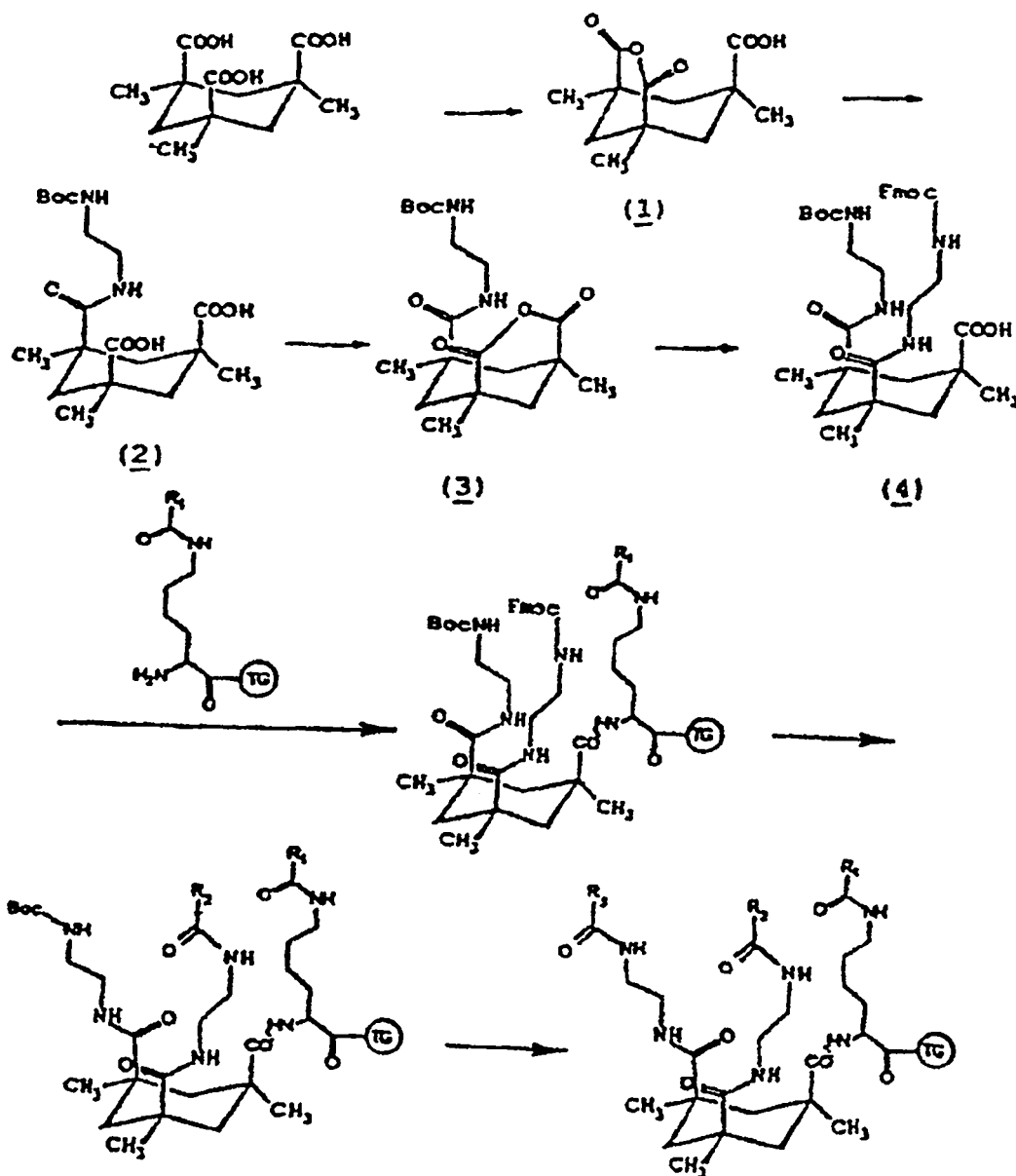
60

65

## 9.2 Resultados y análisis

Un armazón no peptídico alternativo se basa en el uso del triácido de Kemp (Kemp y Petrakis, 1981, J. Org. Chem. 46:5140-5143) (Esquema XV).

Esquema XV

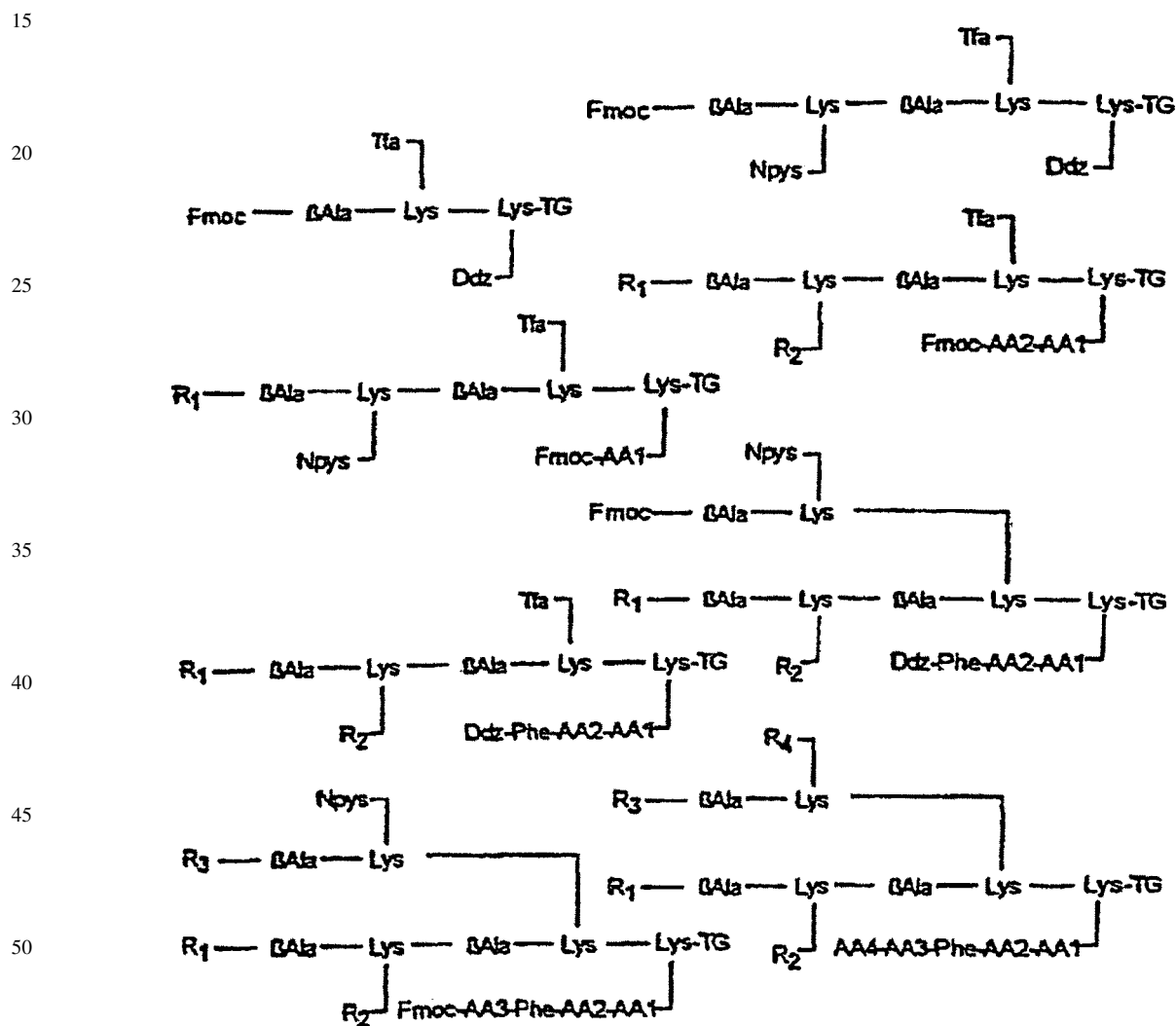


En esta estructura, los tres grupos carboxilo están forzados en la conformación triaxial. El ácido de anhídrido 1 se preparó mediante el procedimiento de deshidratación (Askew *et al.*, 1989, J. Am. Chem. Soc. 111:1082-1090) usando una trampa Dean-Stark en nitrógeno. Este anhídrido de ácido se abrió mediante ataque nucleófilo por *tert*-butiloxicarboniletilendiamina produciendo el diácido de amida 2. El mismo método para la deshidratación no es aplicable para este diácido de amida debido a la inestabilidad del grupo protector Boc en estas condiciones. Una alternativa suave para la preparación del anhídrido de amida 3, peculiar para la química de péptidos, era el uso del procedimiento de dicitlohexilcarbodiimida común en cloruro metileno. Después se abrió el anhídrido de amina 3 mediante fluorenilmetiloxicarbonil-etilendiamina al ácido de diamida 4 correspondiente. Se habían preparado etilendiaminas monoprotegidas partiendo de Boc-etilendiamina que se preparó mediante la adición de un grupo Boc a la etilendiamina usando dicarbonato de *tert*-butilo (Krapcho *et al.*, 1990, Síntesis Commun. 20:2559-2564). Se usó mono Boc-etilendiamina como tal y también sirvió como compuesto de partida para la preparación de trifluoroacetato de monofluorenilmetiloxicarbonil-etilendiamina mediante N-Boc-N'-Fmoc-etilendiamina.

El ácido de diamida 4 puede usarse para la síntesis de armazones que llevan la tercera cadena que contiene el grupo protector ortogonal (Ddz, Alloc) y la función carboxilo o como el propio armazón, siempre que la tercera aleatorización se realice por separado. Se seleccionó el uso de 1 como armazón para sintetizar la biblioteca totalmente no peptídica. La primera aleatorización se realizó en la cadena lateral de lisina aunque puede usarse cualquier aminoácido trifuncional para este fin, y la segunda y tercera aleatorización se realizaron en el armazón. Usando este armazón de conformación forzada se construyó una biblioteca no peptídica aleatorizada con 20 ácidos carboxílicos diferentes.

Un armazón que mapea un espacio conformacional mayor es un accesorio ramificado sencillo construido mediante acoplamiento consecutivo de ácidos diamino carboxílicos. Varios tipos del armazón que mapea un espacio extenso son armazones flexibles típicos o ramificados. Los principios de estas bibliotecas se ilustran generalmente en la Figura 4. El Esquema XVI muestra un ejemplo específico de dicha biblioteca:

Esquema XVI



La síntesis de este armazón requería el uso de cuatro grupos protectores (ortogonales) independientes. Se ensayó el uso de un grupo trifluoroacetilo introducido en la química de péptidos en los años cincuenta (Schallenbert y Calvin, 1955, J. Am. Chem. Soc. 77:2779), pero que no se usaba debido a las severas condiciones requeridas para su desprotección, así como debido a su ineficacia para la protección contra la racemización cuando se usaba como grupo de protección  $\alpha$ -amino. Se descubrió que este grupo no se escinde durante la desprotección de Fmoc usando piperidina al 50% en dimetilformamida, pero se escinde completamente mediante una exposición de 1-2 horas a solución de piperidina (al 20%) en agua, que sin embargo también escinde el grupo Fmoc. La estrategia usada en la construcción de esta biblioteca está clara en el esquema XV.

Pueden combinarse subunidades no aminoácidas con aminoácidos convencionales. Se demostró que este enfoque puede producir estructuras de unión razonable construyendo la minibiblioteca de 936 miembros, habiendo seleccionado aminoácidos aleatorizados en la posición 1, una o dos glicinas en la posición 2 y 3 y un conjunto de aminas aromáticas acopladas al grupo  $\beta$ -carboxilo del ácido aspártico o el ácido iminodicarboxílico modificado de la cadena

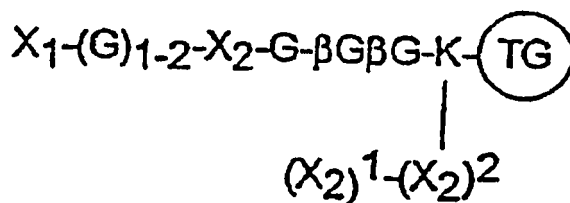
## ES 2 289 194 T3

lateral, o ácidos aromáticos acoplados a la cadena lateral del ácido diaminobutírico en la posición 4, o haluros de bencilo acoplados a la cadena lateral de aminoácidos que contienen azufre (cisteína y penicilamina). La estructura de la biblioteca se muestra en el Esquema XVII:

5

Esquema XVII

10



15

20

–  $X_1$  = Tyr, Trp, Lys, Thr, His, Pro, Phe, Arg,  
Asn, Ser, Glu, Asp, Gln

–  $X_2$  = Bloques de construcción 1-36

25

–  $(X_2)_{1-2}$  = Secuencia codificante

Número total de permutaciones: 936

30

35

La posición 4, que contiene la subunidad no aminoacídica, puede plantear problemas durante la secuenciación y, por lo tanto, se ha codificado esta posición. Como se usaron más de 20 bloques de construcción en la aleatorización, se usó una estrategia codificante de doblete de aminoácidos (Figura 8). Para evitar complicaciones en la determinación estructural, los aminoácidos usados para la codificación no se solapan con el conjunto usado para la aleatorización de la posición 1 y el aminoácido en la posición 2. Usando un codón doblete de 6 aminoácidos, pudieron codificarse hasta 36 bloques de construcción diferentes.

40

Esta minibiblioteca se exploró frente a un sistema modelo, de anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -endorfina. Las perlas que reaccionaban positivamente se sometieron a tres ciclos de degradación de Edman, y las estructuras de interacción deducidas a partir de los datos obtenidos se proporcionan en el Esquema XVII. La estructura del ligando natural para el anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -endorfina también se muestra en el Esquema XVIII:

45

50

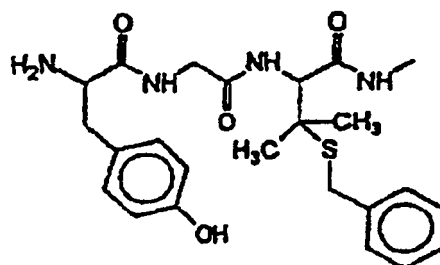
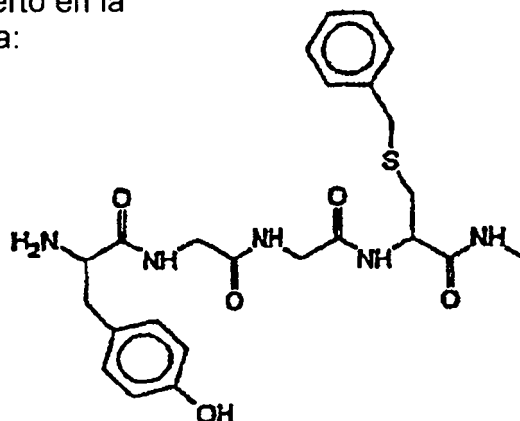
55

60

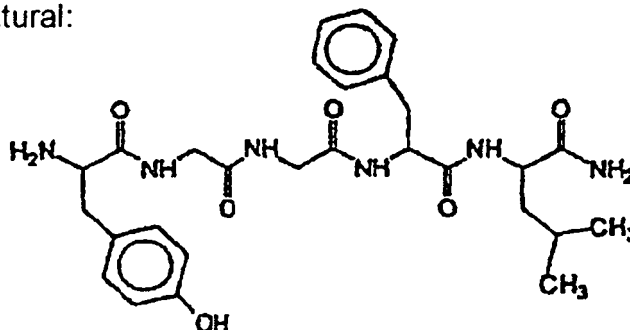
65

## Esquema XVIII

Descubierto en la biblioteca:



Ligando natural:



50 Los compuestos que se seleccionaron basándose en la unión con el anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -endorfina se sintetizaron unidos a las perlas y en forma libre y se determinaron sus afinidades de unión. Las secuencias unidas a las perlas han mostrado unión específica (que puede competir con leucina encefalina). Como puede observarse (Esquema XVIII), la unión al anticuerpo requiere dos grupos aromáticos a la distancia apropiada. Sin embargo, la estructura que conecta estos dos grupos aromáticos es muy importante para la afinidad de unión.

55 10. Ejemplo: Activación selectiva de grupos funcionales de superficie en una perla de resina

60 El presente ejemplo describe la preparación de una partícula de soporte en fase sólida que tiene una "superficie" de la partícula separada físicamente del "interior" del soporte, y que sintetiza la estructura de selección en la superficie y la molécula codificante dentro de la perla. La superficie en este sentido debe considerarse la porción de la perla accesible a la molécula aceptora macromolecular. La superficie disponible de la perla corresponde aproximadamente al área superficial calculada basándose en las dimensiones de la perla para una molécula aceptora de peso molecular extremadamente alto. Como alternativa, el área superficial puede determinarse mediante diversos métodos utilizando penetración en un material (incluyendo la superficie interna de todos los poros en la perla polimérica) para moléculasceptoras con bajo peso molecular. De manera comprensible, las moléculasceptoras que penetran libremente en la red polimérica no reconocerán ninguna diferencia entre la superficie y el interior de la partícula polimérica. La superficie disponible de la partícula también incluye un componente dinámico.

65

10.1 *Materiales y métodos*10.1.1 *Retirada del contenido de la superficie del péptido de una perla en fase sólida*

5 Se sintetizaron péptidos modelo (YGGFL, LHPQF, LHPQFYG) en TentaGel AM (Rapp Polymers, Tubingen, Alemania, 0,21 mmol/g) que tenían el enlazador  $\beta$ -Ala-Gly- $\beta$ -Ala-Gly unido a ellos. La síntesis se realizó mediante la técnica en fase sólida convencional utilizando aminoácidos protegidos con Fmoc y diisopropilcarbodiimida en presencia de N-hidroxibenzotriazol como reactivo de acoplamiento. Los péptidos se desprotegeron en dos etapas usando ácido trifluoroacético con eliminadores (etanoditiol, agua y tioanisol), y piperidina (20%) en dimetilformamida. Las perlas se lavaron cuidadosamente y se transfirieron a tampón carbonato amónico 0,1 M de pH 7,7. Se añadió quimotripsina (1 mg) y la suspensión se agitó a 37°C durante 20 horas. Se repitió el mismo tratamiento dos veces durante 4 horas. La secuenciación de perlas seleccionadas aleatoriamente de cada grupo ha demostrado que el contenido peptídico de las perlas no cambiaba de forma significativa.

15 10.1.2 *Síntesis de péptidos diferentes en la superficie y en el interior de la perla polimérica*

La resina TentaGel AM (0,21 mmol/g, 1 g) se modificó mediante condensación de Boc-Phe. La resina se lavó y se transfirió al tampón carbonato amónico 0,1 M, pH 7,7. El tratamiento con quimotripsina se realizó de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Después de lavar cuidadosamente mediante el mismo tampón y agua, la resina se lavó con dimetilformamida y se usó el esquema de síntesis en fase sólida convencional que usaba grupos protectores Fmoc y diisopropilcarbodiimida y N-hidroxibenzotriazol como reactivos de acoplamiento para la síntesis de la secuencia YGGFL. Después del acoplamiento de Fmoc-Tyr(But) en la última etapa de acoplamiento, no se retiró el grupo Fmoc y la resina se trató con ácido trifluoroacético al 50% en diclorometano. En las siguientes etapas de síntesis se usaron aminoácidos protegidos con Boc. El acoplamiento se realizó usando el mismo reactivo que anteriormente, el grupo Boc se retiró después de cada etapa mediante ácido trifluoroacético al 50% y el grupo amino protonado se dejó disponible para el acoplamiento por tratamiento con solución de diisopropiletilamida en dimetilformamida (5%). Los péptidos se desprotegeron en dos etapas usando ácido trifluoroacético con eliminadores (etanoditiol, agua y tioanisol), y piperidina (al 20%) en dimetilformamida. Las perlas se lavaron cuidadosamente y se prepararon para la tinción con anti- $\beta$ -endorfina como se ha descrito anteriormente. La tinción de las perlas era indistinguible de la tinción de las perlas que contenían solamente la secuencia YGGFL.

10.2 *Resultados y análisis*

35 Se usó una enzima para escindir de forma selectiva un péptido de la superficie de una perla. Las secuencias de ensayo YGGFL y LHPQFYG se prepararon y se incubaron con quimotripsina y se ensayó la reactividad de las perlas.

Las perlas tratadas se ensayaron para la unión a anti- $\beta$ -endorfina y estreptavidina. Los resultados se proporcionan en la Tabla 5.

40 TABLA 5

Unión a las perlas después del tratamiento con quimotripsina				
Péptido en perla	Unión a anticuerpo		Estreptavidina	
	Sin CT	+ CT	Sin CT	+CT
YGGFL	3+	-	-	-
LHPQF	-	-	3+	2+
LHPQFYG	-	-	3+	-

CT = quimotripsina

60 Las perlas con YGGFL perdieron completamente la actividad de unión al anticuerpo anti- $\beta$ -endorfina (Tabla 5). Las perlas que contenían LHPQF-YG también perdieron completamente la actividad con estreptavidina. Sin embargo, el descenso en la cantidad total de LHPQF-YG o YGGFL era mínimo, lo que indicaba que no había ningún efecto en el interior de la perla. En este caso, como LHPQF era un sustrato malo para la quimotripsina, se usó el enlazador YG. La degradación de Edman demostró que el contenido peptídico de las perlas no cambiaba de forma significativa.

Basándose en estos resultados preliminares, se usó quimotripsina como reactivo de desprotección selectiva. Se sintetizó un sustrato sencillo para quimotripsina, Boc-Phe, en todos los grupos amino disponibles del vehículo sólido.

## ES 2 289 194 T3

La incubación de esta resina modificada en diversas condiciones condujo a la liberación de aproximadamente la misma cantidad de Boc-Phe: 1,1%. El grupo amino desprotegido se usó para la síntesis de YGGFL usando la estrategia Fmoc. La síntesis se continuó por la medición cuantitativa de la liberación de Fmoc, y las lecturas confirmaron que aproximadamente 1% de los grupos aminos disponibles se habían usado para la síntesis. El grupo protector Boc de los restantes grupos amino en cada perla se escindió por TFA y la secuencia LHPQF se ensambló usando la síntesis Boc. Todos los grupos protectores se retiraron y el ensayo mostró la reacción positiva con anti- $\beta$ -endorfina y estreptavidina.

Se sometieron perlas seleccionadas aleatoriamente a la degradación de Edman y se obtuvieron los siguientes resultados (valores en pmoles): 1<sup>er</sup> ciclo L 114, Y < 1; 2<sup>o</sup> ciclo: H 86, G < 1; 3<sup>er</sup> ciclo: P 94, G < 1; 4<sup>o</sup> ciclo: Q 78, F 4 (previsión); 5<sup>o</sup> ciclo: F 73, L < 1. El análisis de degradación de Edman muestra la secuencia LHPQF al nivel de 100-120 pmoles por ciclo, y el contenido insignificante de aminoácidos esperado para la secuencia YGGFL. Esto significa que incluso aunque YGGFL no esté presente en la masa de la perla, está disponible en la superficie de la perla para la interacción con el receptor relevante.

LHPQF sigue estando también disponible para la interacción con estreptavidina. Esto probablemente se debe al menor peso molecular de la estreptavidina, que permite que penetre dentro de la perla polimérica.

### 10.3 Análisis

El presente ejemplo demuestra claramente que una enzima puede desproteger de forma selectiva la superficie, pero no el interior, de una perla de resina. En este caso, la escisión con quimotripsina de la secuencia LHPQFYG se realizó de forma eficaz. La unión de estreptavidina, que es específica para LHPQF se anuló completamente.

Los experimentos posteriores con perlas derivatizadas con sustrato Boc-Phe demostraron que pueden sintetizarse dos péptidos diferentes en una perla, segregándose un péptido principalmente en la superficie y segregándose el otro péptido principalmente al interior.

### 11. Ejemplo: Bloqueo preferente de los grupos amino libres en la superficie de una perla de tentagel

El presente ejemplo demuestra la posibilidad de bloquear la superficie de una perla de resina mientras se dejan los grupos funcionales en el interior de la perla libres para la reacción y síntesis de un compuesto, por ejemplo, una molécula codificante.

#### 11.1 Materiales y métodos

Se hidrató resina TentaGel amida AM (sustitución 0,3 mequiv./gramo) en H<sub>2</sub>O durante varias horas y se lavó con tampón ácido 2-[N-morfolino]jetanosulfónico (MES) 0,1 M, pH 5,7. Se añadió una cantidad variable (de 0 a 10 mg) de ácido poliglutámico (Mr 30.000, Sigma Chemical) a cada una de las perlas de 0,2 ml establecidas. Después, se añadieron 60 mg de 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida-HCl (EDC) a cada tubo. Las mezclas de reacción se agitaron suavemente durante una noche. Después, las perlas se lavaron en H<sub>2</sub>O doblemente estilada (dd) y se añadieron 0,24 mmol de etanolamina más 60 mg de EDC en tampón MES a cada muestra. Después de 4 horas de agitación suave, la resina se lavó de forma minuciosa con H<sub>2</sub>O dd. Después, la resina se liofilizó a sequedad. La resina tratada se hinchó con dimetilformamida (DMF). Usando química Fmoc se sintetizó el péptido, YGGFLGGG en cada una de las muestras de resina tratadas usando técnicas convencionales. El grupo Fmoc N-terminal y los grupos protegidos de la cadena lateral se retiraron con piperidina y ácido trifluoroacético como se ha descrito (Lam *et al.*, 1991, Nature 354: 82-84). Después de la neutralización con diisopropiletilamina (DIEA), las perlas de resina se lavaron de forma minuciosa y las perlas se prepararon para tinción con anti- $\beta$ -endorfina como se ha descrito en la Sección 10, *supra*.

#### 11.2 Resultados y análisis

La capacidad de bloquear grupos funcionales de la superficie en una perla de resina con ácido poliglutámico era directamente proporcional a la cantidad de ácido poliglutámico usada (Tabla 6). De forma significativa, la resina bloqueada con ácido poliglutámico se teñía sólo de forma débil, lo que sugería que la mayoría de los grupos amino de la superficie estaban bloqueados antes de la síntesis del péptido YGGFLGGG. Sin embargo, era más importante que la cantidad de péptido en la resina bloqueada y no bloqueada era aproximadamente la misma (Tabla 7), lo que indicaba que el bloque con ácido poliglutámico se producía sólo en la superficie de la perla y que los grupos amino libres dentro de las perlas permanecían intactos para la posterior síntesis peptídica.

TABLA 6

*Tinción Semi-Cuantitativa de Péptido-perlas*

	Grado de Bloqueo: Ácido Poliglutámico, mg por 0,2 ml de Resina	Marcado con Biotinil-Anti- $\beta$ -Endorfina Seguido por Estreptavidina-AP	Marcado con Estreptavidina-AP en Solitario
5			
10	0	3+	-
	0,016	3+	-
	0,08	2+	-
15	0,04	1+	-
	2,0	1+	-
	10	señal	-
20			

TABLA 7

*Microsecuenciación  
pmoles de aminoácido (10 perlas/experimento)\**

		Y	G	G	F	L	G	G	G	
25	Ácido Poliglutámico (10 mg)	I	609,	615,	692,	665,	579,	657,	675,	655
		II	996,	885,	839,	772,	696,	522,	550,	506
30	Sin Bloqueo	I	876,	752,	752,	774,	680,	733,	707,	717
		II	519,	534,	332,	559,	471,	540,	550,	335

Los experimentos adicionales implicaron acoplar de forma reversible polímeros en los que Boc-Glu se unía mediante su grupo  $\alpha$ -carboxilo. Después del acoplamiento de este polímero modificado en la superficie de la perla y la modificación apropiada del grupo amino "interior", se escindió el grupo Boc del ácido glutámico. Después, las perlas se trataron con un ciclo de degradación de Edman, que regeneraba los grupos amino que se habían protegido mediante el reactivo polimérico ácido glutámico. Se sintetizaron diferentes péptidos en diferentes partes de la perla, es decir, en la superficie y en el interior.

La presente invención no debe limitarse en alcance por las realizaciones específicas descritas en este documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las descritas en este documento serán evidentes para los especialistas en la técnica a partir de la descripción anterior y de las figuras adjuntas. Dichas modificaciones pretenden estar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Se citan diversas publicaciones en este documento, cuyas descripciones se incorporan como referencia en su totalidad.

#### 12. Ejemplo: Subunidades adecuadas para la construcción de bibliotecas no peptídicas

La construcción de bibliotecas no peptídicas requiere la selección de subunidades adecuadas para la inclusión en síntesis en fase sólida. El presente ejemplo se refiere a la selección de subunidades adecuadas para tres metodologías químicas diferentes.

##### 12.1 Acilación del grupo amino primario

Protocolo Experimental: Se disolvió un mmol de ácido en 2 ml de DMF, se añadieron 0,5 mmol de DIC (1 mmol en el caso de ácidos dicarboxílicos) y se hicieron reaccionar con aproximadamente 100 mg de Trp-RAM-TG durante una noche. La finalización de la reacción se evaluó mediante el ensayo de Kaiser. Después, se lavó la resina con DMF y DCM y se secó. El producto se escindió mediante una exposición durante una hora a 1 ml de TFA al 95% y agua al 5%. Después, se diluyó la mezcla de reacción con 5 ml de agua y se analizó mediante HPLC y MS.

Los requisitos para la aceptación eran que los productos tuvieran el P.M. esperado, el contenido del producto principal en una mezcla en bruto fuera más de 80% del área total bajo la curva del cromatograma de HPLC y que el producto principal tuviera el peso molecular esperado. La Tabla 8 muestra los resultados de los ensayos de 33 ácidos. De los 33, 7 se rechazaron como inadecuados para su uso. Dos compuestos adicionales, ácido 4-hidroxibenzoico y ácido 4-hidroxifenilacético, fueron incompatibles con la mono-síntesis usando triptófano, pero encontraron utilidad en experimentos modelo diferentes usando el grupo  $N^{\alpha}$ -amino de la lisina (Fmoc).

TABLA 8 - Acilación del Grupo Amino Primario

Ácido	Solubilidad	Kaiser	HPLC	PM	MS	Seleccionado
$\gamma$ -Guanidinobutírico	calor	-	OK	330	OK	Sí
Succínico	OK	-	OK	302	OK	Sí
1-Naftilacético	OK	-	OK	371	OK	Sí
Difenilacético	OK	-	2 picos	397	OK	Sí
Bifenilacético	OK	-	OK	397	OK	Sí
Pentafluorofenilacético	OK	-	OK	411	OK	Sí
4-Trifluorometilbenzoico	OK	-	OK	375	OK	Sí
4-Hidroxibenzoico	OK	(+)		323	no OK	Sí
4-Hidroxifenilacético	OK	-	OK	337	no OK	Sí
3-Nitrofenilacético	OK	+	2 picos	366	OK	Sí
4-Metoxibenzoico	OK	-	2 picos	337	OK	No
2-Nitro-4,5-dimetoxibenzoico	OK	-	OK	412	OK	Sí
3-(3,4,5-(trimetoxifenil)propiónico	OK	-	OK	425	OK	Sí
4-Guanidinobenzoico	OK	++	2 picos	364	OK	Sí
4-Dimetilaminobenzoico	OK	+	OK	350	OK	Sí
4-(Pirrol-1-il)benzoico	OK	-	no OK	372	no OK	No
4-(3-Metil-5-oxo-2-pirazolin-1-il)benzoico	calor	rojo	OK	403	OK	Sí
2-Pirrolcarboxílico	OK	(+)	OK	296	no OK	No
1-Metil-2-Pirrolcarboxílico	HOBT, calor	++	no OK	310		No

**TABLA 8 - Acilación del Grupo Amino Primario**

Ácido	Solubilidad	Kaiser	HPLC	PM	MS	Seleccionado
1,4-Dimetil-2,3-pirrolidincarboxílico	OK	(+)	OK	382	OK	Sí
2-Metil-4-nitro-1-imidazolpropiónico	OK	-	OK	384	OK	Sí
2-Amino-1-imidazolacético	HOBT, calor	++	no OK	328		Sí
2-Pirazolcarboxílico	OK	-	no OK	297		No
3-amino-1,2,4-triazol-5-carboxílico				313		Sí
4-Imidazolacético	calor	++	OK	311	OK	Sí
i-nicotínico	HOBT, calor*			308		No
2-Hidroxi-i-nicotínico	OK	(+)	no OK	324		No
2,3-Piridinacarboxílico	OK	-	2 picos	352	OK	Sí
2-Pirazinacarboxílico	calor	-	OK	309	OK	Sí
2,3-Pirazinadicarboxílico	OK	-	OK	353	OK	Sí
1-Metilindol-2-carboxílico	OK	-	OK	360	OK	Sí
2-Metil-3-indolacético	OK	-	OK	374	OK	Sí
Indol-4-carboxílico	OK	-	OK	346	OK	Sí

\* precipitado después de la refrigeración

## ES 2 289 194 T3

### 12.2 Desplazamiento nucleófilo de halógenos mediante aminas

Protocolo Experimental: Se acopló ácido bromoacético (exceso molar 5 x) mediante anhídridos simétricos a TG130 durante 10 min y se reacopló durante 10 min usando el mismo método. La amina de ensayo se acopló usando una solución 1 M en DMSO durante una noche. Después de un lavado adecuado, se acopló Fmoc-Gly (HOBt, DIC) durante 1 hora, el grupo Fmoc se retiró y se calculó y se comparó la liberación de Fmoc con una liberación teórica de 45  $\mu\text{mol/ml}$ . En un segundo conjunto de experimentos, se ensayaron la pureza e identidad de los productos mediante la síntesis de los compuestos modelo R-NH-CH<sub>2</sub>-CO-Gly-Trp-RAM-TG, sintetizados mediante un protocolo similar y escindidos de la resina con 1 ml de TFA al 95% y agua al 5% durante 1 hora, seguido de dilución con aproximadamente 5 ml de agua para realizar HPLC analítica y MS.

Se ensayaron un total de 33 aminas de las cuales se descubrió que 21 eran aceptables para la incorporación a la síntesis en fase sólida. Los resultados de estos estudios se dan a continuación.

(Tabla pasa a página siguiente)

**Tabla 9 - Desplazamiento Nucleófilo de Halógeno mediante Aminas**

Amina	PM	Fmoc	HPLC	MS	Seleccionado
Etilamina	45,08	31	OK	OK	Si
i-Propilamina	59,11	27	OK	OK	Si
Butilamina	73,14	41	OK	OK	Si
i-Butilamina	73,14	24	OK	OK	Si
t-Butilamina	73,14	4	*	*	No
Ciclopentilamina	85,15	28	OK	OK	Si
Ciclohexilamina	99,18	24	OK	OK	Si
2-Amino-norbornano	111,19	35	OK	OK	No
Etanolamina	61,08	31	OK	OK	Si
3-Aminopropanol	75,11	40	OK	OK	Si
1-Amino-2-propanol	75,11	43	OK	OK	Si
2-Metoxietilamina	75,11	26	OK	OK	Si
Tetrahidrofurfurilamina	101,15	27	OK	OK	No
$\beta$ -Ala-OtBu	181,6	22	OK	OK	Si
Etilendiamina(Boc)	120	29	OK	OK	Si
2-(2-Aminoetil)-1-metilpirrolidina	128,1	35	OK	OK	Si
1-Aminopiperidina	100,17	2,2	*	*	No
1-Amino-4-metilpiperazina	115,0	20	No OK	No OK	No
4-Aminomorfolina	101,14	3	*	*	No

Tabla 9 - Desplazamiento Nucleófilo de Halógeno mediante Aminas

Amina	PM	Fmoc	HPLC	MS	Seleccionado
Benzhidrilamina	183,25	12,5	No OK	No OK	No
Naftaleno-metilamina	157,22	34,7	OK	OK	Sí
4-Aminoindano	169,96	0			No
4-(Trifluorometil)-bencilamina	175,16	29	OK	OK	Sí
2-Amino-1-fenil-etanol	137,18	29	OK	OK	Sí
Tiramina	137,18	27	OK	OK	Sí
4-Metoxi-bencilamina	137,18	34	OK	OK	Sí
3,5-Dimetoxi-bencilamina	167,21	31	OK	OK	Sí
4-(Dimetilamino)-bencilamina	150,22	no soluble en DMSO			No
2,4-Dinitrofenil-hidrazina	198,0	5	*	*	No
Anilina	93,18	1,2	*	*	No
p-Toluidina	143,0	7,0	*	*	No
p-Anisidina	123,15	2,8	*	*	No

\* Aminas con baja liberación de Fmoc. El experimento se repitió y si se producía baja liberación de Fmoc de nuevo, se excluía la amina de experimentos adicionales.

## ES 2 289 194 T3

### 12.3 Alquilación reductora

#### 12.3.1 Métodos generalizados

5      Protocolo Experimental: Se añadió un exceso 20 molar de los aldehídos de ensayo a aproximadamente 100 mg  
de (Exp. A) H-Gly-RAM-TG o (Exp. B) H-βAla-Gly-Trp-RAM-TG hinchados en 1 ml de 40:10:1 de MeOH-DCM-  
AcOH, y se dejó que la reacción continuara durante una noche. La resina se lavó con AcOH al 1% en DMF y después  
se expuso de nuevo a un exceso 20 molar del aldehído de ensayo durante una noche. En lo sucesivo, la resina se lavó  
10 con 40:10:1 de MeOH-DCM-AcOH y a 1 ml de esta mezcla se le añadió un exceso 20 molar de NaBH<sub>3</sub>CN y se dejó  
reaccionar durante una noche. Después, se lavó la resina con DMF/AcOH al 1% y se añadió un segundo exceso 20  
molar de NaBH<sub>3</sub>CN para una reacción durante una noche. Después del lavado, todas las muestras se acilaron con  
Fmoc-Gly. En el Exp. A, después de retirar el Fmoc, el producto se aciló con Fmoc-Trp. Después, la resina se trató  
para retirar el Fmoc, se lavó con DMF y DCM, se secó y después el producto se escindió con 1 ml de TFA al 95% y  
15 agua al 5% durante 1 hora. Después de la dilución con aproximadamente 5 ml de agua, se realizaron HPLC analítica  
y MS.

Se ensayaron un total de 31 aldehídos de ensayo para determinar su idoneidad para la inclusión en la síntesis en  
fase sólida. Los resultados, que se dan en la Tabla 10, indican que 19 de éstas fueron aceptables.

20

(Tabla pasa a página siguiente)

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 289 194 T3

<b>Tabla 10 - Alquilación Reductora</b>					
<b>Aldehído</b>	<b>Kaiser</b>	<b>HPLC</b>	<b>PM</b>	<b>MS</b>	<b>Seleccionado</b>
<b>Experimento "A"</b>					
Butiraldehído	pardo	no OK			No
2-Metilbutiraldehído	azul claro	OK	387	OK	Sí
2-Etilbutiraldehído	pardo	OK	401	OK	Sí
Trimetilacetaldehído	pardo	OK	387	OK	Sí
i-Valeraldehído	pardo	no OK			No
2-Metilvaleraldehído	azul claro	OK	401	OK	Sí
3-Metiltiopropionaldehído	azul claro	no OK			No
Ciclohexanocarboxaldehído	azul claro	OK	413	OK	Sí
5-Norborneno-2-carboxaldehído	pardo	no OK			No
Benzaldehído	pardo	OK	407	OK	Sí
4-Nitrobenzaldehído	pardo	OK	452	OK	Sí
4-Hidroxibenzaldehído	azul claro	OK	423	OK	Sí
Hidrocinnamaldehído	pardo	no OK			No
Vanillina	pardo	OK	453	OK	Sí
2-Tiofenocarboxaldehído	azul claro	OK	413	OK	Sí
Imidazol-2-carboxaldehído	pardo	no OK			No
Piridina-4-carboxaldehído	pardo	OK	408	OK	Sí
$\alpha,\alpha,\alpha$ -Trifluoro-o-tolualdehído	pardo	OK	475	OK	Sí
<b>Experimento "B"</b>					
4-Dimetilaminobenzaldehído	pardo	no OK			No
4-Metoxibenzaldehído	pardo	OK	507	OK	Sí
2,4,6-Trimetoxibenzaldehído	pardo	no OK			No
Indol-3-carboxaldehído	pardo	no OK			No
1-Acetilindol-2-carboxaldehído	pardo	OK	559	nd	Sí
4-Carboxibenzaldehído	azul claro	OK	522	no OK	No
$\beta$ -naftaldehído	pardo	no OK	528	OK	Sí
Fenilacetaldehído	pardo	OK			No
4-Fenilbenzaldehído	pardo	OK	554	OK	Sí
3-Fenoxibenzaldehído	pardo	no OK	570	OK	Sí
Pirrol-2-carboxaldehído	pardo	OK			No

Tabla 10 - Alquilación Reductora					
Aldehído	Kaiser	HPLC	PM	MS	Seleccionado
2-Hidroxibenzaldehído	pardo	no OK	494	OK	Sí
Quinolina-4-carboxaldehído	azul				No

### 12.3.2 Métodos específicos

A continuación se muestran procedimientos adaptados específicamente para la subunidad a añadir.

La secuencia  $\beta$ -Ala-Gly-Trp se ensambló en RAM-TG (sustitución 0,2 mmol/g). Después, se alquiló el grupo amino terminal usando el procedimiento de aminación reductora con un conjunto de aldehídos alifáticos, aromáticos y heterocíclicos. Los péptidos N-alkilados se dividieron en la resina usando TFA al 95% - H<sub>2</sub>O al 5% y la pureza y el peso molecular correcto de los compuestos resultantes se confirmaron usando HPLC y espectrometría de masas.

#### Procedimiento 1

mezcla de disolventes 1      80:20:1 de diclorometano-metanol-ácido acético

mezcla de disolventes 2      100:1 de dimetilformamida-ácido acético

Formación de la base de Schiff: A 50 mg de H- $\beta$ -Ala-Gly-Trp-TentaGel S RAM lavados 3 veces con la mezcla de disolventes 1 se le añadieron 200  $\mu$ l de esta mezcla y 0,2 mmol de aldehído. La resina se agitó durante 2 horas y después se lavó 3 veces con la mezcla de disolventes 2. Se añadieron 0,2 mmol más de aldehído junto con 200  $\mu$ l de la mezcla de disolventes 2 y después de 2 horas de agitación la resina se lavó 3 veces con la mezcla de disolventes 2 y 3 veces con la mezcla de disolventes 1.

Reducción de la base de Schiff: A un péptido-resina lavado se le añadieron 200  $\mu$ l de la mezcla de disolventes 1 y 200  $\mu$ l de una solución 1 M de NaBH<sub>3</sub>CN en dimetilformamida. La resina se agitó durante 2 horas, después se lavó con la mezcla de disolventes 2 y la reducción se repitió en esta mezcla con 200  $\mu$ l de solución 1 M de NaBH<sub>3</sub>CN en DMF durante 2 horas más. La resina se lavó después con DMF y DCM, se secó y el péptido se escindió usando TFA-H<sub>2</sub>O al 5%.

#### Protocolo 1

Lavar 3 veces con la mezcla de disolventes 1

Añadir 200  $\mu$ l de la mezcla de disolventes 1

Añadir 0,2 mmol de aldehído

Agitar durante 2 horas

Lavar 3 veces con la mezcla de disolventes 2

Añadir 200  $\mu$ l de la mezcla de disolventes 2

Añadir 0,2 mmol de aldehído

Agitar durante 2 horas

Lavar 3 veces con la mezcla de disolventes 2

Lavar 3 veces con la mezcla de disolventes 1

Añadir 200  $\mu$ l de la mezcla de disolventes 1

Añadir 200  $\mu$ l de NaBH<sub>3</sub>CN 1 M en DMF

Agitar durante 2 horas

Lavar 3 veces con la mezcla de disolventes 2

## ES 2 289 194 T3

Añadir 200  $\mu$ l de la mezcla de disolventes 2

Añadir 200  $\mu$ l de NaBH<sub>3</sub>CN 1 M en DMF

5 Agitar durante 2 horas

### Procedimiento 2

La formación de la base de Schiff sigue el procedimiento A.

10

La reducción de la base de Schiff sigue el procedimiento A con la diferencia de que durante las dos etapas de reducción se añadieron 0,01 mmol de aldehído junto con el reactivo de reducción.

### Protocolo 2

15

Lavar 3 veces con la mezcla de disolventes 1

Añadir 200  $\mu$ l de la mezcla de disolventes 1

20

Añadir 0,2 mmol de aldehído

Agitar durante 2 horas

Lavar 3 veces con la mezcla de disolventes 2

25

Añadir 200  $\mu$ l de la mezcla de disolventes 2

Añadir 0,2 mmol de aldehído

30

Agitar durante 2 horas

Lavar 3 veces con la mezcla de disolventes 2

Lavar 3 veces con la mezcla de disolventes 1

35

Añadir 200  $\mu$ l de la mezcla de disolventes 1

Añadir 200  $\mu$ l de NaBH<sub>3</sub>CN 1 M en DMF

40

Añadir 0,01 mmol de aldehído

Agitar durante 2 horas

Lavar 3 veces con la mezcla de disolventes 2

45

Añadir 200  $\mu$ l de la mezcla de disolventes 2

Añadir 200  $\mu$ l de NaBH<sub>3</sub>CN 1 M en DMF

50

Añadir 0,01 mmol de aldehído

Agitar durante 2 horas

### Procedimiento 3

55

#### *Reacción de un recipiente*

A 50 mg de péptido-resina lavados con la mezcla de disolventes 2 se les añadieron 200  $\mu$ l de esta mezcla y 0,05 mmol de aldehído. Después de 1 hora de agitación, se añadieron 50  $\mu$ l de solución 1 M de NaBH<sub>3</sub> en DMF y la resina se dejó en agitación durante 2 horas. Después, se añadieron 50  $\mu$ l más de agente reductor y después de 2 horas de agitación se añadió la tercera porción (50  $\mu$ l) de solución 1 M de NaBH<sub>3</sub>CN en DMF. La resina se agitó durante una noche y después se trató como se ha indicado anteriormente.

60

### Protocolo 3

65

Lavar 3 veces con la mezcla de disolventes 2

Añadir 200  $\mu$ l de la mezcla de disolventes 2

## ES 2 289 194 T3

Añadir 0,05 mmol de aldehído

Agitar durante 1 hora

5 Añadir 50  $\mu$ l de NaBH<sub>3</sub>CN 1 en DMF

Agitar durante 2 horas

10 Añadir 50  $\mu$ l de NaBH<sub>3</sub>CN 1 M en DMF

Agitar durante 2 horas

Añadir 50  $\mu$ l de NaBH<sub>3</sub>CN 1 M

15 Agitar durante 1 noche.

**Tabla 11 - Aminación Reductora**

Aldehído (P.M.)	Protocolo.	MS (MH+)
benzaldehído (421,2)	1	OK (422,2)
2-hidroxibenzaldehído (437,2)	1	OK (438,2)
4-hidroxibenzaldehído (437,2)	1	OK (438,2)
4-hidroxibenzaldehído (451,2)	3	OK (438,2)
3-metiloxi-4-hidroxibenzaldehído (467,2)	1	OK (468,2)
4-nitrobenzaldehído (466,3)	1	OK 467,3)
2-naftaldehído (471,3)	1	OK (472,3)
3-fenoxibenzaldehído (513,3)	1	OK (514,3)
4-fenilbenzaldehído (497,3)	1	OK (498,3)
2-tolualdehído (435,2)	1	OK (436,2)
2-trifluorometil-benzaldehído (489,3)	2	OK (490,3)
1,3,5-trimetoxibenzaldehído (511,3)	1	OK (512,3)
ciclohexanocarboxaldehído (427,2)	2	OK (428,2)
2-etilbutiraldehído (415,2)	2	OK (416,2)
2-metilbutiraldehído (401,2)	2	OK (402,2)
2-metilpropionaldehído (387,2)	2	OK (388,2)
2-metilvaleraldehído (415,2)	2	OK (416,2)
trimetilacetaldehído (401,2)	2	OK (402,2)
quinolina-4-carboxaldehído (472,3)	3	OK (402,2)
tiofen-2-carboxaldehído (427,2)	3	OK (428,2)

### 13. Ejemplo: Codificación no secuencial de una biblioteca

Se ensayó la codificación no secuencial usando un compuesto de ensayo modelo y mediante la construcción de una biblioteca no peptídica.

## ES 2 289 194 T3

### 13.1 Instrumentos, materiales y procedimientos

Instrumentación: Las HPLC analítica y preparativa se realizaron en un sistema modular Hitachi usando columnas Vydac (0,46 x 250 mm, 5  $\mu$ m, flujo 1 ml/min) y Vydac (10 x 250 mm, 10  $\mu$ m, flujo 3 ml/min), respectivamente.

Materiales: A menos que se indique otra cosa, se usaron disolventes de calidad comercial sin purificación adicional. La resina TentaGel (TG) (0,21 mmol/g) se obtuvo de Rapp-Polymere (Tübingen). Los aminoácidos protegidos se obtuvieron de Bachem (Torrance, California), Advanced ChemTech (Louisville, Kentucky) o Propeptide (Vert-le-Petit, Francia).

Se sintetizaron más de 100 subunidades codificantes en el soporte en fase sólida. Se usaron lisina, ornitina y ácidos diaminobutírico y diaminopropiónico como bloques de construcción de base. Se acoplaron en primer lugar Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Orn(Boc), Fmoc-Dab(Boc) y Boc-Dap(Fmoc) a amino TentaGel (0,21 mmol/g) mediante el procedimiento DIC/HOBt habitual. Después de retirar la protección de la cadena lateral, se acoplaron los ácidos carboxílicos modificantes a las cadenas laterales desprotegidas usando el procedimiento DIC/HOBt, anhídridos simétricos o cloruros de acilo. Todos los nuevos aminoácidos codificantes sintetizados se desprotegeron completamente y se sometieron a degradación de Edman en un secuenciador de proteínas de Applied Biosystems ABI 447A. Se determinaron los tiempos de retención de los nuevos PHT-AA usando un analizador Applied Biosystems ABI 120A con una columna PTH-222 Brownlee (PTH C-18 5 micrómetros, 220 x 2,1 mm). Tampones de HPLC: A - NaOAc 0,01 M, B - acetonitrilo; gradiente: 0,0-0,4 min - B al 8%, 0,4-38,0 min - B al 8-60%, 38,0-40,0 min - B al 60-90%; caudal 230  $\mu$ l/min. Los picos se detectaron a 269 nm. La Tabla 14 muestra las subunidades codificantes individuales e indica el sistema de numeración mediante el que se mencionan en este documento.

### 13.2 Síntesis de secuencias modelo

Las secuencias de los compuestos de ensayo preparadas fueron Tyr-Gly-Ala-Phe y Phe-Gly-Ala-Phe, codificados por dobles de aminoácidos (véase el Esquema XIC) y Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu y Phe(Cl)-Gly-Gly-Phe-Leu (codificada de acuerdo con el código del Esquema XIB). Estas secuencias se seleccionaron ya que Tyr-Gly-Ala-Phe puede detectarse usando un anticuerpo anti- $\beta$ -endorfina como molécula aceptora y Phe-Gly-Ala-Phe es un control negativo. Además, la fidelidad y la codificación podían confirmarse secuenciando directamente los péptidos de ensayo.

#### 13.2.1 Materiales y métodos

El propósito de la síntesis de los péptidos modelo no era demostrar un método de síntesis de bibliotecas, sino demostrar en su lugar la fidelidad de la codificación. Por lo tanto, la síntesis no se realizó en etapas sucesivas de acoplamiento de la subunidad AA de ensayo seguida por un par de subunidades codificantes, sino usando en su lugar el esquema más conveniente que se describe a continuación. El soporte polimérico (TentaGel, 100 mg, 0,21 mmol/g, 90  $\mu$ m de tamaño medio de partículas) en el cual se había sintetizado previamente la secuencia Boc-Ala-Gly-Val-Phe-bAla-Gly-bAla-Gly y que había experimentado tratamiento con quimotripsina para diferenciar la superficie del interior mediante la escisión de Phe (7 mg de quimotripsina en 30 ml de tampón Tris 0,1 M a pH 7,6 en CaCl<sub>2</sub> 0,1 M, 14 horas a 37°C) se hinchó en dimetilformamida (DMF) (volumen de hinchazón 0,5 ml), se dividió en dos jeringas de polipropileno equipadas con discos fritados de polipropileno (Krchnak y Vagner, 190, J. Pept. Res. 3: 182-193), se acopló Fmoc-Phe (3 equivalentes con respecto a todos los grupos amino teóricamente disponibles) mediante diisopropilcarbodiimida (DIC) (3 equivalentes) en presencia de N-hidroxibenzotriazol (HOBt) (3 equivalentes) en DMF. Después de la desaparición de la coloración azul (Krchnak *et al.*, 1988 Coll. Czech. Chem. Commun. 53: 2542), la resina se lavó (5 x DMF) y se retiró el grupo Fmoc mediante el tratamiento de piperidina al 50% en DMF (10 min). Después de lavar con DMF (5 veces) y HOBt al 2% en DMF (1 vez), se acopló el siguiente aminoácido. De esta manera, la alanina, glicina y tirosina se unieron a la resina en la primera jeringa, y la alanina, glicina y fenilalanina se unieron a la resina en la segunda jeringa. El grupo Fmoc se retiró como se ha indicado anteriormente y después de lavar con DMF, la resina se trató con la solución (0,4 M) de 2-clorobenciloxycarbonilsuccinimida en DMF durante una noche (después de 3 h, se añadió un equivalente de diisopropiletilamina). El grupo Boc se escindió con ácido trifluoroacético (TFA) al 50% en DCM (1 más 20 min). Después de lavar con DCM (3 veces) y DMF (4 veces), la resina se neutralizó lavándose con diisopropiletilamina al 10% en DMF, se lavó con DMF (3 veces) y se acopló Fmoc-Lys(Dde) (3 equiv.) mediante la acción de DIC y HOBt (3 equiv. de cada uno) en DMF (2 h). La resina se lavó con DMF (5 veces) y el grupo Fmoc se escindió mediante piperidina al 50% en DMF (20 min) y la resina se lavó con DMF (3 veces). La mezcla de aminoácidos que codifican fenilalanina en posición cuatro de la estructura del compuesto de ensayo (Boc-Sar y Boc-Asp(OBzl)) en una proporción molar de 1:1 (que reflejaba su reactividad de acoplamiento relativamente equivalente que se había determinado previamente de manera experimental) se acopló usando DIC y HOBt (3 equiv. de cada uno). La reacción se controló mediante el método de azul de bromofenol. La resina se lavó con DMF (5 veces) y el grupo Dde se desprotegió mediante hidrazina hidrato al 2% en DMF (10 minutos). La resina se lavó con DMF (5 veces) y HOBt al 2% en DMF, se acopló Fmoc-Lys(Dde) y se retiró el grupo Fmoc. El procedimiento de acoplamiento de mezclas de aminoácidos Boc y Fmoc-Lys(Dde) se repitió 2 veces (acoplando las mezclas de subunidad codificantes de Ile y Val (2:1) y Lys(ClZ) y Glu(OBzl) (1,5:1)) y después de la desprotección del grupo Dde, se acopló Boc-Lys (Fmoc) a la resina en las dos jeringas. El grupo Fmoc se desprotegió como anteriormente y después de lavar con DMF (5 veces) se usó la mezcla de anhídridos butírico y propiónico (1:1 en presencia de 1 equivalente de trietilamina) para la acilación del grupo amino libre en la primera jeringa y se acopló la mezcla de ácido 4-fenilbutírico y ácido 3-fenilpropiónico a la resina en la segunda jeringa mediante la acción de DIC y HOBt. Después, se desprotegió la resina mediante la aplicación de la mezcla de TFA (al 82,5%), p-cresol (al 5%), tioanisol (al 5%), agua (al 5%) y etanoditiol

## ES 2 289 194 T3

(al 2,5%) (mezcla K, (King D. *et al.*, 190, Int. J. Pep. Prot. Res. 36: 255-266) durante 2 horas y se lavó con DMF (4 veces) y HCl al 0,1% en agua (5 veces).

### 13.2.2 Compuestos modelo YGAF y FGAF construidos con codificación

Los dos péptidos modelo se sintetizaron en la superficie de un soporte en fase sólida de poliestireno injertado con copolioxietileno "rasurado" (TentaGel). Las moléculas codificantes se sintetizaron en el interior del soporte TentaGel y, por lo tanto, no podían unirse al anticuerpo anti- $\beta$ -endorfina. La unión diferencialmente selectiva del compuesto de ensayo de control positivo se validó usando cada compuesto de ensayo/construcción de perla en solitario, o en forma de mezcla de las dos secuencias, o después de la adición de una pequeña cantidad de perlas específicas a una biblioteca de compuestos.

Se construyó un código no secuencial en una cadena principal de polilisina.

El código era de la siguiente manera

Etapas	Subunidad	Resto codificante
4	Phe	butiril-lisina, propionil-lisina
4	Tyr	$\phi$ -butiril-lisina, $\phi$ -propionil-lisina
3	Gly	Glu, Lys
2	Ala	Val, Ile
1	Phe	Asp, Sar

Los soportes positivos se seleccionaron después de la exposición al anticuerpo anti- $\beta$ -endorfina. Un ciclo de degradación de Edman identificó las perlas positivas como YGAF por causa de la liberación de derivados de  $\phi$ -butiril-lisina,  $\phi$ -propionil-lisina. Puesto que la secuencia del compuesto de ensayo estaba presente solamente en la superficie de la perla, y suponía aproximadamente 2% de la cantidad total de moléculas unidas a la perla, la señal de tirosina detectada en el primer ciclo (en el que también se escindieron todas las subunidades de aminoácido codificante) era extremadamente pequeña. Para confirmar que realmente se habían detectado las perlas apropiadas, la secuenciación se repitió con 30 perlas reunidas para amplificar la señal. En este caso, cuatro ciclos de secuenciación mostraron directamente la secuencia del compuesto de ensayo YGAF.

### 13.3 Síntesis de la biblioteca basada en ácido diaminobenzoico con codificación digital

Una biblioteca basada en el ácido diaminobenzoico se sintetizó y se codificó con un código no secuencial. El esquema sintético de esta biblioteca se da en el Esquema que se muestra a continuación. Una lista de los aminoácidos usados en la primera etapa de acoplamiento y los ácidos usados en las etapas de acoplamiento, dos y tres, a los grupos amino del armazón de ácido diaminobenzoico se dan en las Tablas 12 y 13, respectivamente. Cada tabla da también los restos codificantes correspondientes a cada subunidad de especie del compuesto de ensayo. Los restos codificantes de la Tabla 13 se indican mediante cifras de dos dígitos, por ejemplo, 3/1, cuyos significados químicos se definen en la Tabla 14.

La secuenciación de varias perlas seleccionadas al azar de esta biblioteca confirma la posibilidad de la descodificación de una etapa mediante degradación de Edman.

#### 13.3.1 Materiales y métodos

La síntesis se realizó en resina TentaGel (90  $\mu$ m, 0,2 mmol/g). Desprotección de Fmoc: piperidina al 50% en DMF, 10 min, lavar 6 veces con DMF, recoger todos los lavados, medir la absorbancia a 302 nm y calcular la liberación de Fmoc.

Desprotección de Alloc: Lavar 3 veces con DMF (2 minutos cada vez). Añadir la mezcla de DMF/AcOH/NMM (5 ml, 1 ml, 0,5 ml) y burbujear con argón durante 15 minutos. Añadir 150 mg de *tetraquis*(trifenilfosfina)paladio y burbujear argón durante 3 hrs. Lavar 3 veces con DMF. Lavar 5 veces con DCM.

Desprotección de Dde: El péptido resina lavado se trató con solución de hidrazina al 3% en DMF durante 5 minutos y 30 minutos, seguido de un lavado con DMF.

Desprotección de Ddz: El péptido-resina se lavó con DMF y después con DCM y se pretrató con TFA al 3% en DCM durante 5 minutos, 2 veces. Se realizó un tercer tratamiento con TFA al 3%/DCM durante 30 minutos. El lavado minucioso con DCM viene seguido por la neutralización con DIEA al 5% en DCM y después lavado con DCM y DMF.

Desprotección de Npys: El péptido-resina lavado se trató con HCl 0,3 M en dioxano durante 5 minutos y después durante 30 minutos. El péptido-resina desprotegido se lavó con dioxano y DCM, se neutralizó con DIEA al 5% en DCM y se lavó con DCM y DMF.

## ES 2 289 194 T3

Acoplamiento de aminoácidos: Activar un exceso 3 molar de aminoácido protegido mediante BOP (proporción molar 1:1) en DMF. Comprobar la finalización de cada reacción de condensación (1,5 - 40 h) mediante el ensayo de ninhidrina, o mediante el ensayo de cloranilo en los casos de acoplamiento a grupos amino secundarios.

5 Desprotección de la cadena lateral: Lavar 3 veces con DCM y desproteger usando la mezcla K (TFA al 82,5%, p-cresol al 5%, tioanisol al 5%, agua al 5% y etanoditiol al 2,5%) durante 5 + 120 min.

Lavados finales: TFA puro (3 veces), DCM (5 veces), DMF (10 veces), DMF/HCl al 0,1% (5 veces), HCl al 0,1% (3 veces) y HCl al 0,01% (4 veces).

10

### 13.3.2 Síntesis de la biblioteca

Síntesis: Se hinchó previamente TentaGel NH<sub>2</sub> (10 g) en DMF, se lavó 5 veces con DMF y se sometió a síntesis en fase sólida usando el siguiente protocolo que se representa de forma esquemática:

15

<b>Etapa</b>	<b>Reactivo</b>	
1	DIEA al 5%/DMF	2 x 5 min
20	2 Lavado con DMF	10 x 2 min
3	Fmoc-Lys(Dde)/BOP	hasta que el ensayo de ninhidrina sea negativo
25	4 piperidina al 50%/DMF	10 min
30	5 Fmoc-Lys(Alloc)/BOP	hasta que el ensayo de ninhidrina sea negativo
35	6 repetir la etapa 4	
40	7 Boc-Gly/BOP	hasta que el ensayo de ninhidrina sea negativo
45		
50		
55		
60		
65		

## ES 2 289 194 T3

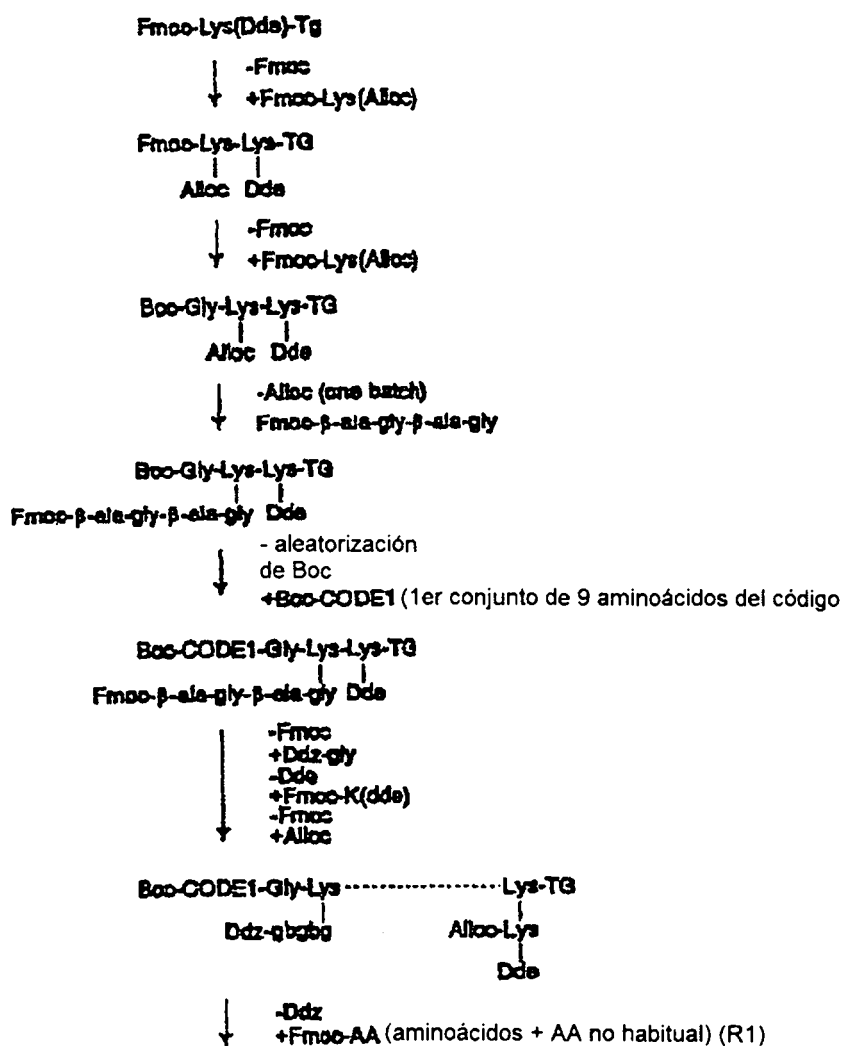
	8	catalizador de Pd	
	9	repetir la etapa 7	
5	10	Fmoc-Gly/BOP	hasta que el ensayo de ninhidrina sea negativo
	11	repetir la etapa 4	
10	12	Fmoc-β-Ala/BOP	hasta que el ensayo de ninhidrina sea negativo
	13	repetir la etapa 4	
15	14	repetir la etapa 10	
	15	repetir la etapa 4	
20	16	repetir la etapa 12	
	17	TFA/DCM	
25	18	aleatorización y código 1 (tabla 3) aminoácidos /BOP	
	19	repetir la etapa 4	
30	20	Ddz-Gly/BOP	
	21	hidrazina al 3%/DMF	
35	22	Fmoc-Lys(Dde)/BOP	hasta que el ensayo de ninhidrina sea negativo
	23	Cloroformiato de alilo	hasta que el ensayo de ninhidrina sea negativo
40	24	TFA al 3%/DCM	
	25	Fmoc-aminoácidos R1/BOP (Tabla 3)	
45	26	repetir al etapa 4	
	27	armazón I/TBTU	hasta que el ensayo de ninhidrina sea negativo
50	28	catalizador de Pd	
	29	aleatorización + código 2 (tabla 4)/BOP	
55	30	HCl/dioxano	
	31	47 ácidos R 2 (tabla 4)/anhídridos simétricos	
60	32	repetir la etapa 4	
	33	aleatorización + código 3	
65	34	50 ácidos R 3 (tabla 4)/anhídridos simétricos	

- 35 repetir la etapa 21
- 36 código 3 (tabla 4)/BOP
- 5 37 mezcla K
- 38 lavado final

La biblioteca protegida se almacenó en DMA/HOBt al 0,3%, y la biblioteca desprotegidas en HCl acuoso al 0,01%.

Esquema 5

Esquema de la síntesis de biblioteca de ácido diaminobenzoico (DABA) con código digital





# ES 2 289 194 T3

TABLA 12

*Dobletes de Aminoácidos Usados Para Codificar el Bloque R1*

R1 = 29 Aminoácidos

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Aminoácido	Elementos del código
Gly	Ala Phe
Ala	Ala Ile
Dap	Aib Val
Pro	Aib Phe
Val	Aib Ile
Ácido piperídico	Val Phe
Leu	Val Ile
Asn	Phe Ile
Asp	Asn Gln
Orn	Asn Gly
Gln	Asn Ala
Glu	Asn Aib
2-piridil-Ala	Asn Val
Chg	Asn Phe
Phe	Asn Ile
Cha	Gln Gly
Arg	Gln Ala
Citrulina	Gln Aib
Ácido tetrahydroisoquinolinacarboxílico	Gln Val
homoPhe	Gln Phe
N-Me-Gly	Gln Ile
Phe(p-F)	Gly Ala
Phe(p-Cl)	Gly Aib
Trp	Gly Val
Phe(p-NO <sub>2</sub> )	Gly Phe
Ala(1-Naf)	Gly Ile
3,4-dicloro-Phe	Ala Aib
Lys(TFA)	Ala Val
Phe(p-Bz)	Ala Phe

Aib = ácido aminoisobutírico

ES 2 289 194 T3

TABLA 13

*Ácidos usados para aleatorizaciones de las posiciones R2 y R3 (véase el esquema 1)*

R2 = 47 Ácidos (este conjunto menos A16, A28 y A47)

R3 = 50 Ácidos

Subunidades de Compuesto de Ensayo		Aminoácidos Codificantes	
A01	Ácido acético	1/2	1/3
A02	Ácido propiónico	1/2	3/1
A03	Ácido hexanoico	1/2	3/3
A04	Ácido isobutírico	1/2	3/4
A05	Ácido trimetilacético	1/2	NVal
A06	Ácido ciclopentanocarboxílico	1/2	Leu
A07	Ácido ciclohexanocarboxílico	1/2	Nle
A08	Ácido ciclohexilacético	1/2	PheCl
A9	Ácido 1-adamantanocético	1/2	15/4
A10	Glicina	1/2	2'Nal
A11	β-Alanina	1/3	3/1
A12	Ácido ε-aminocaproico	1/3	3/3
A13	Ácido γ-guanidinobutírico	1/3	3/4
A14	Serina	1/3	NVal
A15	Treonina	1/3	Leu
A16	Cys(SMe)	1/3	Nle
A17	Ácido succínico	1/3	PheCl
A18	Ácido glutárico	1/3	15/4
A19	Ácido cis-1,2-ciclohexanodicarboxílico	1/3	2'Nal
A20	Ácido succinámico	3/1	3/3
A21	Ácido benzoico	3/1	3/4
A22	Ácido 1-naftilacético	3/1	NVal
A23	Ácido bifenilacético	3/1	Leu
A24	Ácido difenilacético	3/1	Nle
A25	Ácido 4-aminobenzoico	3/1	PheCl
A26	Ácido 4-dimetilaminobenzoico	3/1	15/4
A27	Ácido 4-guanidinobenzoico	3/1	2'Nal
A28	3,4-diclorofenilalanina	3/3	3/4

ES 2 289 194 T3

Subunidades de Compuesto de Ensayo		Aminoácidos Codificantes	
A29	Ácido 4-nitrofenilacético	3/3	NVal
A30	Ácido 4,5-dimetoxi-2-nitrobenzoico	3/3	Leu
A31	Ácido 4-clorobenzoico	3/3	Nle
A32	Ácido $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-p-toluico	3/3	PheCl
A33	Ácido 4-hidroxibenzoico	3/3	15/4
A34	Ácido 4-hidroxifenilacético	3/3	2'Nal
A35	Ácido 3-(3,4,5-trimetoxifenil)propiónico	3/4	NVal
A36	Ácido 4-(3-metil-5-oxo-2-pirazolin-1-il)benzoico	3/4	Leu
A37	Prolina	3/4	Nle
A38	Ácido 3-carboxi-1,4-dimetil-2-pirrolacético	3/4	PheCl
A39	Ácido 2-metil-4-nitro-1-imidazolpropiónico	3/4	15/4
A40	Ácido 2-amino-1-imidazolacético	3/4	2'Nal
A41	Ácido 3-amino-1,2,4-triazol-5-carboxílico	NVal	Leu
A42	Ácido 4-imidazolacético	NVal	Nle
A43	Ácido isonicotínico	NVal	PheCl
A44	Ácido 2,3-piridinadicarboxílico	NVal	15/4
A45	Ácido 2-pirazinacarboxílico	Leu	2'Nal
A46	Ácido 2,3-pirazinadicarboxílico	Leu	Nle
A47	Ácido piperacético	Leu	PheCl
A48	Ácido 1-metilindol-2-carboxílico	Leu	15/4
A49	Ácido 2-metil-3-indolacético	Leu	2'Nal
A50	Ácido indol-4-carboxílico	Nle	PheCl

## ES 2 289 194 T3

TABLA 14

*Matriz de Aminoácidos y Ácido Carboxílico*

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Especie Nº	Ácido $\alpha,\beta$ - diaminopropiónico (1)	Ácido $\alpha,\gamma$ - diaminobutírico (2)	ornitina (3)	lisina (4)	Derivado
1	*	*	*	*	acetilo
2	*	*	*	*	propionilo
3	*	*	*	*	butirilo
4	*	*	*	*	valerilo
5	*	*	*	*	caproilo
6	*	*	*	*	pivaloilo
7		*	*	*	c-hexanoilo
8		*	*	*	tricloroacetilo
10		*	*	*	fenilacetilo
11		*	*	*	2,2-difenilacetilo
12		*	*	*	fenilacetilo
13		*	*	*	1-naftilacetilo
14		*	*	*	2-naftilacetilo
15	*	*	*	*	1- adamantilcarbonilo
16		*	*	*	1-adamantilacetilo
17		*	*	*	tosilglicilo
18		*	*	*	dansilglicilo
19	*	*	*	*	benzoilo
20	*	*	*	*	succinamilo
21		*	*	*	succinilo
22		*	*	*	glutarilo
23	*	*	*	*	isobutirilo
24		*	*	*	4-clorobenzoilo
25		*	*	*	2,2- difenilpropionilo
26		*	*	*	N,N-dimetilglicilo
27	*	*	*	*	heptanoilo

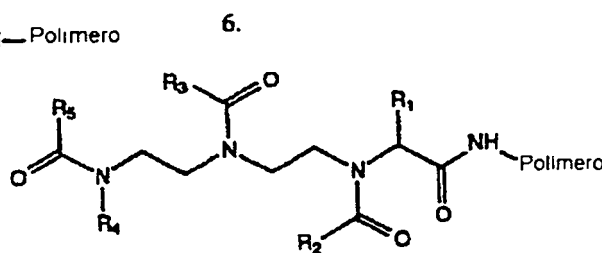
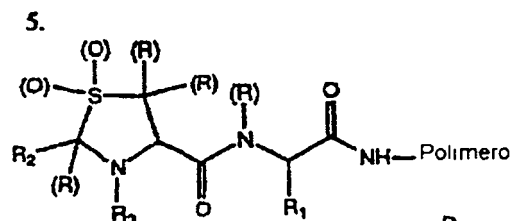
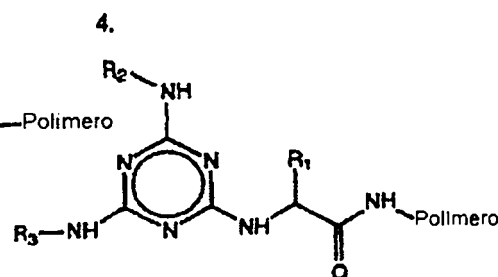
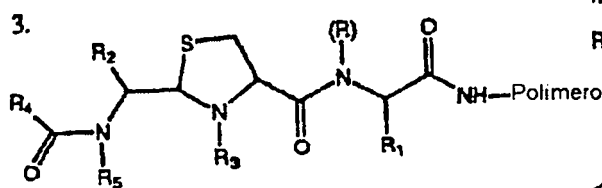
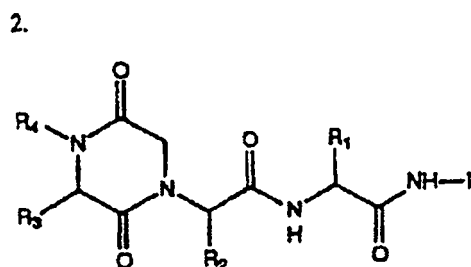
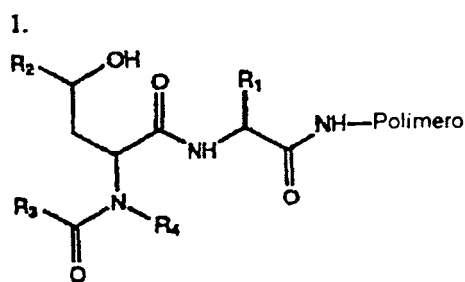
Especie N°	Ácido $\alpha,\beta$ -diaminopropiónico (1)	Ácido $\alpha,\gamma$ -diaminobutírico (2)	ornitina (3)	lisina (4)	Derivado
28	*	*	*	*	octanoilo
29	*	*	*	*	3,3-di-ph-propionilo
30		*	*	*	N,N-dimetilaminobutirilo
31	*	*	*	*	3-ph-propionilo
32	*	*	*	*	4-bi-ph-carbonilo
33	*	*	*	*	4-bi-ph-acetilo
34	*	*	*	*	crotonoilo

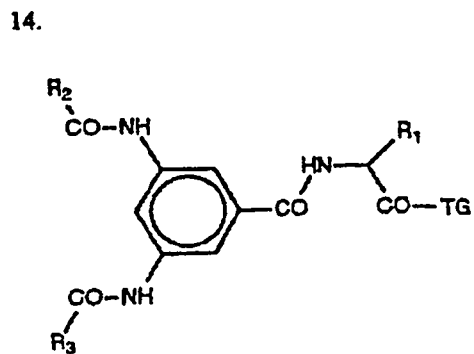
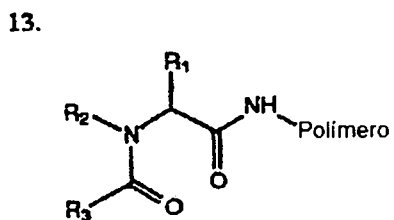
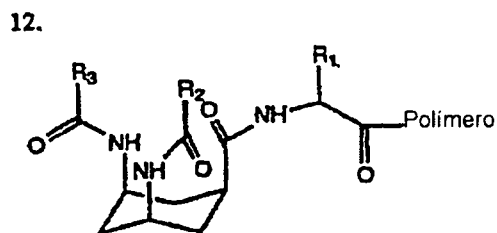
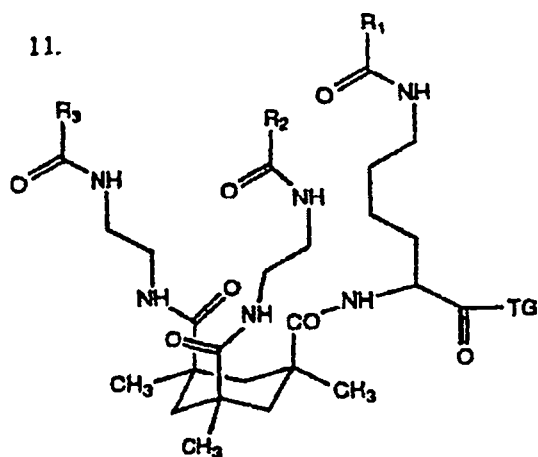
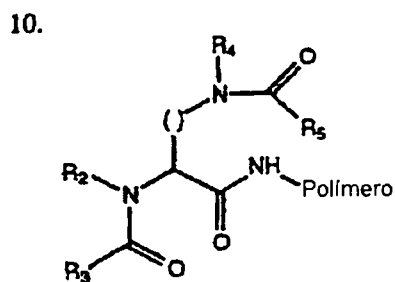
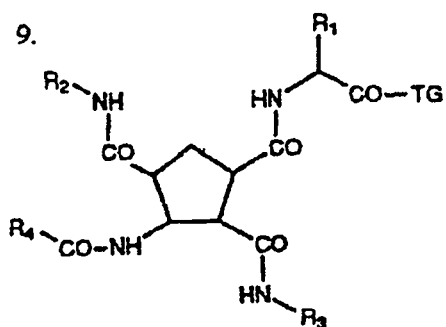
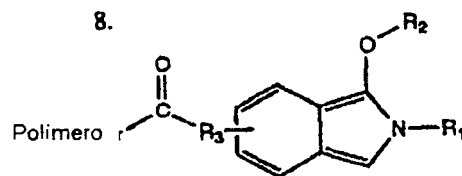
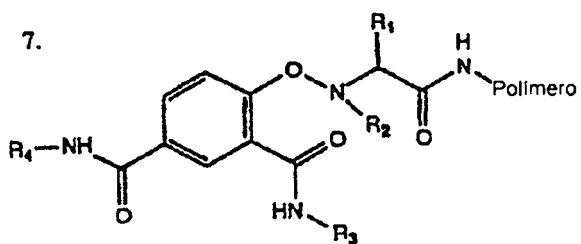
(\* significa que el derivado se sintetizó y se analizó)

Explicación del código: por ejemplo, 19/4 significa Lys(benzoilo)

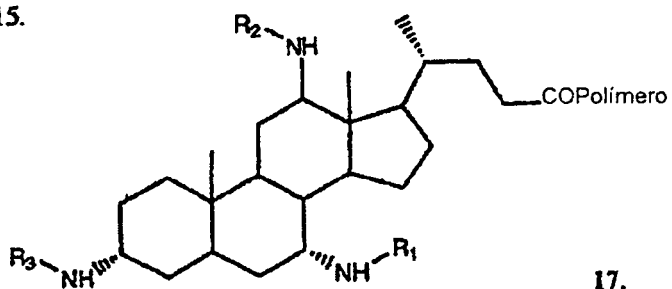
14. Ejemplo: Armazones moleculares

El Esquema XIX proporciona las estructuras químicas de 19 compuestos que pueden usarse para construir compuestos de ensayo. El esquema indica el sitio de unión de las subunidades de los compuestos de ensayo mediante  $R_n$ .

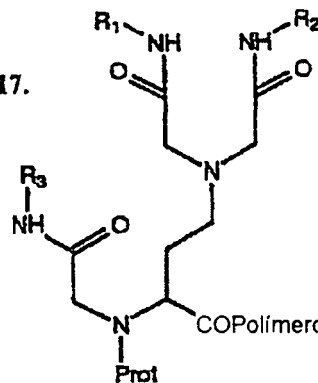




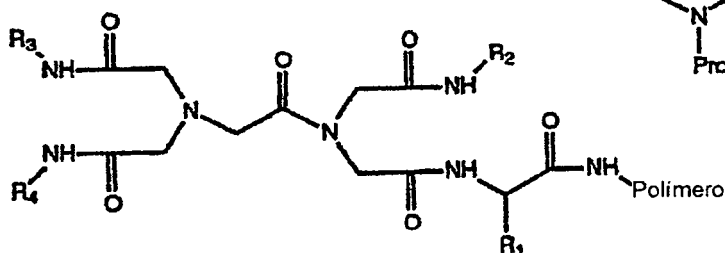
15.



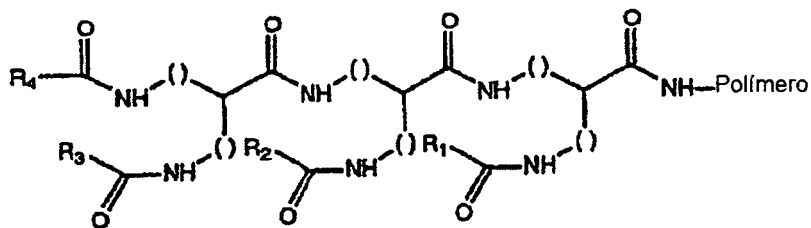
17.



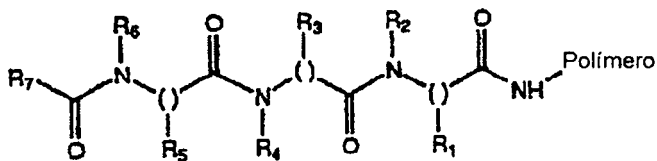
16.



18.



19.



## ES 2 289 194 T3

La Tabla 15 que se muestra a continuación proporciona una orientación que se refiere a los tipos de subunidades y a la química de su unión al armazón molecular.

N° de Armazón	Subunidades	Química de Acoplamiento
5 1. Aminoácido Aldehído /Organometal	aminoácido aldehído de homoserina alquil- o arilmetal	acoplamiento CO-NH formación de puentes C-C
10 2. Diceto-piperazina	aminoácidos N-alquilaminoácidos	acoplamiento CO-NH aminación reductora
15 3. Tioprolina sustituida	aminoácidos cisteína aminoácido aldehído, ácidos de alquilo o arilo	acoplamiento CO-NH aminación reductora
20 4. Triazina sustituida	aminoácido triclorotriazina alquil o arilaminas	acoplamiento CO-NH aminación reductora
25 5. Dióxido de tioprolina sustituido	aminoácidos N-alquilaminoácidos cisteína aldehído, cetona	acoplamiento CO-NH formación tioaminal oxidación c-alquilación
30 6. Polietilendiamina acilada	aminoácidos glicinal ácidos de alquilo o arilo	acoplamiento CO-NH aminación reductora
35 7. Ácido bencenotricarboxílico	aminoácidos N-alquilaminoácidos ácido 1,2,4- bencenotricarboxílico	acoplamiento CO-NH
40 8. 2-S-alquil(aril)isoindol	anhídrido ftálico sust. alquil o arilaminas alquil o arlimercaptanos	síntesis de isoindol
45 9. Ciclopentano	N-alquilaminoácidos aminas primarias o secundarias ácido ciclopentatricarboxílico	acoplamiento CO-NH

65

ES 2 289 194 T3

	<u>Nº de Armazón</u>	<u>Subunidades</u>	<u>Química de Acoplamiento</u>
5	10. Diacildialquildiaminoácido	aminoácidos aldehídos ácidos de alquilo o arilo	acoplamiento CO-NH aminación reductora
10	11. Triácido de Kemp prolongado	aminoácidos diaminas protegidas con triácido de Kemp	acoplamiento CO-NH
15	12. Triácido de Kemp	aminoácidos triácido de Kemp ácidos de alquilo o arilo	acoplamiento CO-NH
20	13. Alquil Acil Aminoácido	aminoácidos aldehídos ácidos de alquilo o arilo	acoplamiento CO-NH
25	14. Ácido diaminobenzoico	aminoácidos ácido 3,5-diaminobenzoico ácidos de alquilo o arilo	acoplamiento CO-NH
30	15. Esteroide	aldehídos de esqueleto esteroideo	aminación reductora acoplamiento CO-NH
35	16. Ácido bis-iminodiacético	glicina bromoacetato de t-butilo alquil o arilaminas	
40	17. Ácido iminodiacético N-alquilado	ácido diaminobutanoico bromoacetato de t-butilo alquil o arilaminas	acoplamiento CO-NH N-alquilación
45	18. Peptidomimético $\alpha,\beta,\gamma$	diaminoácidos ácidos de alquilo o arilo	acoplamiento CO-NH
50	19. Peptidomimético con glicina N-sustituida	aminoácidos aldehídos	acoplamiento CO-NH aminación reductora
55			
60			
65			

## REIVINDICACIONES

1. Una biblioteca para identificar y analizar un ligando de un aceptor de interés que comprende: una multiplicidad  
5 de soportes en fase sólida separada; a cada uno de los cuales se une:

a) una especie de compuesto de ensayo, comprendiendo dicho compuesto de ensayo una secuencia de subunidades  
en la que la especie de un compuesto de ensayo se une a cada soporte a través de un enlazador escindible; y

10 b) una o más especies de moléculas codificantes, donde las moléculas codificantes se unen a cada uno de dichos  
soportes a través de un enlazador no escindible o escindible por separado, están compuestas por alfa-aminoácidos  
y se segregan topológicamente desde el compuesto de ensayo que está unido al soporte de modo que la molécula  
codificante esté en el interior del soporte y el compuesto de ensayo esté en el exterior del soporte; donde, en cada uno  
de dichos soportes:

15 cada especie de molécula codificante es diferente de la especie de compuesto de ensayo; la secuencia de las subunida-  
des del compuesto de ensayo está codificada por las especies de moléculas codificantes; y las moléculas codificantes  
tienen subunidades dispuestas en un código no secuencial.

20 2. La biblioteca de la reivindicación 1, en la que el compuesto de ensayo es no secuenciable.

3. La biblioteca de la reivindicación 2, en la que el compuesto de ensayo es un polímero.

4. La biblioteca de la reivindicación 3, en la que el compuesto de ensayo es un polímero seleccionado entre el  
25 grupo que consiste en poliamida, poliéster, poliurea, poliuretano, policarbonato, poliamina, polialcano, polialqueno,  
polialcohol, polisulfuro y polidisulfuro.

5. La biblioteca de la reivindicación 2, en la que las subunidades del compuesto de ensayo están unidas por enlaces  
químicos seleccionados entre el grupo que consiste en enlaces amida, éster, urea, uretano, carbonato, amina, alcano,  
30 alqueno, sulfuro y disulfuro.

6. La biblioteca de la reivindicación 2, en la que el compuesto de ensayo es un almacén molecular.

7. La biblioteca de la reivindicación 6, en la que el almacén molecular se selecciona entre el grupo que consiste en  
35 una estructura esteroidea, un azúcar, una estructura heterocíclica y un compuesto poliaromático.

8. La biblioteca de la reivindicación 6, en la que el almacén molecular es un aldehído de aminoácido/organometal,  
una dicetopiperazina, una tioprolina sustituida, una triazina sustituida, un dióxido de tioprolina sustituido, una polieti-  
40 lendiamina acilada, un ácido bencenotricarboxílico, un 2-S-alquil(aril)isoindol, un ciclopentano, un diacildialquildia-  
minoácido, un triácido de Kemp prolongado, un triácido de Kemp, un alquil acil aminoácido, un ácido diaminoben-  
zoico, un esteroide, un ácido bis-iminodiacético, un ácido iminodiacético N-alquilado, un peptidomimético alfa, beta,  
gamma o un peptidomimético con glicina N-sustituida.

9. La biblioteca de la reivindicación 1, en la que la molécula codificante es un polipéptido ramificado.

45 10. La biblioteca de la reivindicación 1 en la que, en cada uno de dichos soportes, la estructura del compuesto de  
ensayo se codifica por una pluralidad de especies de moléculas codificantes.

11. La biblioteca de la reivindicación 1, en la que la molécula codificante comprende un polímero de diaminoáci-  
50 dos, que tiene un primer y un segundo resto amino, en la que:

a) el primer resto amino forma un enlace peptídico que une dichos diaminoácidos entre sí; y

55 b) el segundo resto amino está acoplado a una de una multiplicidad de especies de alfa-aminoácidos.

12. La biblioteca de la reivindicación 1, en la que las moléculas codificantes están compuestas por un derivado  
de ácido alfa, beta-diaminopropiónico, ácido alfa, gamma-diaminobutírico, ornitina y lisina, ácido glutámico, ácido  
aspártico, cisteína o penicilamina, donde el derivado se forma por reacción de un ácido carboxílico con un resto N-  
60 beta, N-gamma o N-épsilon amino.

13. La biblioteca de la reivindicación 12, en la que el derivado se selecciona entre el grupo que consiste en acetilo,  
propionilo, butirilo, valerilo, caproilo, pivaloilo, c-hexilo, tricloroacetilo, fenilacetilo, 2,2-difenilacetilo, fenilbutirilo,  
1-naftilacetilo, 2-naftilacetilo, 1-adamantilcarbonilo, 1-adamantilacetilo, tosilglicilo, dansilglicilo, benzofilo, succina-  
65 milo, succinilo, glutarilo, isobutirilo, 4-clorobenzoilo, 2,2-difenilpropionilo, N,N-dimetilglicilo, heptanoilo, octanoilo,  
3,3-di-ph-propionilo, N,N-dimetilaminobutirilo, 3-ph-propionilo, 4-bi-ph-carbonilo, 4-bi-ph-acetilo y crotonilo.

14. La biblioteca de la reivindicación 2, en la que una subunidad de las especies de compuesto de ensayo se une  
mediante desplazamiento nucleófilo y se selecciona entre el grupo que consiste en etilamina, i-propilamina, butilami-

## ES 2 289 194 T3

na, i-butilamina, ciclopentilamina, ciclohexilamina, etanolamina, 3-aminopropanol, 1-amino-2-propanol, 2-metoxietilamina, beta-Ala-OtBu, etilendiamina(Boc), 2-(2-aminoetil)-1-metilpirrolidina, bencilamina, naftaleno-metilamina, 4-(trifluorometil)-bencilamina, 2-amino-1-fenil-etanol, tiramina, 4-metoxi-bencilamina, 3,5-dimetoxi-bencilamina y 4-(dimetilamino)-bencilamina.

5 15. La biblioteca de la reivindicación 2, en la que una subunidad de las especies de compuesto de ensayo se une mediante acilación de una amina primaria y se selecciona entre el grupo que consiste en ácido gamma-guanidinobutírico, succinámico, 1-naftilacético, difenilacético, bifenilacético, pentafluorofenilacético, 4-trifluorometilbenzoico, 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxifenilacético, 4-aminofenilacético, 3-nitrofenilacético, 2-nitro-4,5-dimetoxibenzoico, 3-(3,4,5-trimetoxifenil)propiónico, 4-guanidinobenzoico, 4-dimetilaminobenzoico, 4-(3-metil-5-oxo-2-pirazolín-1-il)benzoico, 1,4-dimetil-2,3-pirrolidicarboxílico, 2-metil-4-nitro-1-imidazolpropiónico, 2-amino-1-imidazolacético, 3-amino-1,2,4-triazol-5-carboxílico, 4-imidazolacético, 2,3-piridinadicarboxílico, 2-pirazinacarboxílico, 2,3-pirazinadicarboxílico, 1-metilindol-2-carboxílico, 2-metil-3-indolacético e indol-4-carboxílico.

15 16. La biblioteca de la reivindicación 2, en la que una subunidad de las especies de compuesto de ensayo se une por alquilación reductora y se selecciona entre el grupo que consiste en 2-metilbutiraldehído, 2-etilbutiraldehído, trimetilacetaldéhído, 2-metilvaleraldehído, ciclohexanocarboxaldehído, benzaldehído, 4-nitrobenzaldehído, 4-hidroxibenzaldehído, vanillina, 2-tiofenocarboxaldehído, piridina-4-carboxaldehído, alfa, alfa, alfa-trifluoro-o-tolualdehído, 4-metoxibenzaldehído, 1-acetilindol-3-carboxaldehído, 4-carboxibenzaldehído, beta-naftaldehído, 4-fenilbenzaldehído, 3-fenoxibenzaldehído y 2-hidroxibenzaldehído.

25 17. Una biblioteca para identificar un ligando o un aceptor de interés, comprendiendo la biblioteca una multiplicidad de soportes en fase sólida separada, teniendo la superficie de cada soporte unido un enlazador que comprende una sola especie de compuesto de ensayo que tiene una secuencia de subunidades, y teniendo el interior de cada soporte unida una molécula codificante que codifica la secuencia de subunidades del compuesto de ensayo, teniendo el enlazador un enlace que es escindible por una enzima que no escinde un enlace de la molécula codificante y comprendiendo la molécula codificante alfa-aminoácidos.

30 18. La biblioteca de la reivindicación 17, en la que el enlazador es un péptido.

19. La biblioteca de la reivindicación 17, en la que el enlazador comprende fenilalanina.

20. La biblioteca de la reivindicación 17, en la que la enzima es una endopeptidasa.

35 21. La biblioteca de la reivindicación 20, en la que la endopeptidasa es quimotripsina.

22. La biblioteca de la reivindicación 17, en la que el compuesto de ensayo es un polímero.

40 23. La biblioteca de la reivindicación 22, en la que el polímero se selecciona entre un grupo compuesto por poliamida, poliéster, poliurea, poliuretano, policarbonato, poliamina, polialcano, polialqueno, polialcohol, polisulfuro y polidisulfuro.

45 24. La biblioteca de la reivindicación 17, en la que las subunidades del compuesto de ensayo están unidas mediante enlaces químicos seleccionados entre el grupo que consiste en enlaces amida, éster, ureas, uretano, carbonato, amina, alcano, alqueno, sulfuro y disulfuro.

25. La biblioteca de la reivindicación 17, en la que el compuesto de ensayo comprende además un armazón molecular.

50 26. La biblioteca de la reivindicación 25, en la que el armazón molecular se selecciona entre el grupo que consiste en una estructura esteroidea, un azúcar, una estructura heterocíclica y un compuesto poliaromático.

55 27. La biblioteca de la reivindicación 25, en la que el armazón molecular es un aldehído de aminoácido/organometal, una dicetopiperazina, una tioprolina sustituida, una triazina sustituida, un dióxido de tioprolina sustituido, una polietilendiamina acilada, un ácido bencenotricarboxílico, un 2-S-alkil(aril)isoindol, un ciclopentano, un diacildialquildiaminoácido, un triácido de Kemp prolongado, un triácido de Kemp, un alquil acil aminoácido, un ácido diaminobenzoico, un esteroide, un ácido bis-iminodiacético, un ácido iminodiacético N-alkilado, un peptidomimético alfa, beta, gamma o un peptidomimético con glicina N-sustituida.

60 28. La biblioteca de la reivindicación 17, en la que la molécula codificante es un polipéptido ramificado.

65 29. La biblioteca de la reivindicación 17, en la que la molécula codificante comprende un polímero de diaminoácidos, que tiene un primer y un segundo resto amino, en la que: a) el primer resto amino forma un enlace peptídico que une dichos diaminoácidos entre sí; y b) el segundo resto amino se acopla a una de una multiplicidad de especies de alfa-aminoácidos.

30. La biblioteca de la reivindicación 17, en la que la molécula codificante comprende un derivado de cada uno de ácido alfa, beta-diaminopropiónico, ácido alfa, gamma-diaminobutírico y ornitina.

## ES 2 289 194 T3

31. La biblioteca de la reivindicación 30, en la que el derivado se forma por reacción de un ácido carboxílico con un grupo N-beta, N-gamma, N-delta o N-épsilon amino para formar un grupo acilo seleccionado entre el grupo que consiste en acetilo, propionilo, butirilo, valerilo, caproílo, pivaloílo, c-hexilo, tricloroacetilo, fenilacetilo, 2,2-difenilacetilo, fenilbutirilo, 1-naftilacetilo, 2-naftilacetilo, 1-adamantilcarbonilo, 1-adamantilacetilo, tosilglicilo, dansilglicilo, benzoílo, succinamilo, succinilo, glutarilo, isobutirilo, 4-clorobenzoílo, 2,2-difenilpropionilo, N,N-dimetilglicilo, heptanoílo, octanoílo, 3,3-di-ph-propionilo, N,N-dimetilaminobutirilo, 3-ph-propionilo, 4-bi-ph-carbonilo, 4-bi-ph-acetilo y crotonilo.
32. La biblioteca de la reivindicación 17, en la que una de las subunidades se selecciona entre el grupo que consiste en etilamina, i-propilamina, butilamina, i-butilamina, ciclopentilamina, ciclohexilamina, etanolamina, 3-aminopropanol, 1-amino-2-propanol, 2-metoxietilamina, beta-Ala-OtBu, etilendiamina(Boc), 2-(2-aminoetil)-1-metilpirrolidina, bencilamina, naftaleno-metilamina, 4-(trifluorometil)-bencilamina, 2-amino-1-fenil-etanol, tiramina, 4-metoxi-bencilamina, 3,5-dimetoxi-bencilamina y 4-(dimetilamino)-bencilamina.
33. La biblioteca de la reivindicación 17, en la que una de las subunidades es un ácido seleccionado entre el grupo que consiste en ácido guanidinobutírico, succinámico, 1-naftilacético, difenilacético, bifenilacético, pentafluorofenilacético, 4-trifluorometilbenzoico, 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxifenilacético, 4-aminofenilacético, 3-nitrofenilacético, 2-nitro-4,5-dimetoxibenzoico, 3-(3,4,5-trimetoxifenil)propiónico, 4-guanidinobenzoico, 4-dimetilaminobenzoico, 4-(3-metil-5-oxo-2-pirazolin-1-il)benzoico, 1,4-dimetil-2,3-pirrolidicarboxílico, 2-metil-4-nitro-1-imidazolpropiónico, 2-amino-1-imidazolacético, 3-amino-1,2,4-triazol-5-carboxílico, 4-imidazolacético, 2,3-piridinadicarboxílico, 2-pirazinacarboxílico, 2,3-pirazinadicarboxílico, 1-metilindol-2-carboxílico, 2-metil-3-indolacético e indol-4-carboxílico.
34. La biblioteca de la reivindicación 17, en la que una de las subunidades se selecciona entre el grupo que consiste en 2-metilbutiraldehído, 2-etilbutiraldehído, trimetilacetalddehído, 2-metilvaleraldehído, ciclohexanocarboxaldehído, benzaldehído, 4-nitrobenzaldehído, 4-hidroxibenzaldehído, vanillina, 2-tiofenocarboxaldehído, piridina-4-carboxaldehído, alfa, alfa, alfa-trifluoro-o-tolualdehído, 4-metoxibenzaldehído, 1-acetilindol-3-carboxaldehído, 4-carboxibenzaldehído, beta-naftaldehído, 4-fenilbenzaldehído, 3-fenoxibenzaldehído y 2-hidroxibenzaldehído.
35. Una biblioteca para identificar un ligando o un aceptor de interés, comprendiendo la biblioteca una multiplicidad de soportes en fase sólida separada, teniendo la superficie de cada soporte unido un enlazador que comprende una sola especie de compuesto de ensayo que comprende una secuencia de subunidades a la que se une un primer grupo protector, y teniendo el interior de cada soporte unida una molécula codificante que codifica la secuencia de subunidades y a la que se une un segundo grupo protector, siendo el primer grupo protector diferente del segundo grupo protector y comprendiendo la molécula codificante alfa-aminoácidos.
36. La biblioteca de la reivindicación 35, en la que el enlazador es un péptido.
37. La biblioteca de la reivindicación 35, en la que el compuesto de ensayo es un polímero.
38. La biblioteca de la reivindicación 37, en la que el polímero se selecciona entre el grupo que consiste en poliamida, poliéster, poliurea, poliuretano, policarbonato, poliamina, polialcano, polialqueno, polialcohol, polisulfuro y polidisulfuro.
39. La biblioteca de la reivindicación 35, en la que las subunidades del compuesto de ensayo están unidas mediante enlaces químicos seleccionados entre el grupo que consiste en enlaces amida, éster, urea, uretano, carbonato, amina, alcano, alqueno, sulfuro y disulfuro.
40. La biblioteca de la reivindicación 35, en la que el compuesto de ensayo comprende además un armazón molecular.
41. La biblioteca de la reivindicación 40, en la que el armazón molecular se selecciona entre el grupo que consiste en una estructura esteroidea, un azúcar, una estructura heterocíclica y un compuesto poliaromático.
42. La biblioteca de la reivindicación 40, en la que el armazón molecular es un aldehído de aminoácido/organometal, una dicetopiperazina, una tioprolina sustituida, una triazina sustituida, un dióxido de tioprolina sustituido, una polietilendiamina acilada, un ácido bencenotricarboxílico, un 2-S-alquil(aril)isoindol, un ciclopentano, un diacildialquildiaminoácido, un triácido de Kemp prolongado, un triácido de Kemp, un alquil acil aminoácido, un ácido diaminobenzoico, un esteroide, un ácido bis-iminodiacético, un ácido iminodiacético N-alquilado, un peptidomimético alfa, beta, gamma o un peptidomimético con glicina N-sustituida.
43. La biblioteca de la reivindicación 35, en la que la molécula codificante es un polipéptido ramificado.
44. La biblioteca de la reivindicación 35, en la que la molécula codificante comprende un polímero de diaminoácidos, que tiene un primer y un segundo resto amino, en la que:
- a) el primer resto amino forma un enlace peptídico que une dichos diaminoácidos entre sí; y b) el segundo resto amino se acopla a una de una multiplicidad de especies de alfa-aminoácidos.

## ES 2 289 194 T3

45. La biblioteca de la reivindicación 35, en la que la molécula codificante comprende un derivado de cada uno de ácido alfa, beta-diaminopropiónico, ácido alfa, gamma-diaminobutírico y ornitina.

5 46. La biblioteca de la reivindicación 45, en la que el derivado se forma por reacción de un ácido carboxílico con un grupo N-beta, N-gamma, N-delta o N-épsilon amino para formar un grupo acilo seleccionado entre el grupo que consiste en acetilo, propionilo, butirilo, valerilo, caproilo, pivaloilo, c-hexilo, tricloroacetilo, fenilacetilo, 2,2-difenilacetilo, fenilbutirilo, 1-naftilacetilo, 2-naftilacetilo, 1-adamantilcarbonilo, 1-adamantilacetilo, tosilglicilo, dansilglicilo, benzoilo, succinamilo, succinilo, glutarilo, isobutirilo, 4-clorobenzoilo, 2,2-difenilpropionilo, N,N-dimetilglicilo, heptanoilo, octanoilo, 3,3-di-ph-propionilo, N,N-dimetilaminobutirilo, 3-ph-propionilo, 4-bi-ph-carbonilo, 4-bi-ph-acetilo y crotonilo.

15 47. La biblioteca de la reivindicación 35, en la que una de las subunidades se selecciona entre el grupo que consiste en etilamina, i-propilamina, butilamina, i-butilamina, ciclopentilamina, ciclohexilamina, etanolamina, 3-aminopropanol, 1-amino-2-propanol, 2-metoxietilamina, beta-Ala-OtBu, etilendiamina(Boc), 2-(2-aminoetil)-1-metilpirrolidina, bencilamina, naftaleno-metilamina, 4-(trifluorometil)-bencilamina, 2-amino-1-fenil-etanol, tiramina, 4-metoxi-bencilamina, 3,5-dimetoxi-bencilamina y 4-(dimetilamino)-bencilamina.

20 48. La biblioteca de la reivindicación 35, en la que una de las subunidades es un ácido seleccionado entre el grupo compuesto por ácido guanidinobutírico, succinámico, 1-naftilacético, difenilacético, bifenilacético, pentafluorofenilacético, 4-trifluorometilbenzoico, 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxifenilacético, 4-aminofenilacético, 3-nitrofenilacético, 2-nitro-4,5-dimetoxibenzoico, 3-(3,4,5-trimetoxifenil)propiónico, 4-guanidinobenzoico, 4-dimetilaminobenzoico, 4-(3-metil-5-oxo-2-pirazolin-1-il)benzoico, 1,4-dimetil-2,3-pirrolidicarboxílico, 2-metil-4-nitro-1-imidazolpropiónico, 2-amino-1-imidazolacético, 3-amino-1,2,4-triazol-5-carboxílico, 4-imidazolacético, 2,3-piridinadicarboxílico, 2-pirazinacarboxílico, 2,3-pirazinadicarboxílico, 1-metilindol-2-carboxílico, 2-metil-3-indolacético e indol-4-carboxílico.

25 49. La biblioteca de la reivindicación 35, en la que una de las subunidades se selecciona entre el grupo que consiste en 2-metilbutiraldehído, 2-etilbutiraldehído, trimetilacetaldehído, 2-metilvaleraldehído, ciclohexanocarboxaldehído, benzaldehído, 4-nitrobenzaldehído, 4-hidroxibenzaldehído, vanillina, 2-tiofenocarboxaldehído, piridina-4-carboxaldehído, alfa, alfa, alfa-trifluoro-o-tolualdehído, 4-metoxibenzaldehído, 1-acetilindol-3-carboxaldehído, 4-carboxibenzaldehído, beta-naftaldehído, 4-fenilbenzaldehído, 3-fenoxibenzaldehído y 2-hidroxibenzaldehído.

35

40

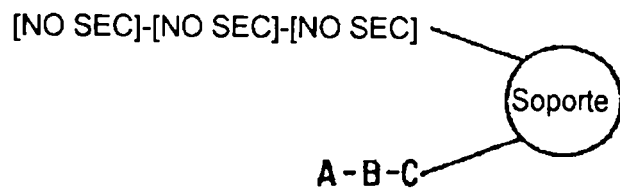
45

50

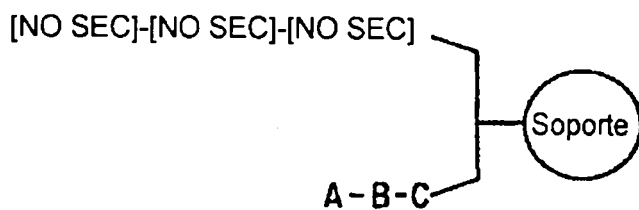
55

60

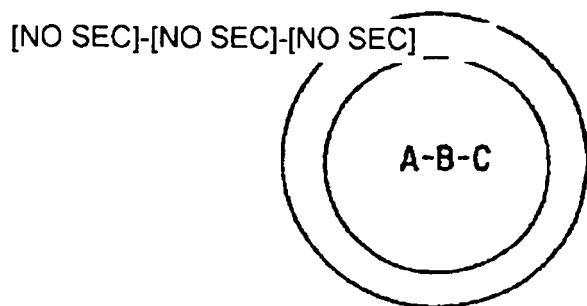
65



**FIG. 1A (Comparativa)**



**FIG. 1B (Comparativa)**



**FIG. 1C**

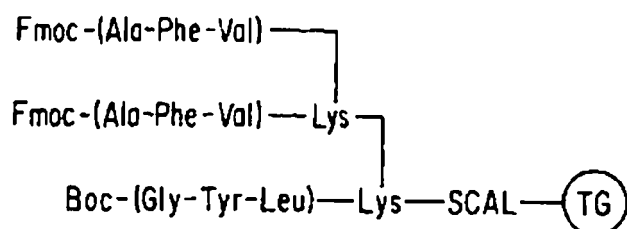


FIG. 2A

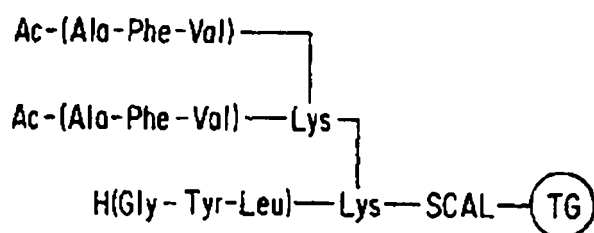


FIG. 2B

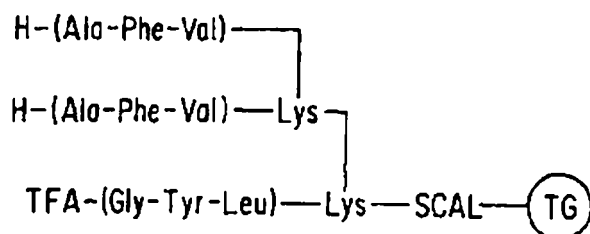


FIG. 2C

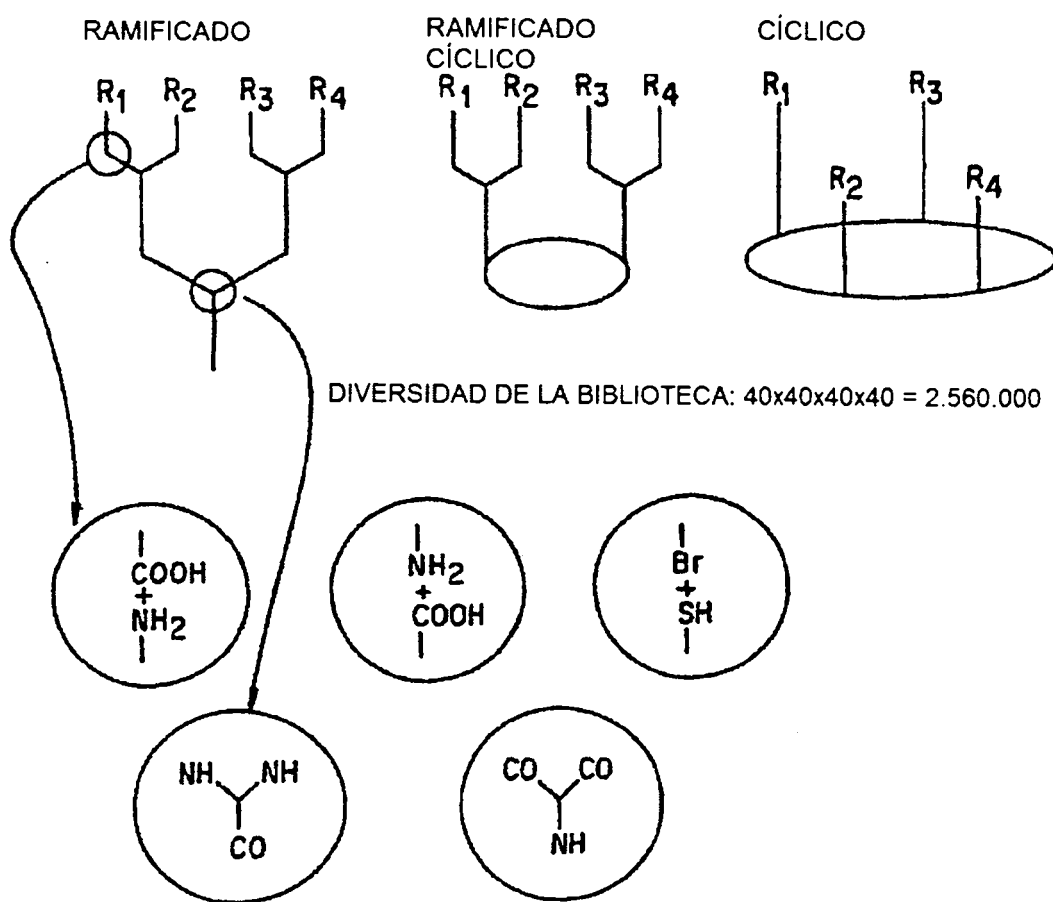


FIG. 3

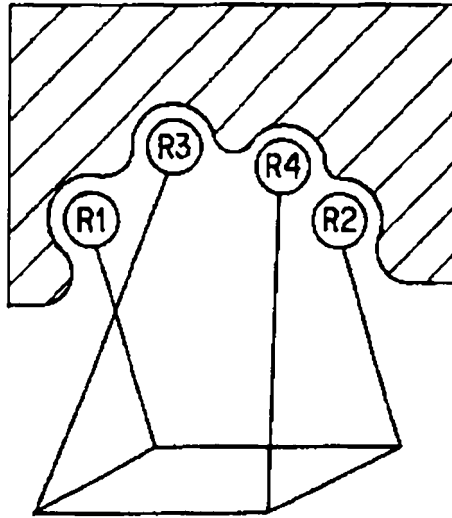


FIG. 4A

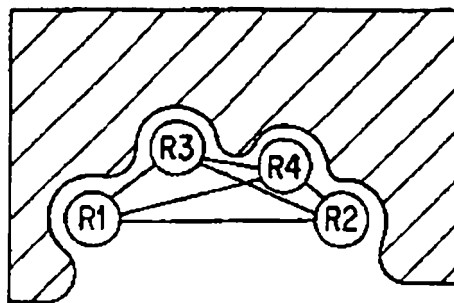
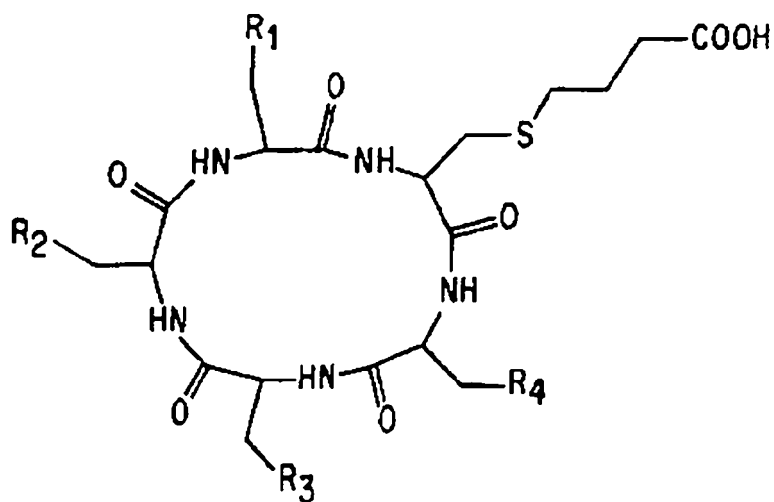


FIG. 4B





1. TG + Br-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH
2. + Boc-Cys(R)-OMe
3. TFA
4. Fmoc-Dab(Boc)-OH/DIC/HOBt
5. TFA
6. R-COOH/DIC/HOBt
7. Pip/DMF
8. Fmoc-Dab(Boc)OH/DIC/HOBt
- .
- .
- .
- n. NaOH
- n+1. DIC/HOBt

**FIG. 6**

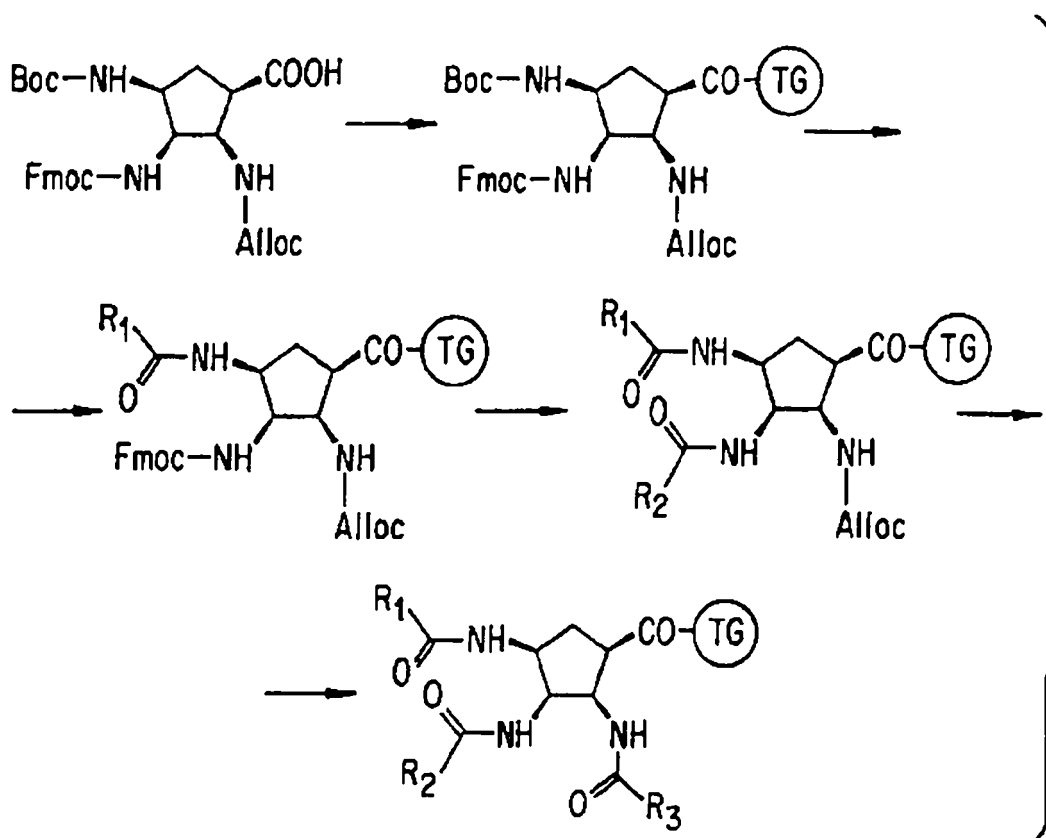


FIG. 7

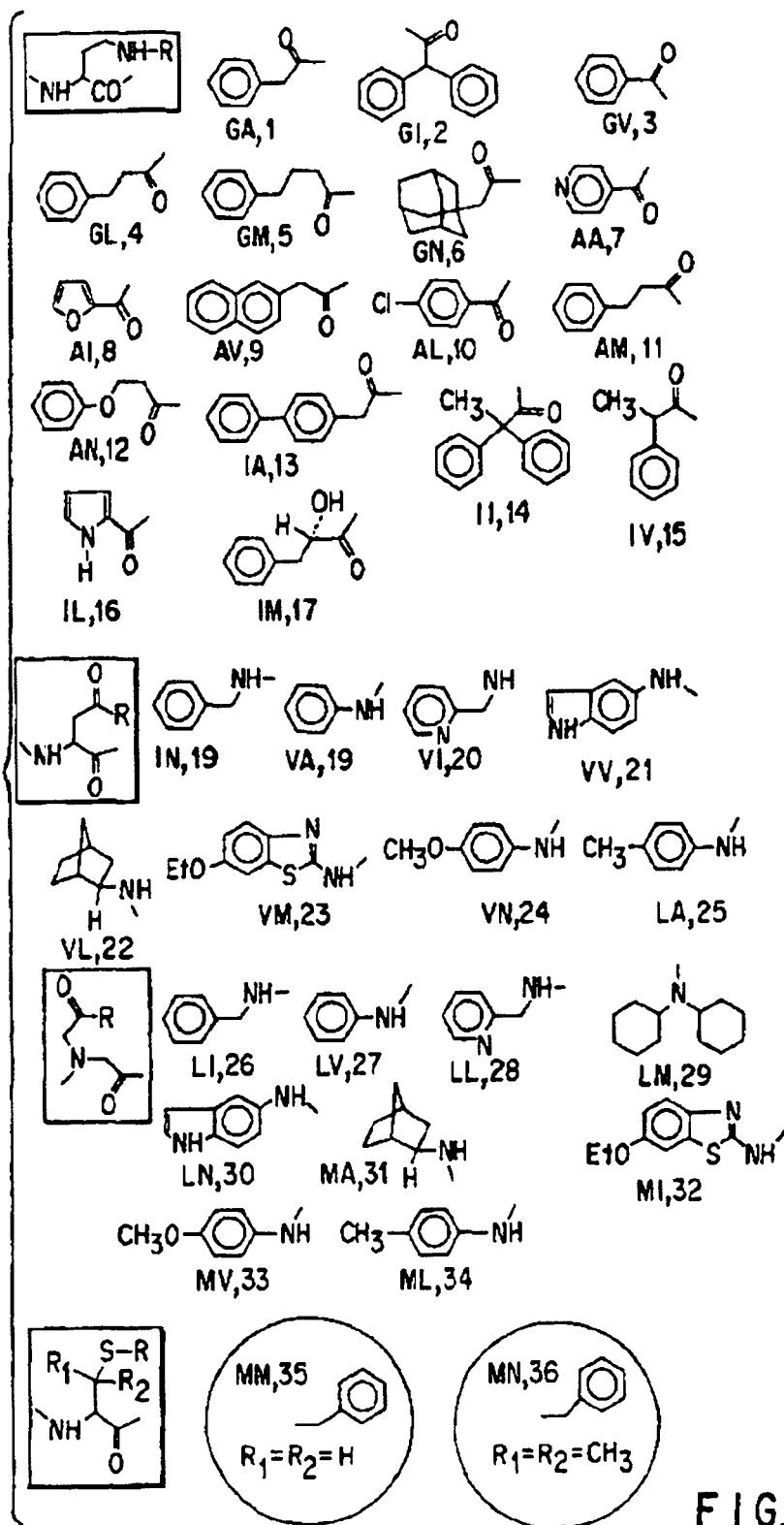


FIG. 8