(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 313 992**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **01986325 .7**
(96) Fecha de presentación : **02.10.2001**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1368491**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **10.12.2003**

(54) Título: **Método para seleccionar ácidos nucleicos enlazantes altamente afines por desligación bidimensional.**

(30) Prioridad: **03.10.2000 DE 100 48 944**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

(73) Titular/es: **AptaRes AG.**
Im Biotechnologiepark TGZ 1
14943 Luckenwalde, DE

(72) Inventor/es: **Kage, Andreas**

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Método para seleccionar ácidos nucleicos enlazantes altamente afines por desligación bidimensional.

Campo al que se adscribe del invento

El invento consiste en un método para seleccionar ácidos nucleicos enlazantes altamente afines a un blanco, a lo cual una mixtura de ácidos nucleicos enlaza con una o varias moléculas blanco definidas; en la molécula blanco se separan los ácidos nucleicos enlazantes de los que no son enlazantes.

Ácidos nucleicos se denominan a los polinucleótidos u oligonucleótidos con una cantidad de nucleótidos de 5 a 200, especialmente de 20 a 200; pueden tratarse de DNA, RNA o PNA. Especialmente los ácidos nucleicos pueden haberse derivatizado químicamente, por ejemplo por substitución de 2 y/o de 5 así y/o con moléculas reporter (es decir, moléculas que permiten una comprobación a través de los métodos de detección habituales). El ácido nucleótido puede ser de cadena simple o doble. Una molécula blanco puede, en principio, ser de cualquier tipo siempre que no se trate a su vez de un ácido nucleótido que establezca con el ácido nucleótido enlazante un compuesto de par de base Crick/Watson. Ejemplos de moléculas blanco son: substancias artificiales, cerámicas, péptidos, proteínas, encimas, oligosacáridos, polisacáridos, ácidos nucleicos que establezcan enlaces que no sean del tipo Crick/Watson, lípidos, pero también hormonas y demás enlaces orgánicos como feromonas. Los blancos pueden ser también elementos constituyentes de células y células enteras así como virus y bacterias enteros. Los ácidos nucleicos enlazantes a los no ácidos nucleicos se denominan también aptámeros, como también a los ácidos nucleicos que establezcan un enlace no del tipo Watson/Crick con otros ácidos nucleicos. El concepto de enlace en el marco del invento se refiere a los enlaces no covalentes. Los aptámeros últimamente mencionados pueden emplearse, por ejemplo, para reconocer defectos genéticos determinados y/o para llevar a cabo delecciones. El concepto de enlace en el marco del invento se refiere a los enlaces no covalentes. El concepto de afinidad se relaciona en el marco del invento a la resistencia del compuesto dentro de complejos del tipo antígeno/anticuerpos. La resistencia del enlace es cuantificable por medio de la constante de afinidad, la cual se define según la ley de masas. En el marco del invento el concepto de afinidad no se refiere solamente, en todo caso, a complejos con un punto enlace sino a complejos con varios puntos de enlaces, es decir, abarca también el concepto de avidez. La avidez se calcula partiendo de la cantidad y de la fuerza de cohesión de cada uno de los puntos de enlace en complejos polivalentes de anticuerpos/antígenos. En cuanto a "amplificación" se entiende cada una de las reacciones encimáticamente transmitidas que sirven para la replicación de una secuencia de ácido nucleico como, por ejemplo, el PCR.

Trasfondo del invento y estado de la técnica

Los ácidos nucleicos en los organismos naturales tienen, sobre todo, el cometido de codificar proteínas y semejantes genéticamente expresadas en una célula. A este respecto es determinante la estructura primaria de los ácidos nucleicos, es decir la secuencia. Al margen de ello los ácidos nucleicos pueden establecer también complejos de anticuerpos/antígenos con los no ácidos nucleicos existentes en una célula. El que un enlace de este tipo pueda tener lugar no depende solamente de la estructura primaria sino también de la estructura secundaria y terciaria generada en una solución en el caso de una secuencia definida (estructura tridimensional). La afinidad del ácido nucleico respecto de la molécula blanco depende definitivamente, por lo tanto, de si el ácido nucleico -además de la capacidad de enlace puramente química- desde el punto de vista estérico en la zona del punto de enlace o en el punto de enlace de la molécula blanco "concuerda" de acuerdo a las relaciones en los clásicos complejos de anticuerpos/antígenos. Los ácidos nucleicos concordantes pueden, pues, ejercer la función de anticuerpos o de antígenos. Estos aptámeros por regla general no son ácidos nucleicos naturales y pueden igualmente "cortarse a medida" para una molécula blanco. Para el corte a medida se cuenta en principio con dos enfoques. El primero consiste en el cálculo de una secuencia y/o derivatización apropiadas para el ácido nucleico tras determinación de la estructura exacta conocida incluyendo el punto de enlace y la estructura terciaria de la molécula blanco. Esto no solamente es algo sumamente trabajoso; en casos en los cuales la estructura de la molécula blanco no sea suficientemente conocida este enfoque es incluso imposible. El segundo enfoque consiste en el aislamiento de la molécula blanco y en el establecimiento del contacto de una mixtura de ácidos nucleicos prospectivos con la molécula blanco aislada (y las más veces inmovilizada), con lo que los ácidos nucleicos enlazantes altamente afines se separan de los menos afines o incluso de los que no son en absoluto enlazantes. En mixturas con ácidos nucleicos se trata típicamente de bibliotecas de ácidos nucleicos que, por ejemplo, se han creado por vía de la química de combinaciones. Una biblioteca ácidos nucleicos contiene toda una diversidad de ácidos nucleicos diferentes entre sí, a lo cual al menos en una zona de un segmento de secuencia se ha establecido una randomización (con nucleótidos naturales y/o no naturales). Puede -si bien no es necesario- preverse un segmento de secuencia conservado. La randomización en posiciones n con diferentes nucleótidos m tiene por consecuencia una biblioteca con n^m elementos. Los ácidos nucleicos seleccionados altamente afines son apropiados para toda una diversidad de aplicaciones.

Así, por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden usarse en el marco de las pruebas en moléculas blanco específicas para el ácido nucleico ya presentes o no en una solución de comprobación y/o en una célula o tejido. Entonces es recomendable en ausencia de una molécula reporter la formación habitual en el ácido nucleico con vistas a la capacidad de identificación vía técnica de medición más fácil. Estas pruebas pueden emplearse para formular diagnósticos, por ejemplo en relación a mutantes oncógenos o substancias de marcador genético que se generan al darse determinadas perturbaciones funcionales fisiológicas. Se comprende, pues, que el ácido nucleico afectado no haya de "reconocer"

selectivamente tan sólo al mutante oncógeno sino que frente a la variante natural no establezca un enlace, esto es, ha de diferenciarse entre el producto expresivo oncógeno y el producto de expresión natural. Esto puede llevarse a cabo fácilmente tras la selección de los ácidos nucleicos enlazantes al producto de expresión oncógeno y ello, a saber, por medio de la selección subsiguiente de los ácidos nucleicos a partir de los ácidos nucleicos previamente seleccionados y no enlazantes con el producto de expresión natural.

Los ácidos nucleicos seleccionados pueden usarse también para la separación de moléculas blanco de una solución y ello, por ejemplo, en el marco de los procesos de separación habituales de columna o de gel. Entonces es recomendable configurar los ácidos nucleicos de modo que puedan inmovilizarse e inmovilizarlos de hecho en el proceso de separación.

Los ácidos nucleicos seleccionados pueden emplearse igualmente para modular funciones fisiológicas, esto es, para cohibir, inducir o reforzar. Por este motivo estos ácidos nucleicos también pueden emplearse en compuestos farmacéuticos. Los ácidos nucleicos seleccionados naturalmente no han de ser por lo demás fisiológicamente en nada problemáticos y en cuanto a la necesidad de evitar efectos secundarios. La ventaja del empleo de los ácidos nucleicos en lugar, por ejemplo, de los péptidos consiste en que la identificación o la selección de los ácidos nucleicos apropiados es considerablemente más fácil que en los casos de los péptidos y las proteínas por causa de que la producción de bibliotecas de ácidos nucleicos sea comparativamente más fácil en comparación con la producción de bibliotecas de proteínas o péptidos.

Un conocido método de selección altamente afín de ácidos nucleicos enlazados a una molécula blanco es el procedimiento SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment). Diversas variantes y gamas de aplicación se han descrito, por ejemplo, en los escritos US-A-5,712,375, US-A-5,864,026, US-A-5,789,157, US-A-5,475,096, US-A-5,861,254, US-A-5,595,877, US-A-5,817,785. En el caso de procesos por lo demás conocidos se separan en principio aproximativamente en una mayoría de ciclos aquellos ácidos nucleicos que se enlazan con una afinidad alta o más alta que en otros casos. A este respecto y en el marco de cada ciclo ha de amplificarse el grupo seleccionado de ácidos nucleicos. La segregación de los ácidos nucleicos enlazantes respecto del blanco en cada uno de los ciclos tiene lugar por medio de un desplazamiento específico. Este procedimiento tiene varias desventajas. Primeramente es una desventaja el que, por causa de la cantidad de ciclos necesaria, se requiere una cantidad considerablemente grande tanto de ácidos nucleicos como de moléculas blanco. Por lo demás en el nivel del proceso de desplazamiento se desplazan más ácidos nucleicos (enlazados) de reducida afinidad que ácidos nucleicos de una afinidad superior, con lo cual la dimensión cuantitativa se intensifica en detrimento de los ácidos nucleicos de mayor afinidad en el marco del nivel del proceso de amplificación. La diferencia de las cantidades se sigue intensificando además por el hecho de que en los casos de una afinidad más alta el enlace de los ácidos nucleicos separados a los ligandos empleados en la segregación es comparativamente más fuerte y los ácidos nucleicos de mayor afinidad se encuentran por este motivo menos accesibles para la amplificación. Por lo demás es también una desventaja el que con el aumento de la afinidad de los ácidos nucleicos sea necesaria una concentración logarítmicamente creciente de los ligandos empleados en la segregación. La afinidad obtenida queda, por tanto, limitada por el producto generado por solubilidad de los ligandos empleados. Finalmente es una desventaja tener que trabajar en varios ciclos para separar o seleccionar repetidamente los ácidos nucleicos ya seleccionados en un ciclo anterior.

En la zona de la separación de no ácidos nucleicos es bien conocida la cromatografía de la afinidad, especialmente en tanto cromatografía en columna (fase sólida/líquida). Se trata a este respecto de un procedimiento destinado al aislamiento o bien al enriquecimiento de hasta el 10^5 y más de proteínas, por ejemplo. Un ligando de la substancia a enriquecer se inmoviliza a este respecto a una matriz cromatográfica. Los enlaces altamente afines primeramente, es decir a la entrada de la columna, se enlazan. Corriente abajo se hacen menos enlaces afines en tanto la cantidad de los enlaces afines es inferior en relación a cada uno de los enlaces concretos a la cantidad de los ligandos que se encuentran en la columna. Los enlaces levemente afines o bien no afines pasan fluyendo separándose de este modo de los enlaces afines. Los enlaces creados, esto es afines, se eluyen y se siguen empleando. En el caso del proceso de desorción inespecífica, por ejemplo en los procesos fisicoquímicos o térmicos, tiene lugar una mezcla de enlaces (conectados) de diferente afinidad. En el caso de la desorción con ligandos de los enlaces conectados (desorción de desplazamiento) es necesario una cantidad molar muy grande de ligando para la segregación, especialmente de los enlaces altamente afines.

Cabe mencionar también que en general el rendimiento de separación deja mucho que desear siempre que la molécula blanco sea pequeña o muy pequeña, por ejemplo de 50 a 10000 Da, especialmente de 70 a 2000 Da, y haya de evitarse una derivatización de la molécula blanco a fin de mejorar el rendimiento de separación. La heterogeneidad estructural de los ácidos nucleicos de una biblioteca de ácidos nucleicos combinatoria dificulta o impide del todo en estos casos la separación de los complejos de ácidos nucleicos/moléculas blanco de los ácidos nucleicos de la biblioteca de ácidos nucleicos no acomplejados por una sencilla desligación linear o tridimensional. De los escritos de H.J. Thiesen *et al*., Nucleic Acids Research 18:3203-3209 (1990) y US-A-5707796, se conocen procedimientos para la selección de ácidos nucleicos enlazantes a una molécula blanco con alta afinidad.

Problemas técnicos del invento

El invento adolece del problema técnico consistente en haber de indicar un procedimiento para la selección de ácidos nucleicos de enlace altamente afín a una molécula blanco que suministre menos trabajosamente ácidos nucleicos

altamente afines, especialmente frente a moléculas blanco muy pequeñas y ello, a saber, sin que sea necesaria una derivatización de la molécula blanco misma.

Características esenciales del invento

Con vistas a la solución de este problema el invento muestra un procedimiento según la reivindicación número 1.

En tanto proceso fisicoquímico se tienen en cuenta especialmente: la electroforesis (por ejemplo la electroforesis capilar, la electroforesis de cama plana, la electroforesis horizontal) y los procedimientos cromatográficos (por ejemplo, la cromatografía de sólidos y líquidos, la cromatografía de líquidos y líquidos, la electrocromatografía capilar). Los métodos en detalle y reacciones a seleccionar a este respecto han de ser constatados por el especialista sin dificultad tras determinación de la molécula blanco y/o de los ácidos nucleicos. Con el proceso de separación fisicoquímico tiene lugar una separación de la mixtura de substancias aplicada en fracciones, respecto de lo cual cabe añadir que a cada fracción se le asigna un parámetro de curso o una ventana de parámetro de curso. En tanto parámetros de curso se tienen en cuenta, por ejemplo, el tiempo y/o el trayecto. Con una ventana de parámetro de curso se denomina un valor inicial y un valor final del parámetro de curso dentro del cual se obtiene una fracción. Una fracción puede contener una a varias especies de ácido nucleico. Con mezcla de enlace se denomina una mezcla de diversos ácidos nucleicos y moléculas blanco. El concepto de la desligación bidimensional se relaciona a la aplicación subsiguiente del mismo proceso de separación por una parte de los ácidos nucleicos y por otra de los complejos. Esto queda también claramente ilustrado en el marco de los ejemplos de realización.

Tan sólo se puede emplear una sola especie de moléculas blanco si bien pueden emplearse también diversas especies definidas o indefinidas. La solución de los ácidos nucleicos y de las moléculas blanco tiene lugar en los búferes habituales como, por ejemplo, búferes triples o búferes de acetato. Con mezcla de ácidos nucleicos se denominan las bibliotecas de ácidos nucleicos con una cantidad típica de especies de ácidos nucleicos diferentes entre sí de 10^6 hasta 10^{22}/Mol, especialmente de 10^6 a 10^{21}/Mol. En una biblioteca empleada se encuentra estadísticamente representada cada especie de ácido nucleico por ejemplo con una cantidad de 10 a 10^{17}, especialmente de 10 a 10^{13} moléculas. El enlace de los ácidos nucleicos a las moléculas blanco tiene lugar preferentemente en condiciones que se corresponden a una posterior aplicación de los ácidos nucleicos mismos, es decir, por ejemplo en un búfer que se ha ajustado correspondientemente en relación a la temperatura, la intensidad iónica, el valor pH y las condiciones del búfer. El agente disolvente de la biblioteca de ácidos nucleicos ha de seleccionarse entonces de acuerdo a sus componentes. Lo mismo ha de tenerse en cuenta respecto del agente disolvente en el cual se disuelven las moléculas blanco.

El invento se basa en el sorprendente conocimiento de que el enlace de una molécula blanco a un ácido nucleico muestra una influencia sobre el comportamiento del ácido nucleico mismo en un proceso de separación fisicoquímico. Esta influencia es tanto mayor cuando mayor sea la constante de afinidad del enlace, esto es, cuanto más resistente sea el enlace entre los ácidos nucleicos y la molécula blanco. El invento es apropiado especialmente para la selección de ácidos nucleicos frente a moléculas blanco no modificadas de reducidas dimensiones, por ejemplo de 50 a 10000 Da, especialmente de 70 a 2000 Da, pues una modificación química de moléculas blanco de muy reducidas dimensiones dificulta o hace imposible la selección de ácidos nucleicos afines a la molécula blanco no modificada.

Además los artefactos de selección subsiguientes en detrimento de los ácidos nucleicos de más alta afinidad se evitan. Tampoco se necesitan ligandos, a lo cual cabe mencionar especialmente las altas concentraciones de ligandos con vistas a la desorción. Finalmente se dispone con vistas a una amplificación de prácticamente todas las moléculas de ácidos nucleicos enlazadas y luego en estado de desorción. Esto permite trabajar con concentraciones muy ligeras de ácido nucleico. En principio es ya suficiente que en la biblioteca de ácidos nucleicos cada una de las especies se encuentre representada con el promedio estadístico de una molécula.

Los ácidos nucleicos aislados o bien las mixturas de ácidos nucleicos (dicho resumidamente: ácidos nucleicos) producidos según el método relativo al invento pueden emplearse de variadas maneras. Para un empleo concreto semejante es necesario, según se determine la aplicación, simplemente emplazar la molécula blanco seleccionada en el nivel b). Así es posible, por ejemplo, identificar las substancias de marcador características de una enfermedad, determinar por medio del procedimiento relativo al invento los ácidos nucleicos a ellas enlazados con alta afinidad y emplear los ácidos nucleicos así seleccionados en tanto componentes principales en una serie de comprobaciones con vistas a la exploración de las substancias de marcador o bien con vistas a la determinación de la existencia de la enfermedad o del riesgo de llegar a padecerla. Estas series de comprobaciones naturalmente pueden emplearse también en tanto control terapéutico. Los ácidos nucleicos pueden emplearse también para la producción de compuestos farmacéuticos, por ejemplo cuando una inhibición de la substancia de marcador (por enlace del ácido nucleico) haya de tener por consecuencia una disminución o prevención de la enfermedad. Por medio del acomplejamiento de pequeñas moléculas blanco por ácidos nucleicos altamente afines puede obtenerse adicionalmente una mejor evacuación venal, especialmente de blancos no polares. En todo caso por medio de selección de las moléculas blanco también es posible seleccionar los ácidos nucleicos y emplearlos en tanto compuesto farmacéutico que, por medio de la activación de las moléculas blanco apropiadas, estimulen en un organismo la formación de las substancias deficientes en relación a la enfermedad al caso concreto. Seleccionando las moléculas blanco apropiadas pueden encontrarse también ácidos nucleicos, por ejemplo, que en tanto substancias activas influyan en la diferenciación y/o estimulo o supresión de células aisladas (por ejemplo células sanguíneas como las células T, como los granulocitos, los monocitos o los trombocitos). Puede surtirse el mismo efecto en relación a células en un tejido, por ejemplo en el marco de la ingeniería de tejidos. Finalmente los ácidos nucleicos seleccionados según el procedimiento relativo al invento pueden emplearse, por ejem-

plo, en una matriz de afinidad en tanto fase inmóvil (por ejemplo aféresis) o bien con vistas a la desorción específica de substancias de una matriz de afinidad.

Un aspecto esencial del invento es la selección de ácidos nucleicos enlazantes a moléculas blanco de muy reducidas dimensiones, pues éstos pueden envolver suficientemente las moléculas blanco y, por ende, evitar la eliminación de éstas, por ejemplo, de la circulación sanguínea.

Formas de aplicación preferentes del invento

Tras el nivel c) se lleva las más veces a cabo el nivel de proceso de separación d), en el cual los ácidos nucleicos de complejos de ácidos nucleicos y moléculas blanco seleccionados se separan de las moléculas blanco. Tras el nivel b) o en su caso tras la disociación que tiene lugar en el nivel c) del complejo obtenido de ácidos nucleicos y moléculas blanco puede llevarse a cabo una amplificación por medio, por ejemplo, de PCR, RT-PCT o LCR.

Una disociación (en un nivel de proceso de separación) del complejo de ácido nucleico y molécula blanco obtenido con el método subyacente al invento puede tener lugar, por ejemplo, por medio del desplazamiento con ligando suficientemente fuerte, modificación, acomplejamiento y/o una destrucción de la molécula blanco de modo fisicoquímico o térmico. También los procesos mecánicos, como por ejemplo el ultrasonido, pueden emplearse para la disociación o intensificación de la disociación. Se parte de que los ácidos nucleicos no deben descomponerse por la acción del proceso de disociación empleado. Preferentemente se lleva a cabo la disociación no específica por medio de los procedimientos habituales fisicoquímicos o térmicos. La disociación térmica tiene lugar por medio del calentamiento de la solución obtenida. El calentamiento puede llevarse a cabo, por ejemplo, por medio de calentador eléctrico, radiación de microondas o rayos infrarrojos. Especialmente son apropiadas las técnicas de calentamiento procedentes de la PCR.

La disociación no específica puede apoyarse por medio de modificación química del blanco (por ejemplo de la oxidación con peryodato sódico o semejante) o bien por medio de formación de complejo no específico como, por ejemplo, por medio de borato o semejante a fin de bloquear formaciones cis trans-diol en hidratos de carbono. Es especialmente preferible que la disociación no específica por medio de disociación térmica se lleve a cabo a través de una fase preferentemente prolongada de alta temperatura en un PCR o RT-PCR. A este respecto se obtiene un efecto sinergético ya que, por regla general, especialmente en los trabajos con bibliotecas de ácidos nucleicos con bajas concentraciones de especies de ácidos nucleicos es necesario de todos modos llevar a cabo una amplificación. Los ácidos nucleicos obtenidos (tras la disociación) pueden amplificarse fácilmente y sin acoplamientos perturbadores de ligandos.

Para aumentar el rendimiento se trabaja en la amplificación, PCR, RT-PCR, LCR o semejante, por ejemplo con una cantidad de 5 a 60 ciclos, preferentemente de 20 a 60 o, idealmente, de 45 a 55. En el marco de la amplificación puede trabajarse con al menos un iniciador marcado. El iniciador puede presentar al menos una intersección de endonucleasa. Una intersección o interfaz de este tipo tiene el cometido, por ejemplo, de liberar al producto amplificado de grandes zonas de la secuencia del iniciador. Las moléculas que forman parte de los nucleótidos, bien se encuentren en el iniciador o en los ácidos nucleicos a seleccionar, puede marcarse, por ejemplo, por medio de pigmentos fluorescentes. En tanto pigmentos fluorescentes pueden nombrarse a modo de ejemplo: Alexa Fluor 488, fluor 532, fluor 546, fluor 568, fluor 594, Oregon Green 488, flouresceína, rodamina 6G, tetrametilo-rodamina, rodamina B y Texas Red. El producto amplificado también puede marcarse en diversos extremos por medio de dos modificaciones químicas diferentes siempre que los grupos introducidos con motivo de la modificación sean susceptible de ser enlazados en tanto ligandos respectivamente a una matriz de afinidad diferente.

Es preferible que los ácidos nucleicos se funcionalicen con vistas al proceso de separación fisicoquímico. Si en tanto proceso fisicoquímico se emplea, por ejemplo, un método electroforético, pueden dotarse a los ácidos nucleicos (de diversas especies) de un grupo portador de carga eléctrica.

En adelante el invento se ilustrará en mayor detalle partiendo de ejemplos de realización no limitantes.

Ejemplo número 1

Selección por medio de proceso de separación de curso de trayecto

Una biblioteca de ácidos nucleicos generada de modo convencional se aplica en geles apropiados como, por ejemplo, gel de agarosa. Tras el calentamiento con vistas al fundido de ácidos nucleicos que acaso presenten dos cadenas se separa a 4ºC electroforéticamente y ello, a saber, en una dimensión espacial, el curso del trayecto. Entonces el gel se corta a tiras en paralelo a la dirección del curso y las tiras se incuban con moléculas blanco. Una tira con complejos así obtenida se coloca en un segundo gel de agarosa semejante y por medio de un método mecánico y/o fisicoquímico se ponen los complejos de la tira en el segundo gel. Entonces bajo las mismas condiciones se vuelve a hacer una separación electroforética a lo cual la dirección del curso es ortogonal respecto del trayecto longitudinal de la tira colocada, es decir, en una segunda dimensión espacial. Los ácidos nucleicos que no hayan generado ningún complejo se encuentran entonces en el segundo gel en diagonal. El segundo gel se corta en tiras cuya prospección longitudinal es ortogonal respecto del de las tiras colocadas. De una tira del segundo gel obtenida de este modo se secciona aquella

zona que se corresponda a la imagen del trayecto de la parte correspondiente a la tira de la tira colocada. El resto de la tira se colecta y se somete a un nivel de procedimiento de disociación así como a un nivel de procedimiento de amplificación.

Ejemplo número 2

Selección por medio de proceso de separación cronológica

La biblioteca de ácidos nucleicos producida de un modo convencional se aplica en una HPLC apropiada. Entonces se lleva a cabo la división de los ácidos nucleicos en una dimensión temporal, la duración operacional colectando fracciones en ventanas cronológicas definidas. Una de estas fracciones se incuba entonces con una molécula blanco de manera apropiada. Las fracciones incubadas se vuelven a separar entonces bajo las mismas condiciones, es decir en una segunda dimensión temporal. De las fracciones así obtenidas de la segunda HPLC se eliminan aquellas cuya duración operacional se corresponda con la duración operacional de la abandonadas. Las fracciones restantes de la segunda HPLC se colectan y se someten a un nivel de procedimiento de disociación así como a un nivel de procedimiento de amplificación. De modo correspondiente se lleva a cabo con todas las fracciones las primeras HPLC.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la selección de ácidos nucleicos de enlace altamente afín a una molécula blanco y una mixtura de ácidos nucleicos con las siguientes fases de procedimiento:

a) la mixtura de ácidos nucleicos se somete a un proceso de separación fisicoquímica con lo cual se obtiene un grupo de fracciones de mixtura de ácidos nucleicos y a cada una de las fracciones de mixtura de ácidos nucleicos se le asigna una ventana de parámetro cronológico o de duración operacional,

b) las fracciones de mixtura de ácidos nucleicos contactan a su vez con las moléculas blanco con lo cual se obtienen mixturas de enlaces con complejos de ácidos nucleicos/moléculas blanco,

c) las mixturas de enlace del nivel b) se someten a su vez al mismo proceso de separación fisicoquímica del nivel a) y se seleccionan entonces los complejos de ácidos nucleicos/moléculas blanco cuyos parámetros de operación se encuentran fuera de la ventana de parámetro operacional correspondiente.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el cual tras el nivel c) se lleva a cabo un nivel de proceso de separación d) en el cual los ácidos nucleicos de los complejos de ácidos nucleicos/moléculas blanco se separan de las moléculas blanco.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2 en el cual los ácidos nucleicos seleccionados se amplifican.