



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 277 588**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

C07H 3/00 (2006.01)

C07G 3/00 (2006.01)

C12P 7/58 (2006.01)

B01J 19/00 (2006.01)

C07B 61/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00903956 .1**

86 Fecha de presentación : **17.02.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1153298**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.11.2001**

54 Título: **Bibliotecas combinatorias de hidratos de carbono complejos y métodos para la producción y usos de las mismas.**

30 Prioridad: **17.02.1999 US 251298**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.07.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.07.2007

73 Titular/es: **Glycominds Ltd.**
Migdal Halevanon Street 28
Modiin 71700, IL

72 Inventor/es: **Dukler, Avinoam y**
Dotan, Nir

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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 combinatorias de hidratos de carbono complejos y métodos para la producción y usos de las mismas.

5 La presente invención se refiere a una biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable producida enzimáticamente *in situ* según la reivindicación 1, un método de producción de una biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 27, un método de identificación de un hidrato de carbono según la reivindicación 29, un método de identificación de glicomarcadores según la reivindicación 32.

10 La presente invención se refiere a bibliotecas combinatorias de hidratos de carbono complejos y métodos para la fabricación y uso de las mismas y, más particularmente, a bibliotecas de este tipo preparadas sobre un soporte sólido por medio de síntesis enzimática por etapas, para proporcionar así una serie combinatoria de estructuras de hidratos de carbono complejos. Las bibliotecas combinatorias de hidratos de carbono complejos sintetizadas según la presente invención pueden aprovecharse de muchas maneras, incluyendo, pero no limitándose a, (i) identificación de fármacos de hidratos de carbono complejos; (ii) identificación de proteínas o receptores asociados a hidratos de carbono complejos como posibles nuevas dianas relacionadas con hidratos de carbono para farmacoterapia; (iii) identificación de hidratos de carbono complejos biológicamente activos; (iv) identificación de elementos específicos de hidratos de carbono estructurales complejos como posibles nuevas dianas para farmacoterapia; (v) identificación de sitios activos de estructuras conocidas de hidratos de carbono complejos; (vi) identificación de nuevos glicomarcadores en estructuras de hidratos de carbono complejos; y (vii) detección de anticuerpos formados frente a un glicoepítipo relacionado con cáncer o glicoantígenos relacionados con otras enfermedades.

Descubrimiento de fármacos

25 La investigación y desarrollo farmacéutico modernos se establecieron con la transición desde la medicina popular hasta el descubrimiento y aislamiento de medicamentos usando la química moderna. Desde los años 1950, el descubrimiento de fármacos se centraba en someter a prueba grandes números de compuestos candidatos en una variedad de modelos animales, en un esfuerzo por identificar compuestos farmacéuticamente activos. Como tal, el descubrimiento de nuevos candidatos a fármaco necesitaba la selección de diversas fuentes de compuestos para posibles actividades terapéuticas. Estas fuentes incluían, por ejemplo, fármacos y compuestos químicos conocidos para los que se buscaron actividades terapéuticas novedosas, caldos de fermentación y compuestos excretados y/o extraídos de plantas u organismos marinos, etc. (Granellin, 1992).

35 Durante los años 1970 y 1980, los avances en los campos de la bioquímica, biología molecular, biología celular y biología estructural (y funcional) han conducido a un mejor entendimiento de los procesos bioquímicos y moleculares que conducen al desarrollo y la progresión de diversas enfermedades. Esto, a su vez, ha conducido al desarrollo de ensayos de selección primaria basados en proteínas, que sustituyen a los métodos de selección que consumen más tiempo y son más difíciles para seleccionar los candidatos a fármaco en modelos animales (Nicholls, 1991).

40 Además, los avances en la cristalografía de rayos X y la química computacional, arrojaron nueva luz sobre los procesos físicos que gobiernan los acontecimientos de interacción y reconocimiento molecular de los receptores y sus ligandos, conduciendo al desarrollo de lo que se conoce como el enfoque de “diseño racional de fármacos” (Hendrickson, 1991).

45 Entendiendo la estructura tridimensional de péptidos y proteínas, y teniendo la capacidad de manipular tales estructuras, las técnicas tanto prácticamente a través de la modelización molecular como las físicamente a través de la clonación molecular conducen a los investigadores al desarrollo de nuevos candidatos a fármaco.

50 Desafortunadamente, debido a la necesidad de personal muy altamente cualificado y dedicado y equipo complejo, el “diseño racional de fármacos” ha fallado en proporcionar a los investigadores la herramienta de diseño de fármacos que habían esperado. (Jacobs, 1994).

55 Como tal, en los primeros años 1990, las empresas farmacéuticas y de biotecnología líderes se volvieron hacia la robótica y la automatización en un intento de complementar el enfoque del “diseño racional de fármacos”. La automatización permitió un enfoque de “secuenciación aleatoria (shotgun)” para el descubrimiento de fármacos, permitiendo la selección rápida de cientos de miles de compuestos para determinar las actividades biológicas deseadas. El nuevo enfoque incorporaba (i) la combinatoria como fuente de compuestos novedosos; (ii) la genómica como fuente de dianas novedosas; y (iii) la selección de alto rendimiento (HTS, “high throughput screening”), como método para seleccionar de manera cruzada diversos compuestos/dianas. Como resultado, el enfoque “de secuenciación aleatoria” permitió que los investigadores ignoraran los obstáculos técnicos asociados con el enfoque previo y se centraran en temas tales como “¿Qué hacer?” o “¿Cuánta diversidad se requiere para producir un resultado positivo?” (Hogan Jr., 1997).

Bibliotecas combinatorias

65 En la búsqueda de candidatos a fármaco novedosos, los investigadores querían complementar los compuestos naturales existentes que se han seleccionado extensamente, con un grupo novedoso y diversificado de moléculas que no se encuentran en la naturaleza. Como tal, las bibliotecas combinatorias de compuestos novedosos recién sintetizados que

comprenden secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos, se sintetizaron y seleccionaron para determinar posibles candidatos a fármacos. Las bibliotecas combinatorias de tales compuestos novedosos o de dianas novedosas pueden clasificarse en tres categorías principales.

La primera categoría se refiere a la matriz o plataforma sobre la que se presenta y/o se construye la biblioteca (Blondelle, 1996). Como tal, las bibliotecas combinatorias pueden proporcionarse (i) sobre una superficie de un soporte sólido químico, tal como micropartículas, perlas o una plataforma plana; (ii) presentarse mediante una fuente biológica (por ejemplo, bacteria o fago); y (iii) estar contenidas dentro de una disolución. Además, las estructuras tridimensionales de diversas moléculas combinatorias generadas por ordenador pueden seleccionarse por medio de métodos computacionales (Gaasterland, 1998).

Además, las bibliotecas combinatorias pueden clasificarse según el tipo de moléculas representadas en la biblioteca, que puede incluir, (i) moléculas químicas pequeñas; (ii) ácidos nucleicos (ADN, ARN, etc.); (iii) péptidos o proteínas; y (iv) hidratos de carbono.

La tercera categoría de las bibliotecas combinatorias se refiere al método mediante el cual se sintetizan los compuestos o dianas, normalmente una síntesis de este tipo se efectúa mediante: (i) síntesis química *in situ* (Borman, 1996); (ii) síntesis *in vivo* por medio de clonación molecular (Kenan, 1994); (iii) biosíntesis *in vitro* mediante enzimas o extractos purificados de microorganismos (Michels, 1998); y (iv) *in silico* mediante algoritmos informáticos dedicados (Sansom, 1997).

Las bibliotecas combinatorias puestas como ejemplo mediante cualquiera de los métodos de síntesis anteriores pueden caracterizarse además mediante: (i) modos de síntesis paralela o separada; (ii) complejidad y tamaño de las moléculas; (iii) tecnología de la selección; y (iv) grado de automatización en la preparación/selección.

En el método de síntesis separada, se divide una biblioteca combinatoria que se sintetiza, por ejemplo, sobre una superficie de micropartículas o perlas, en grupos en los que se une un primer bloque estructural de síntesis único a las perlas. Entonces se combinan los grupos de perlas y se separan para formar nuevos grupos de diversidad única, después se añade el siguiente bloque estructural, y se repite el proceso hasta que se consigue la complejidad deseada. En el método de síntesis paralela, cada uno de los compuestos de la biblioteca combinatoria se sintetiza por separado, en una disolución o se inmoviliza a una matriz, requiriendo un régimen de síntesis único e independiente para cada uno de los compuestos de la biblioteca.

La complejidad de las moléculas en una biblioteca combinatoria depende de la diversidad de los bloques estructurales primarios y las posibles combinaciones de los mismos. Además, varios parámetros adicionales también pueden determinar la complejidad de una biblioteca combinatoria. Estos parámetros incluyen (i) el tamaño molecular del producto de síntesis final (por ejemplo, oligómero o molécula química pequeña); (ii) el número de enlaces que se crean en cada etapa de síntesis (por ejemplo, un enlace frente a varios enlaces específicos al mismo tiempo); (iii) el número de distintas etapas de síntesis empleadas; y (iv) la complejidad estructural del producto final (por ejemplo, moléculas lineales frente a ramificadas).

Las bibliotecas combinatorias pueden sintetizarse a partir de varios tipos de moléculas primarias, incluyendo, pero no limitándose a, ácidos nucleicos y aminoácidos e hidratos de carbono. Debido a la complejidad del tipo de enlace sencillo inherente, la síntesis de bibliotecas combinatorias de ácidos nucleicos y aminoácidos normalmente sólo necesita un tipo de reacción de síntesis. Por otro lado, debido a la complejidad del tipo de enlace inherente, la síntesis de bibliotecas combinatorias de hidratos de carbono complejos necesita una pluralidad de distintas reacciones de síntesis.

Por tanto, la simplicidad y la repetición de polímeros tanto de ácidos nucleicos como de aminoácidos, permiten un método de síntesis relativamente simple para obtener una biblioteca combinatoria de constituyentes de este tipo. Por otro lado, puesto que los oligosacáridos son estructuralmente mucho más complejos, las bibliotecas combinatorias de hidratos de carbono complejos son difíciles de sintetizar. Como resultado, las bibliotecas combinatorias de hidratos de carbono sintetizadas hasta la fecha, son de muy baja complejidad y normalmente incluyen moléculas de hidratos de carbono complejos que consisten en no más de tres constituyentes de bloque estructural.

La evolución de las bibliotecas combinatorias de ácidos nucleicos y aminoácidos ha necesitado la utilización de técnicas de selección que sacan partido de la naturaleza única de las bibliotecas de este tipo, de tal modo que puede efectuarse la selección rápida de bibliotecas diversificadas.

Por ejemplo, con el fin de identificar interacciones específicas entre una "sonda" y un constituyente de la biblioteca, puede construirse una biblioteca de tal modo que se conoce o controla la identidad y posición de cada constituyente individual en la fase de síntesis. Las bibliotecas de este tipo se conocen como bibliotecas direccionables. Usando el proceso de fotolitografía, pueden producirse bibliotecas sintetizables de manera paralela, espacialmente direccionables, dirigidas por luz de péptidos u oligonucleótidos (Ramsay, 1997). Además, se usan series microfabricadas de cámaras de reacción cerradas con sistemas microfluidos para síntesis de "laboratorios en un chip" ("Lab on a chip") de bibliotecas direccionables químicas o de oligonucleótidos (patentes de los EE.UU. números 5.643.738; 5.681.484; y 5.585.069, que se incorporan en el presente documento como referencia). Utilizar tal tecnología direccionable permite la determinación, durante la síntesis, de la naturaleza y la posición de los constituyentes de la biblioteca.

En comparación, las bibliotecas que se sintetizan empleando el enfoque “una perla-una molécula” (“one bead-one molecule”), en el que se crea la diversidad mediante una síntesis de separación y combinación (“split-and-pool”), se seleccionan usando sondas conjugadas a un resto detectable, por ejemplo una molécula fluorescente o una enzima, de tal modo que pueden identificarse, aislarse y analizarse las perlas que interaccionan con una sonda marcada para obtener la composición (Schullek, 1997).

Puesto que los métodos de selección de este tipo consumen mucho tiempo, el enfoque de bibliotecas marcadas con etiqueta ha evolucionado principalmente para su uso con bibliotecas creadas mediante el método de separación y combinación. Para acelerar el análisis de la molécula aislada de interés, el enfoque de bibliotecas marcadas con etiqueta combina la síntesis de miembros de la biblioteca con la síntesis paralela ortogonal de patrones de bloque estructural marcados con etiqueta (Janda, 1994; Chabala, 1995) o dispositivos de memoria marcados con etiqueta por radiofrecuencia (Borman, 1996).

Con el fin de seleccionar grandes series, se utilizan equipos robóticos y de miniaturización en ensayos de selección de alto rendimiento (HTS). En el pasado, los ensayos HTS fueron básicamente ensayos de laboratorio ampliados a escala. Como tal, y dependiendo de la diversidad de las moléculas seleccionadas, la adaptación de un ensayo relativamente simple a HTS implicaba la miniaturización y automatización del manejo de líquidos, de tal modo que puede seleccionarse un gran número de moléculas independientes de manera relativamente rápida. En la actualidad, se desarrollan y se ponen en práctica enfoques más integrados para HTS. Estos enfoques se denominan como “ultra-tecnologías” (UT, Sittampalam, 1997) o “nuevas tecnologías” (NT, Burbaum, 1997). Las metodologías HTS de este tipo varían entre los métodos de síntesis paralela o de separación y combinación. En el método de síntesis de separación y combinación, se usan las micropartículas tanto para la síntesis como para la selección mediante tratamiento previo con reactivos de ensayo (Stinson, 1998). La mejora de los métodos de síntesis paralela necesita la miniaturización adicional de la matriz de soporte (Cargill, 1997). Por ejemplo, si se someten a prueba 10^6 compuestos frente a 200 sondas cada año, esto se traduce en 2×10^8 ensayos. Si se emplean tales ensayos a un volumen de pocillo de $100 \mu\text{l}$ cada uno, conteniendo $10 \mu\text{l}$ del compuesto de prueba de un peso molecular aproximado de 500 g/mol , se requerirán aproximadamente dos millones de placas de microtitulación de 96 pocillos, 20.000 litros de cada disolución diana y 100 gramos de cada uno de los compuestos.

Por consiguiente, se han propuesto nuevas tecnologías para la miniaturización de la matriz de soporte. Las tecnologías de este tipo se dividen en formatos de recipiente abierto y cerrado. La tecnología del recipiente abierto mantiene la compatibilidad con las placas de 96 pocillos habituales y sigue una serie geométrica de $N = n^2 \times 96$, en la que N es el número de pocillos, y n es un número entero que describe la densidad de empaquetamiento posible de una serie rectilínea. Siguiendo este razonamiento, el punto de equilibrio entre una limitación del volumen de microlitros y una densidad de empaquetamiento adecuada se consigue mediante una placa con 1.536 pocillos ($n = 4$) que tiene un volumen de pocillo de $1\text{-}2 \mu\text{l}$.

La selección de series más grandes requiere la reducción adicional del volumen de pocillo hasta cantidades de nanolitros, que además necesita el uso del formato de recipiente cerrado para evitar la evaporación. Usando técnicas de fabricación, que fueron las primeras en aplicarse en la industria de semiconductores, pueden efectuarse la síntesis y el análisis de volúmenes de reacción de nanolitros, de tal modo que una única oblea de silicio de cuatro pulgadas cuadradas puede soportar 10^5 síntesis y reacciones de bioensayo separadas (Cheng, 1998).

Los métodos de preparación de las bibliotecas combinatorias de moléculas orgánicas pequeñas sintetizadas químicamente, tales como ácidos nucleicos (ADN, ARN y ARN antisentido), péptidos y biomiméticos de péptidos, tales como peptoides y semipeptoides, etc., están ahora bien establecidos en la técnica y como tal se han demostrado las tecnologías en la mayoría de las divisiones y categorías anteriores (véase la tabla 1 de a continuación).

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Clasificación de bibliotecas combinatorias

Categoría	Moléculas químicas pequeñas	Ácidos nucleicos	aminoácidos	ates
Plataforma				
Disolución	+	+	+	+
Soporte químico	+	+	+	+
Soporte biológico	+	+	+	-
Ordenador	+	+	+	-
Síntesis				
Sintetizado químicamente	+	+	+	+
In vivo por medio de biología molecular	-	-	+	-
In vitro por medio de	+	+	+	-

	síntesis				
	enzimática				
5	<i>In silico</i> por	+	+	+	-
	medio de				
10	algoritmo				
	informático				
	Modo de				
15	combinatoria				
	Separación y	+	+	+	+
	combinación				
20	Paralela	+	+	+	-
	Complejidad				
	Bajo peso	+	+	+	+
25	molecular				
	Oligómero (alto	-	+	+	+
30	peso molecular)				
	Un enlace a la	+	+	+	+
	vez				
35	Varios enlaces	+	-	-	-
	a la vez				
	Un tipo de	+	+	+	+
40	reacción				
	Varios tipos de	+	-	-	-
	reacción				
45	Oligómero	-	+	+	+
	lineal				
	Una	+	-	-	+
50	ramificación en				
	la molécula				
55	Moléculas	+	-	-	-
	altamente				
	ramificadas				
60	Métodos de				
	selección				
	Aislamiento y	+	+	+	+
65					

	análisis				
5	Codificado	+	+	+	+
	Espacialmente	+	+	+	-
	direccionable				
10	Automatización				
	a) bibliotecas				
	de				
15	micropartículas				
	Tratamiento	+	+	+	+
20	previo de las				
	perlas con el				
	ensayo de				
25	selección				
	Etiquetas por	+	+	+	-
	radiofrecuencia				
30	b) series				
	direccionables				
	Basadas en 96	+	+	+	-
35	pocillos				
	HTS-NT	+	+	+	-
	Legenda: +: disponible; -: no disponible				

A pesar de la abundancia de hidratos de carbono en la naturaleza y su papel importante en muchos procesos biológicos, no se han demostrado bibliotecas de hidratos de carbono complejos y altamente diversificados (Borman, 1996). Además, aunque hace casi 30 años que se propuso la síntesis química en fase sólida de productos con enlaces glicosídicos (Frechet, 1971, 1972; Guthrie, 1971), la síntesis química de bibliotecas combinatorias de hidratos de carbono sólo se ha demostrado en los últimos años, y debido a las limitaciones de la síntesis química tal como se detalla adicionalmente más adelante en el presente documento, las bibliotecas de este tipo constituyen series bastante simples de constituyentes de trisacárido no marcados con etiqueta solubles.

Hindsgaul y colaboradores demostraron un enfoque químico de "glicosilación aleatoria" para la síntesis de bibliotecas que implica acoplar el donador de glicosilo protegido con un aceptor de azúcar que contiene 3-5 hidroxilos libres, para producir una mezcla de 6 a 8 productos de hidrato de carbono distintos (Kanie, 1995). Según este método, tras una etapa de glicosilación, se eliminan los grupos protectores, y entonces se separan los productos acoplados de los bloques estructurales de monosacárido iniciales por medio de cromatografía en fase inversa.

Boons y colaboradores informaron de un enfoque de síntesis química algo más directa. Para garantizar la formación de enlaces glicosídicos regioespecíficos, sintetizaron diez aceptores de disacárido protegidos que contenían cada uno un grupo hidroxilo libre. Cada aceptor protegido se hizo reaccionar por separado con un donador de glicosilo para formar 32 disacáridos definidos. Entonces, se mezclaron los productos de disacárido, se empleó un procedimiento de desprotección y se separó la mezcla en cuatro subgrupos. Entonces se hizo reaccionar cada subgrupo con un donador diferente para obtener cuatro bibliotecas, conteniendo cada una 64 trisacáridos. Finalmente, se separaron los productos mediante un tedioso procedimiento de cromatografía de exclusión por tamaños (Boons, 1996).

La síntesis química de una biblioteca combinatoria de hidratos de carbono sobre un soporte sólido se demostró por Kahne y colaboradores (Liang, 1996). La patente de los EE.UU. n° 5.700.916 enseña, a este respecto, una biblioteca de hidratos de carbono que consiste en 1300 di y trisacáridos marcados con etiqueta. Se sintetizó esta biblioteca usando el enfoque de separación y combinación acoplando 12 donadores de glicosilo diferentes a seis aceptores dife-

rentes unidos a polímeros empleando métodos de glicosilación que incorporan sulfóxido anomérico como donador de glicosilo.

También se describieron métodos químicos de preparación de bibliotecas combinatorias de hidratos de carbono por otros grupos de investigación varios (Rademann, 1996; Rodebaugh, 1997; Liang 1997, revisado por Kahne, 1997; Arya, 1997, documento WO 97/34623; documento WO 97/35202; documento WO 98/08799; documento WO 98/40410; y la patente de los EE.UU número 5.780.603). Los métodos anteriores describen bibliotecas de hidratos de carbono preparadas químicamente en las que los constituyentes de hidratos de carbono se unen a un resto que no es azúcar por medio de un enlace glicosídico, o alternativamente constituyentes de hidratos de carbono de baja complejidad estructural tales como cadenas polivalentes de longitud uniforme ditetrasacáridos con de 0-1 ramificaciones.

Más recientemente, un mimético de oligosacárido sintético demostró poder sustituir a los enlaces glicosídicos por enlaces de amida, formando así “carbopeptoides” (Nicolaou, 1995) y “glucótidos” (McDevitt, 1996), o con enlaces fosfodiéster, formando así los “carbonucleótidos” (Nicolaou, 1995). Aunque estas formas miméticas de sacárido son estructuralmente más complejas que los hidratos de carbono previamente sintetizados, sus niveles de complejidad están lejos de los de los hidratos de carbono que se producen naturalmente (por ejemplo, véase la figura 1).

Wong y colaboradores (Wong, 1998) sintetizaron químicamente bloques estructurales de núcleo con cuatro grupos protectores diferentes que pueden eliminarse de manera selectiva, para obtener un mimético de pentasacárido con cuatro enlaces glicosídicos ortogonales.

Aunque se han sintetizado bibliotecas de hidratos de carbono de complejidad limitada usando diversos métodos químicos, no se ha producido todavía una biblioteca combinatoria de hidratos de carbono con un alto grado de complejidad estructural que se asemejen a los hidratos de carbono complejos naturales (por ejemplo, estructuras altamente ramificadas). Además, no se ha propuesto ni tratado nunca por la técnica anterior la síntesis de bibliotecas de este tipo usando un enfoque de síntesis paralela direccionable que permitiera la selección rápida de los constituyentes de la biblioteca (véase la tabla 1 anterior).

Esto se debe posiblemente al hecho de que los métodos de síntesis química aún se forman mediante las estrategias clásicas de protección/desprotección selectiva, haciendo que la longitud de la molécula sintetizada sea el principal contribuyente a la complejidad de la misma (Grout, 1998). Se calculó que para englobar todos los posibles isómeros lineales y ramificados de un oligosacárido hexamérico, se necesitarían más de 10^{12} formas estructurales distintas (Laine, 1994). La síntesis de una serie de este tipo no sería práctica mediante un método de síntesis química que utiliza grupos de protección/desprotección selectiva. En un método de este tipo, es inevitable la formación de mezclas de anómeros que inhabilitan o terminan la formación de cadena específica hidratos de carbono dirigida, y como tal es imposible controlar la formación de tales centros anoméricos generados durante la síntesis.

Con el fin de sintetizar bibliotecas combinatorias de hidratos de carbono complejos con alto grado de complejidad y diversidad, deben buscarse métodos de síntesis no químicos alternativos.

Las enzimas son biocatalizadores de alta fidelidad que están en uso frecuente en la síntesis de compuestos orgánicos. Como tal, las enzimas pueden emplearse en un método de síntesis de hidratos de carbono que evite las limitaciones mencionadas anteriormente inherentes a los métodos de síntesis química de la técnica anterior. La síntesis enzimática de enlaces glicosídicos presenta alta estereo y regioselectividad, y como tal, el empleo de enzimas en la síntesis de hidratos de carbono complejos suprime la necesidad de monómeros protegidos e invalida los problemas inherentes a la incorporación de bloques estructurales protegidos de este tipo (Grout, 1998).

La naturaleza emplea cuatro tipos de enzimas para la biosíntesis *in vivo* de enlaces glicosídicos (véase la tabla 2 de a continuación). La división común básica segrega estas enzimas según la ruta de Leloir (Leloir, 1971) y la ruta que no es de Leloir. Las enzimas de la ruta de Leloir son responsables de la biosíntesis de la mayoría de las glicoproteínas unidas a N y O y otros glicoconjugados en sistemas de mamíferos. La ruta de unión a N implica una biosíntesis inicial de un producto intermedio de dolicol-pirofosforil-oligosacárido en el retículo endoplásmico mediante las manosil y N-acetilglucosiltransferasas. Además, esta estructura de oligosacárido experimenta la glucosilación y después se transfiere por medio de una oligosacaridotransferasa a residuos de asparagina de una cadena peptídica creciente (Kornfeld, 1985). Antes del transporte al aparato de Golgi (AG), se eliminan los residuos de glucosa y algunos de manosa por las glicosidasas para revelar un pentasacárido de núcleo. Entonces se añaden secuencialmente monosacáridos adicionales mediante glicosiltransferasas en el AG, en un proceso conocido como glicosilación unida a O, que se inicia en el AG mediante la adición de un monosacárido a serina o treonina por medio de un enlace glicosídico y continua mediante la adición secuencial de monosacáridos (Kornfeld, 1985). Las glicosiltransferasas de la ruta de Leloir utilizan sólo ocho azúcares de nucleósido como donadores de monosacárido para la síntesis de la mayoría de los oligosacáridos (véase la tabla 3 de a continuación).

TABLA 2

Tipos de enzimas que se usan para la síntesis in vivo de enlaces glicosídicos		
Tipo de enzima	Grupo saliente	Referencia
Fosforilasa	-O-PO ₃	Hassid, 1950
Glicosidasa	-OR; F o -OH	Nilsson, 1988
Transglicosidasa	-O-azúcar o -O-R	Schenkman, 1991
Glicosiltransferasa	-O-UDP; -O-GDP; -O-CMP	Hunez, 1980

TABLA 3

Glicosiltransferasas de la ruta de Leloir	
Enzima	Donador
Glucosiltransferasa	Uridindifosfato-glucosa (UDP-Glc)
N-acetilglucosaminiltransferasa	Uridindifosfato-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc)
Galactosiltransferasa	Uridindifosfato-galactosa (UDP-Gal)
N-acetilgalactosaminiltransferasa	Uridindifosfato-N-acetilgalactosamina (UDP-GalNAc)
Manosiltransferasa	Guanidindifosfato-manosa (GDP-Man)
Fucosiltransferasa	Guanidindifosfato-fucosa (GDP-Fuc)
Ácido glucurónico tranferasa	Uridindifosfato-ácido glucurónico (UDP-GlcUA)
Sialiltransferasa	Citosindifosfato-ácido N-acetilneuramínico (CMP-NeuAc)

La ruta que no es de Leloir emplea monosacáridos adicionales, tales como azúcares aniónicos o sulfatados que también se encuentran en células de mamíferos. Una combinación diversa de monosacáridos aún adicionales que no se utilizan en ninguna ruta (por ejemplo, ramnosa y arabinosa; véase la tabla 4 de a continuación) también está presente en microorganismos, plantas e invertebrados (Oths, 1990; Mengling, 1998).

TABLA 4

Monosacáridos presentes sólo en microorganismos y plantas (Gleeson, 1988)	
Monosacáridos encontrados en microorganismos y en plantas, pero no en animales	Monosacáridos encontrados en microorganismos, plantas y en animales
Arabinosa	Glucosa
Apiosa	Galactosa
Fructosa	Manosa
Ácido galacturónico	Fucosa
Ramnosa	Xilosa
Ácido acérico (3-C-carboxi-5-deoxil-xilosa)	N-acetilglucosamina
	N-acetilgalactosamina
	Ácido glucurónico

Se han propuesto dos estrategias principales para la síntesis *in vitro* catalizada por enzimas de oligosacáridos. Según la primera estrategia, se emplean glicosidasas o glicosilhidrolasas en una reacción de hidrólisis inversa (documentos WO 87/05936; WO98/40512; y patente de los EE.UU. número 5.532.147, Nilsson, 1988 y 1996; Watt, 1997), mientras que según la segunda estrategia se emplean glicosiltransferasas en un método de síntesis secuencial (Hunez, 1980; Toone, 1989). Debido a los altos rendimientos y a la especificidad estereo y regioselectiva presentados por la segunda estrategia se considera que es el enfoque preferido (David, 1991; Wong, 1992). La segunda estrategia, que se discute extensivamente en la técnica anterior (véanse por ejemplo, Grout, 1998; Watt, 1997; Ichikawa, 1997; Wong, 1996; patente de los EE.UU. número 5.583.042; y el documento WO 96/32492), se aprovechó para la síntesis de un intervalo muy estrecho de moléculas de oligosacáridos, que oscilaban de desde 2 hasta 5 unidades de tamaño utilizando siete de las ocho especies de monosacáridos de Leloir formadas con sólo 0-1 enlaces de ramificación.

En la naturaleza, el uso en combinación de los cuatro tipos de enzimas (véase la tabla 2 anterior) produce una serie compleja de oligosacáridos. Por otro lado, se registraron muy pocas descripciones de métodos combinados de síntesis enzimática *in vitro* de enlace glicosídico.

Los métodos de este tipo pueden incorporar, en combinación, una glicosidasa y una glicosiltransferasa (β -galactosidasa y una (2,6)-sialiltransferasa) para producir un intervalo estrecho de productos de oligosacáridos (Herrmann, 1993; Nilsson 1988). Alternativamente, también puede usarse una transglicosidasa en combinación con las enzimas anteriores (por ejemplo, trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi*, Schenkman, 1991). También se ha descrito ya en los años 50, la utilización de la fosforilasa para transferir un donador de 1-fosfato de azúcar a 2-ceto-azúcares (Hassid, 1950) pero no se continuó más esta estrategia.

La síntesis enzimática de hidratos de carbono complejos sobre un soporte sólido se propuso por primera vez en los años 80 por Zehavi *et al.* (1983 y 1984). Zehavi y los colaboradores unieron una unidad glicosídica a 3-nitrobenzoato de 4-hidroximetilo para crear un ligador fotolábil. Este ligador de sacáridos se acopló a un soporte compatible en agua amino funcionalizado, tal como el polímero de gel de poli(acrilamida o poli(alcohol vinílico)), por medio de un enlace amida (Zehavi, 1984). Entonces, el glicósido unido al polímero se galactosiló usando la 1,4-galactosiltransferasa.

Combinando las etapas de la síntesis química junto con etapa de alargamiento enzimático de la cadena de azúcar, se ha efectuado la síntesis quimioenzimática en fase sólida del antígeno glicopeptídico de Lewis X (Halcomb, 1994; Seitz, 1997), así como la síntesis de un conjugado de asparagina de undecasacárido sialilado, en el que se añadió enzimáticamente el residuo α -2,6 sialilo a un decaacárido sintetizado químicamente (Unverzagt, 1996). Además, también se ha llevado a cabo la síntesis enzimática de un antígeno X de Lewis sialilado sobre un soporte de sílice activada (Schuster, 1994). Este glicopéptido se creó con rendimientos relativamente altos mediante tres etapas de glicosilación enzimática repetitivas que dieron como resultado cuatro unidades de sacáridos unidas en el péptido. También se informó un excelente rendimiento para la síntesis de un glicopéptido por medio de la glicosilación enzimática de un soporte sólido de copolímero de polietilenglicol-poli(acrilamida) (Meldal, 1994).

Hasta la fecha, el descubrimiento de nuevos agentes farmacéuticos derivados de hidratos de carbono todavía se queda muy atrás que el de otras clases de moléculas, tales como las proteínas. Este retraso se atribuye principalmente a la falta de disponibilidad de un método de síntesis eficaz y global aplicable para producir especies de hidratos de carbono complejos y diversos. Puesto que los hidratos de carbono son difíciles tanto para sintetizar como para analizar, no es viable emplear los métodos de la técnica anterior descritos anteriormente para tales tareas.

A pesar de estas limitaciones, se estudiaron extensivamente tres aspectos de la bioquímica y química médica de los hidratos de carbono: (i) interferencia específica con la biosíntesis de la pared celular bacteriana (Mengling, 1998); (ii) marcadores únicos para tumores malignos (Orntoft, 1995; Kobata, 1998); y (iii) participación de los marcadores de oligosacáridos de la superficie celular en la comunicación célula a célula, la adhesión celular, la infección celular y la diferenciación celular (Simon, 1996).

Estos aspectos de la bioquímica y química médica de hidratos de carbono se estudiaron usando especies de hidratos de carbono complejos sintetizados químicamente. Se ha demostrado que los hidratos de carbono complejos sintéticos son una herramienta importante para el desarrollo del campo glicoterapéutico, pero las limitaciones inherentes al proceso de síntesis química y como tal a las diversas bibliotecas combinatorias producidas por los mismos, impiden un progreso significativo en este campo.

Por ejemplo, la base de datos CarbBank (base de datos de estructuras de hidratos de carbono complejos (Complex Carbohydrate Structure Database) CCSD) incluye 48.956 registros (22.048 estructuras únicas) que se derivaron de artículos publicados y se recopilaron por el Georgia University Project-Complex Carbohydrate Research Center (CCRC) (centro de investigación de hidratos de carbono complejos del proyecto de la Universidad de Georgia). Estos hidratos de carbono se agrupan según su complejidad en la figura 2. Más del 58% de las entradas son estructuras moleculares ramificadas que son prácticamente imposibles de sintetizar usando los métodos de síntesis química de hoy día. La figura 3 es un histograma que representa la distribución, en porcentajes, del número de residuos de azúcar presentes en los hidratos de carbono complejos encontrados en la base de datos CarbBank. Aunque el 44% de todos los hidratos de carbono complejos en la base de datos tienen 6 o más residuos, no se ha practicado extensivamente la síntesis química o enzimática de los hidratos de carbono complejos de este tipo, en particular no en el contexto de una biblioteca. Además se agravan las dificultades cuando se desea construir una biblioteca combinatoria de entidades de este tipo, necesitando la síntesis paralela de una multitud de hidratos de carbono complejos. Como tal, es de un reto primordial usar los métodos de síntesis química de hoy día para sintetizar las series combinatorias de entidades de hidratos de carbono complejos direccionables.

Liang *et al.*, "Parallel Synthesis and Screening of a Solid Phase Carbohydrate Library", Science (1996), vol. 2745, pág. 1520-1522, describe una biblioteca de hidratos de carbono en fase sólida sintetizada y seleccionada frente a lectina de *Bauhinia purpurea*. La biblioteca, que contiene aproximadamente 1300 di y trisacáridos, se sintetizó con codificación química en resina TentaGel, de tal modo que cada perla contenía un único hidrato de carbono. Se han identificado dos ligandos que se unen de manera más ajustada a la lectina que Gal- β -1,3-GalNAc (el ligando conocido). Puede usarse la estrategia explicada para identificar los ligandos basados en hidratos de carbono para cualquier receptor; sin embargo, debido a que las perlas derivatizadas imitan la presentación polivalente de los hidratos de carbono de la superficie celular, la selección puede mostrarse especialmente valiosa para el descubrimiento de nuevos compuestos que se unen a proteínas que participan en la adhesión celular.

Schuster *et al.*, "Solid-Phase Chemical-Enzymatic Synthesis of Glycopeptides and Oligosaccharides", J. Am. Chem. Soc. (1994) vol. 116, pág. 1135-1136, describe un sistema en fase sólida que soporta tanto la síntesis química de péptidos como el alargamiento de la cadena de azúcar catalizado por la glicosiltransferasa y que permite la síntesis rápida y la liberación controlada de glicopéptidos. Las reacciones de glicosilación se realizan con buenos rendimientos. El sistema también debe permitir la síntesis de oligosacáridos a medida que el resto peptídico puede retirarse enzimáticamente usando las endoglicosidasas.

El documento US-A-5.763.263 se refiere a un método y a un aparato para producir bibliotecas combinatorias de posiciones direccionables de oligómeros de secuencia diferente o compuestos de moléculas pequeñas de sustituyentes diferentes. El método emplea síntesis paralela masiva mediante la adición de subunidades o la adición de sustituyentes por etapas en una serie densa de tubos capilares. Las bibliotecas permiten la selección con alto rendimiento de compuestos de la biblioteca o bien en fase sólida o bien en fase de disolución, y la identificación relacionada con la posición de compuestos activos de la biblioteca.

El documento WO 95/03315 describe una biblioteca que comprende al menos seis moléculas diferentes que contienen azúcar seleccionadas de (i) hidratos de carbono derivados cada uno de al menos de dos monómeros de sacáridos, e (ii) glicoconjugados. Una biblioteca de este tipo puede comprender disacáridos o trisacáridos lineales o ramificados. Puede prepararse a partir de un compuesto que tiene al menos dos grupos OH que están modificados mediante grupos de bloqueo que pueden retirarse independientemente. Un procedimiento novedoso comprende sintetizar un polisacárido de fórmula azúcar_n, representando n el número de unidades de mono y/u oligosacárido a partir de las cuales puede derivarse el polisacárido, comprende las etapas de acoplar azúcar₂ con un conjugado de fórmula Q-azúcar₁, siendo Q un material polimérico o lipófilo que puede retirarse, en un disolvente para obtener el conjugado; añadir un no disolvente para obtener el conjugado resultante Q-azúcar₁-azúcar₂; repetir dichas etapas n-2 veces, según sea necesario, seleccionar el azúcar que va a acoplarse independientemente cada vez; y retirar Q del conjugado acoplado resultante.

El documento WO 96/36627 se refiere al campo de la química combinatoria de hidratos de carbono e implica la modificación de moléculas orgánicas y/o síntesis de un gran número de productos que comprenden hidratos de carbono y/o entidades glicomiméticas. Más específicamente, la presente invención se refiere a glicósidos de carbón activado útiles para la modificación de moléculas orgánicas mediante la incorporación de unidades de hidratos de carbono, proporcionando la síntesis de un gran número de productos que tienen características químicas novedosas. Además, la presente invención se refiere a métodos para la generación de compuestos químicos que comprenden glicósidos de carbono. Los métodos se describen para proporcionar series de moléculas grandes y para identificar especies que actúan como agonistas o antagonistas de diversas actividades biológicas, químicas y otras.

Wang y Hindsgaul GLYCOIMMUNOLOGY (1998) páginas 219-236; citadas en International Preliminary Examination Report describe la química combinatoria de hidratos de carbono.

Yamada *et al* CARBOHYDRATE RESEARCH (1997) vol. 305, n° 3-4, páginas 443-461, se refiere a soportes poliméricos de alto rendimiento para la síntesis asistida con enzimas de glicoconjugados.

Por tanto, existe una necesidad ampliamente reconocida de, y sería altamente ventajoso tener, métodos para sintetizar y seleccionar bibliotecas combinatorias de hidratos de carbono complejos de diversidad y complejidad estructural sustancial.

La biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable producida enzimáticamente *in situ* se define en la reivindicación 1, el método de producción de una biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable se define en la reivindicación 27, un método de identificación de un hidrato de carbono se define en la reivindicación 29, el método de identificación de glicomarcadores se define en la reivindicación 32.

Según un aspecto de la presente invención se proporciona una biblioteca combinatoria de hidratos de carbono que comprende una pluralidad de estructuras de hidratos de carbono complejos direccionables.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona un método de producción de una biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable, comprendiendo el método las etapas de (a) proporcionar un soporte único sólido plano que tiene una pluralidad de posiciones; y (b) sintetizar enzimáticamente una pluralidad de estructuras de hidratos de carbono, uniéndose cada una de la pluralidad de estructuras de hidratos de carbono al menos a una posición dirigida de la pluralidad de posiciones, produciéndose así la biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable.

Según las características adicionales en las realizaciones preferidas de la invención que se describen a continuación, cada una de las estructuras de hidratos de carbono complejos direccionables se une a un soporte único sólido plano.

Según las características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la unión de cada una de las estructuras de hidratos de carbono direccionables al soporte único sólido plano se efectúa mediante un ligador.

Según las características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el ligador incluye al menos dos enlaces covalentes contiguos.

Según las características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el ligador se selecciona del grupo que consiste en un aminoácido, un péptido, una proteína no glicosilada, un lípido, una ceramida, dolicol fosfato, una ciclodextrina, un oligosacárido, un monosacárido, una cadena alquílica y un ácido nucleico.

Según las características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el ligador es de una longitud de al menos 20 Angstrom.

Según las características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en una plataforma plana direccionable.

Según las características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la plataforma plana se selecciona del grupo que consiste en una placa de microtitulación, una membrana y una chip.

Según las características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la placa de microtitulación es una serie de cámaras de reacción cerradas microfabricadas direccionables, complementadas con sistemas de microfluído. Las cámaras de reacción son preferiblemente de una densidad de 4-25 por cm cuadrado, teniendo cada una un volumen de 50-1000 nanolitros.

Según las características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el soporte sólido es un chip y en la que además se disponen diferentes estructuras de hidratos de carbono de la pluralidad de estructuras de hidratos de carbono direccionables en pequeñas extensiones espaciadas en no más de 2,25 mm centro a centro.

Según las características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el soporte único sólido plano es de una sustancia seleccionada del grupo que consiste en poliestireno reticulado con divinilbenceno, copolímero de

bloque de polietilenglicol - poliestireno, poliamidas, poliacrilamidas, polimetacrilamida, sílice, vidrio, cuarzo, plástico y celulosa.

5 Según las características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas, al menos una de la pluralidad de estructuras de hidratos de carbono direccionables incluye al menos dos unidades de sacáridos contiguos de una única especie.

10 Según las características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas, al menos una de la pluralidad de estructuras de hidratos de carbono direccionables incluye al menos una ramificación.

Según las características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas, al menos una de las al menos una ramificación se forma de un centro idéntico y unidades de sacáridos de ramificación.

15 Según las características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas, al menos una de la pluralidad de estructuras de hidratos de carbono direccionables incluye al menos 5 unidades de sacáridos.

Según las características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la pluralidad de estructuras de hidratos de carbono direccionables es una representación que incluye hidratos de carbono no naturales.

20 Según las características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la pluralidad de estructuras de hidratos de carbono direccionables es una representación que incluye hidratos de carbono naturales.

25 Según las características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas, los hidratos de carbono naturales se derivan de una fuente humana.

Según las características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la fuente humana se selecciona del grupo que consiste en un tejido, células y fluidos corporales.

30 Según las características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la pluralidad de estructuras de hidratos de carbono direccionables es una representación de dominios de al menos un hidrato de carbono natural.

35 Según todavía otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de identificación de un hidrato de carbono que puede unirse a una entidad, comprendiendo el método las etapas de (a) producir una biblioteca combinatoria de hidratos de carbono complejos direccionable (i) proporcionando un soporte único sólido plano que tiene una pluralidad de posiciones; y (ii) sintetizar enzimáticamente una pluralidad de estructuras de hidratos de carbono, uniéndose cada una de la pluralidad de estructuras de hidratos de carbono a al menos una posición direccionable de la pluralidad de posiciones, produciéndose así la biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable; y (b) seleccionar la biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable con la entidad para identificar al hidrato de carbono que puede unirse a la entidad.

40 Según características adicionales en las realizaciones preferidas de la invención que se describen a continuación, la entidad es un candidato para obtener un material biológicamente activo, el método sirve para identificar un hidrato de carbono que es una diana para el candidato para obtener un material biológicamente activo.

45 Según las características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la entidad es un ligando conocido por unirse a un hidrato de carbono natural específico y además en las que la biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable es una representación de dominios del hidrato de carbono natural específico, el método sirve para identificar un dominio específico de los dominios que se une al ligando.

50 Según las características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la entidad es un posible fármaco.

55 Según aún otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de diagnosticar un trastorno caracterizado por una estructura de hidratos de carbono propios o no propios y obtener anticuerpos frente a eso, comprendiendo el método las etapas de (a) producir una biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable que representa los hidratos de carbono propios o no propios (i) proporcionando un soporte único sólido plano que tiene una pluralidad de posiciones; y (ii) sintetizando enzimáticamente una pluralidad de estructuras de hidratos de carbono, uniéndose cada una de la pluralidad de estructuras de hidratos de carbono a al menos una posición direccionable de las posiciones direccionables, produciéndose así la biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable; y (b) hacer reaccionar la biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable con anticuerpos derivados de un paciente que se sospecha que tiene el trastorno para generar así un patrón de las posiciones a las que se unen los anticuerpos, de tal modo que comparando el patrón con un patrón conocido que caracteriza a un individuo sano, puede obtenerse un diagnóstico del trastorno.

65 La presente invención dirige satisfactoriamente los defectos de las configuraciones actualmente conocidas proporcionando bibliotecas combinatorias de hidratos de carbono complejos y métodos para su fabricación y selección.

Breve descripción de los dibujos

La invención descrita en el presente documento, sólo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 es una fórmula de un hidrato de carbono complejo de 14 unidades de monosacárido de cinco tipos diferentes con tres puntos de ramificación. Esta complejidad, que puede efectuarse mediante el método de la presente invención, no puede efectuarse mediante ninguno de los métodos de síntesis química o enzimática actualmente conocidos en la técnica. Esta figura muestra los tipos de monosacárido por el nombre, los anómeros (centros reactivos) y tipos de enlace, así como los puntos de ramificación.

La figura 2 representa un estudio estadístico sobre la aparición de ramificaciones en los registros de hidratos de carbono complejos de la base de datos CCSD. La base de datos CCSD incluye 48.956 registros que se derivaron de artículos publicados y se recopilaron por el Proyecto de la Universidad de Georgia del CCRC, Centro de Investigación de Hidratos de Carbono Complejos. Cada sector del gráfico de sectores mostrado representa, en porcentaje, el número de ramificaciones (0-26) que aparecen en los hidratos de carbono complejos de la base de datos. Se realizó un análisis estadístico usando CarbBank 3.2.009.

La figura 3 es un histograma que representa la distribución, en porcentajes, del número de residuos de azúcar presentes en los hidratos de carbono complejos encontrados en la base de datos CarbBank. Aunque el 44% de todos los hidratos de carbono complejos en la base de datos tienen 6 o más residuos, no se ha practicado extensamente la síntesis química o enzimática de hidratos de carbono complejos de este tipo, en particular no en el contexto de una biblioteca.

La figura 4 es una tabla que representa la síntesis enzimática por etapas de la estructura de hidrato de carbono complejo de la figura 1. En cada etapa, se enumera la reacción enzimática (RE) (véase la tabla 7 para detalles) y se marca la unidad de monosacárido añadida mediante un fondo gris. "S" representa el soporte sólido sobre el cual se inmoviliza el hidrato de carbono complejo y se produce la reacción de síntesis.

La figura 5 representa la inmovilización covalente de GlcNAc a Covalink NH activado con cloruro cianúrico, inmovilización que constituye una primera etapa en la síntesis de una biblioteca de hidratos de carbono complejos según las enseñanzas de la presente invención.

La figura 6 representa la inmovilización covalente de GlcNAc a Covalink NH activado con NHS/EDC, inmovilización que constituye una primera etapa en la síntesis de una biblioteca de hidratos de carbono complejos según las enseñanzas de la presente invención.

La figura 7a es un gráfico que representa la unión de WGA a PNP-GlcNAc acoplado a placas de Covalink NH en presencia o ausencia de activación con cloruro cianúrico; la unión se visualizó por medio de una peroxidasa conjugada a WGA tal como se describe adicionalmente en la sección de ejemplos.

La figura 7b es un gráfico que representa el efecto de diversos métodos de bloqueo sobre la unión de WGA a GlcNAc-COOH acoplado a placas de Covalink NH; la unión se visualizó por medio de una peroxidasa conjugada a WGA tal como se describe adicionalmente en la sección de ejemplos.

La figura 7c es un gráfico que representa la unión de WGA a GlcNAc acoplado a Covalink NH activado con cloruro cianúrico; la unión se visualizó por medio de FITC conjugado a WGA tal como se describe adicionalmente en la sección de ejemplos.

La figura 8a es un gráfico que representa la unión de WGA a BSA-GlcNAc que recubre las placas Maxisorb; la unión se visualizó por medio de una peroxidasa conjugada a WGA tal como se describe adicionalmente en la sección de ejemplos.

La figura 8b es un gráfico que representa la unión descrita en la figura 8a como una función del número de etapas de lavado empleadas.

La figura 8c es un gráfico que representa la transferencia de β -D-galactosa a fenil- β -D-GlcNAc inmovilizado en placa (ligador de 22 átomos) tal como se verifica usando la unión de lectina ECorA.

La figura 9 representa las etapas enzimáticas requeridas para la síntesis de una biblioteca que consiste en las estructuras descritas en la tabla 17 inmovilizadas en una placa, que explica resumidamente la organización de la placa de microtitulación, las reacciones enzimáticas realizadas en cada etapa y los ensayos de unión a lectinas/anticuerpos.

La figura 10a es un gráfico que representa la unión de RCA₁₂₀ tras la incubación con la mezcla de reacción de α 1,4-galactosiltransferasa (D7) (línea continua) o tras una reacción control (línea discontinua).

La figura 10b es un gráfico que representa la unión a BS-1 tras la incubación con una mezcla de reacción de α 1,3-galactosiltransferasa (D3) (línea continua) o tras una reacción control (línea discontinua).

La figura 10c es un gráfico que representa la unión a TGP tras la incubación con una mezcla de reacción de α 1,3-fucosiltransferasa VI (B2) (línea continua) o tras una reacción control (línea discontinua).

La figura 10d es un gráfico que representa la unión a TML tras la incubación con una mezcla de reacción de α 2,6-sialiltransferasa (A2) (línea continua) o tras una reacción control (línea discontinua).

La figura 10e es un gráfico que representa la unión a TML tras la incubación con una mezcla de reacción de α 2,3-sialiltransferasa (A3) (línea continua) o tras una reacción control (línea discontinua).

La figura 10f es un gráfico que representa la unión a anti-IgM de ratón sialil-Lewis X tras la incubación con la mezcla de reacción de fucosiltransferasa VI (B2) (línea continua) o tras una reacción control (línea discontinua).

La figura 11 representa las reacciones enzimáticas realizadas en cada etapa de una síntesis de una biblioteca (denominada como biblioteca 2) y los ensayos de unión a lectinas que se usaron para verificar la eficacia de las diversas etapas enzimáticas.

La figura 12 es un gráfico que representa la unión de RCA₁₂₀ a BSA-GlcNAc unido a placas Maxisorb en diversos puntos de tiempo tras la incubación con una mezcla de reacción de β 1,4-galactosiltransferasa (D7).

Descripción de las realizaciones preferidas

La presente invención se refiere a bibliotecas combinatorias de hidratos de carbono complejos y a los métodos para la síntesis de las mismas, que pueden usarse para (i) identificar fármacos de hidratos de carbono complejos; (ii) identificar proteínas o receptores asociados a hidratos de carbono complejos como posibles nuevas dianas relacionadas con los hidratos de carbono para farmacoterapia; (iii) identificar hidratos de carbono complejos biológicamente activos; (iv) identificar elementos de hidratos de carbono estructurales complejos específicos como posibles nuevas dianas para farmacoterapia; (v) identificar los sitios activos de estructuras conocidas de hidratos de carbono complejos; (vi) identificar nuevos glicomarcadores en estructuras de hidratos de carbono complejos; (vii) detectar anticuerpos formados frente a un glicomarcador relacionado con cáncer o glicoantígenos relacionados con otra enfermedad.

Los principios y funcionamiento de las bibliotecas combinatorias de hidratos de carbono complejos y los métodos para la síntesis de las mismas según la presente invención pueden entenderse mejor con referencia a los dibujos y descripciones adjuntos.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no se limita en su aplicación para los detalles de construcción y la disposición de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos. La invención puede dar otras realizaciones o puede practicarse o llevarse a cabo de diferentes maneras. También, debe entenderse que la fraseología y terminología empleada en el presente documento es con el fin de describir y no debe considerarse como limitante.

Enzimas para la síntesis de bibliotecas de hidratos de carbono complejos

La síntesis enzimática de bibliotecas combinatorias de hidratos de carbono complejos según la presente invención se efectúa mediante glicosiltransferasas, glicosidasas y transglicosidasas. Estas enzimas pueden obtenerse de diferentes fuentes usando diferentes estrategias tal como se describe en el presente documento a continuación.

Enzimas derivadas de fuentes naturales: Hasta la fecha, se han caracterizado extensamente más de doscientas clases diferentes de glicosiltransferasas, transglicosidasas y glicosidasas activas en un gran número de sustratos y donadores. Estas enzimas se encuentran en células de mamíferos, células vegetales, células de invertebrados y microorganismos (por ejemplo, véase Palcic, 1994 y Nilsson, 1996 que se incorporan como referencia tal como se expone en su totalidad en el presente documento).

Enzimas recombinantes: Se han clonado las secuencias codificantes de muchas glicosiltransferasas y transglicosidasas, y se han caracterizado así la especificidad para el sustrato aceptor de cada una de las enzimas recombinantes codificadas. La tabla 5 de a continuación enumera algunas de las glicosiltransferasas clonadas y sus respectivas especificidades para el sustrato aceptor. Las enzimas para las que se han clonado las secuencias codificantes pueden producirse en cantidades suficientes usando técnicas de ADN recombinante habituales. Puesto que la mayoría de estas enzimas requieren modificaciones postraduccionales para la funcionalidad, se efectúa preferiblemente la expresión en cultivos de células de insecto (Toki, 1997; Tan, 1995). Además, en el caso de enzimas solubles para las que se han caracterizado el (los) dominio(s) catalítico(s), puede efectuarse la expresión sólo para la secuencia del dominio, siempre que conserve la actividad catalítica y la especificidad para el sustrato de la holoenzima (Vries, 1997). Otros posibles sistemas de expresión para glicosiltransferasas solubles también incluyen la secreción de cultivos tisulares de mamíferos (véase por ejemplo el documento U.S. 5.032.519, que se incorpora como referencia tal como se expone en su totalidad en el presente documento).

TABLA 5

Lista parcial de glicosiltransferasas clonadas y sus aceptores			
Enzima	Aceptor	Número C.E.	Referencia
$\alpha 2,3$ sialiltransferasa	D-Gal- $\beta(1,3)$ -D- GalNAc-R	2.4.99.4	Chang 1995, Gillespie et 1992, Kurosawa 1995
$\alpha 2,6$ sialiltransferasa	D-Gal- $\beta(1,4)$ -D- GlcNAc-R	2.4.99.1	Grundmann 1990, Kurosawa 1994, Hamamoto 1993
$\alpha 2,3$ sialiltransferasa	D-Gal- $\beta(1,4)$ -D- GlcNAc-R	2.4.99.6	Kitagawa y Paulson 1993, Wen 1992
$\alpha 2,8$ sialiltransferasa	D-NeuAc- $\alpha(2,3)$ -D- Gal- β -R	2.4.99.8	Nara 1994
$\alpha 1,2$ fucosiltransferasa	D-Gal- β -R	2.4.1.69	Larsen 1990, Hitoshi 1995
$\alpha 1,3$ fucosiltransferasa	[D-Gal- $\beta(1,4)$]-D- GlcNAc-R	2.4.1.152	Kudo 1998
$\alpha 1,6$ fucosiltransferasa	[D-Man- $\beta(1,4)$ -D- GlcNAc- $\beta(1,4)$]-D- GlcNAc-R	2.4.1.68	Voynow 1991, Uozumi 1996, Yanagidani 1997
$\beta 1,4$ manosiltransferasa	D-GlcNAc- $\beta(1,4)$ -D- GlcNAc-R	ninguno	Albright y Robbins 1990
$\alpha 1,2$ manosiltransferasa	D-Man- $\alpha(1,2)$ -Man-R	2.4.1.131	Romero 1997
$\alpha 1,3$ manosiltransferasa	D-man- $\alpha(1,2)$ -Man- $\alpha(1,2)$ -Man-R	ninguno	Yip 1994
$\alpha 1,3$ galactosiltransferasa	D-Gal-	2.4.1.151	Joziase

	$\beta(1,4)$ -D-GlcNAc-R		1989, Larsen 1989, Strahan 1995
$\beta 1,4$ galactosiltransferasa	D-GlcNAc-R	2.4.1.38	Masibay y Qasba 1989
$\alpha 1,3$ N-acetil	[L-Fuc- $\alpha(1,2)$]D-Gal-R	2.4.1.40	Yamamoto 1990
$\beta 1,4$ N-acetilgalactosaaminiltransferasa	[D-NeuAC- $\alpha(2,3)$]D-Gal- $\beta(1,4)$ - D-Glc-R	2.4.1.92	Hidari 1994, Nagata 1992
N-acetilgalactosaaminiltransferasa	Ser/Thr	2.4.1.41	Meurer 1995, Hagen 1993
$\beta 1,3$ glucuronosiltransferasa	D-Gal- $\beta(1,3)$ -D-Gal- $\beta(1,4)$ - D-Xly- β -R	2.4.1.135	Kitagawa 1998
$\beta 1,6$ N-acetilglucosaaminiltransferasa	D-Gal- $\beta(1,4)$ -D-GlcNAc	2.4.1.150	Bierhuizen, 1993
$\beta 1,6$ N-acetilglucosaminiltransferasa	D-GalNAc- $\beta(3,1)$ -D-Gal(R)	2.4.1.102	Bierhuizen 1992
$\beta 1,2$ N-acetilglucosaminiltransferasa	D-Man- $\alpha(1,3)$ [R ¹]D-man- $\beta(1,4)$ - R2	2.4.1.101	Kumar 1990, Pownall 1992, Sarkar 1991, Fukada 1994

$\beta 1,4N$ - acetilglucosaminiltransferasa	D-Man- $\alpha(1,3)$ [R1] - D-Man- $\beta(1,4)$ -R2	2.4.1.145	Minowa 1998
$\beta 1,2N$ - acetilglucosaminiltransferasa	D-Man- $\alpha(1,6)$ [R1] D- man- $\beta(1,4)$ - R2	2.4.1.143	Tan 1995

Métodos para identificar y clonar nuevas enzimas: Además de la glicosiltransferasa natural y recombinante actualmente disponible, puede realizarse la identificación y aislamiento de glicosiltransferasas novedosas. Las glicosiltransferasas que son útiles para la síntesis de una biblioteca de hidratos de carbono complejos, pueden identificarse y aislarse de tipo celulares que tienen las estructuras de hidratos de carbono complejos sintetizados normalmente mediante estas glicosiltransferasas deseadas. Se conocen bien en la técnica las técnicas de cromatografía de afinidad con un aceptor inmovilizado como ligando, y permiten una separación sencilla de una etapa, de una glicosiltransferasa deseada (véase la patente de los EE.UU. A-5.288.637) Una vez se ha identificado y aislado una glicosiltransferasa, puede secuenciarse parcialmente y clonarse el gen que codifica a la misma. Las tecnologías para la clonación de los genes de las glicosiltransferasas están bien establecidos, y se resumen en la técnica anterior muchos ejemplos y estrategias para clonar genes de glicosiltransferasas (véase, por ejemplo, Schachter, 1994 y WO 95/02683).

Otra posible fuente para las secuencias de glicosiltransferasas novedosas reside dentro de la base de datos de ADN y proteínas. Con la rápida acumulación de nuevos datos de secuencia de ADN y proteínas, pueden usarse técnicas de alineación de secuencias para la identificación de nuevas glicosiltransferasas. Por ejemplo, se identificaron 110 genes y ADNc distintos de animales, levaduras, plantas y bacterias, cuyos productos de proteínas contienen la "secuencia señal" característica de la superfamilia del gen de la glicosiltransferasa UDP (Mackenzie, 1997). Usando estos motivos o secuencias señales, un experto en la técnica puede seleccionar bases de datos relevantes para las glicosiltransferasas novedosas. Por ejemplo, tres genes de arabinosiltransferasa nuevos se identificaron en el genoma completamente secuenciado de *Mycobacterium tuberculosis* por medio de la comparación de la homología de secuencia con los genes de arabinosiltransferasa de *Mycobacterium smegmatis* (Cole, 1998).

Utilización de enzimas modificadas mediante evolución directa: Las enzimas con afinidades modificadas o especificidades para el aceptor o donador del sustrato alteradas, también pueden emplearse en la síntesis de ciertos hidratos de carbono complejos. Por ejemplo, la síntesis de estructuras de hidratos de carbono complejos compuestas de unidades de monosacáridos de repetición idénticas conectadas en la misma orientación regioespecífica, tal como, D-man- $\alpha(1,2)$ -D-man- $\alpha(1,2)$ -D-man- $\alpha(1,2)$ -R, requiere el uso de una α -1,2-manosiltransferasa con una especificidad para el aceptor para α -1,2-manosa. Empleando la enzima nativa en presencia de GDP-manosa y el aceptor D-man- $\alpha(1,2)$ -R inmovilizado sobre un soporte sólido, daría como resultado una reacción de polimerización no controlada que crearía cadenas poliméricas largas de oligo-manosa, [D-man- $\alpha(1,2)$] $_n$ -R. Con el fin de sintetizar una oligo-manosa con un número definido de unidades de manosa (tres en el ejemplo anterior), se requiere un procedimiento por etapas controlado. La capacidad de controlar la polimerización no deseada puede conseguirse usando un donador glicosílico modificado, y una única glicosiltransferasa con una especificidad para el donador modificada. Una enzima modificada de este tipo, se emplearía para la adición de una GDP-man modificada para al aceptor inmovilizado D-man- $\alpha(1,2)$ -R. La modificación del resto manosídico de la GDP-Man evitará, entonces, la adición del siguiente resto de manosa, puesto que el aceptor para esta manosiltransferasa es D-man- $\alpha(1,2)$ -R y no D-(man modificada)- $\alpha(1,2)$ -D-man- $\alpha(1,2)$ -R. Tras esta reacción, se elimina mediante lavado cualquier exceso del donador modificado y la enzima, y se retira el grupo de modificación, permitiendo así la repetición posterior de la misma etapa enzimática. Este procedimiento controlado se continúa hasta que se une el número de moléculas de manosa deseado en el hidrato de carbono recientemente formado. Para este efecto, el grupo de modificación puede ser un residuo químico unido al donador en cualquier posición, pero no en la posición 1. Entonces, este grupo de modificación puede retirarse selectivamente mediante una reacción o bien enzimática o bien química, de tal modo que se retira el grupo de modificación sin imponer daños a la molécula de hidrato de carbono complejo.

La tabla 6 de a continuación enumera algunos de los grupos de modificación de sacáridos actualmente disponibles, clasificados mediante sus métodos de eliminación (Kunz, 1997, que se incorpora como referencia tal como se expone en su totalidad en el presente documento, y las referencias citadas en éste). También pueden usarse monosacáridos adicionales como grupos de modificación y como tal, puede efectuarse la eliminación de los mismos usando glicosidasas específicas que no afectarán a la estructura de hidratos de carbono complejos existente (Peieto, 1995).

TABLA 6

Grupos de modificación de sacáridos disponibles clasificados mediante su escisión (Kunz y Schultz, 1997; y referencias citadas en el presente documento)		
Principio de escisión	Reactivos de escisión	Grupo de modificación
hidrogenólisis	H ₂ /paladio	Benciloxycarbonilo Bencil éter Éster bencílico
acidólisis	Ácido trifluoroacético Ácido fórmico HCl/éter	Terc-butiloxycarbonilo Terc-butil éter Éster terc-butílico Metoxibencil éter
Escisión promovida por base	Morfolina Piperidina NaOMe/MeOHNH ₂ NH ₂ /MeOH	9-fluorenilmetoxilo Carbonilo O-acetilo
Escisión reductora	Zn/ácido acético	2,2,2-tricloroetoxycarbonilo
Escisión oxidativa	Nitrato cérico amónico	Metoxibencil éter
Escisión catalizada por complejo metálico	[Ph ₃ P] ₄ Pd ⁰ /nucleófilo	Éster alílico
fotólisis	hν	O-nitrobencilo
Escisión enzimática	Lipasa, esterasa, proteasa	Ésteres alquílicos y alcóxialquílicos

Por tanto, las enzimas que tienen especificidades para el aceptor y/o donador modificadas pueden prepararse usando el enfoque de evolución directa. Con los progresos recientes en el campo de la ingeniería de proteínas, se describieron muchos ejemplos de enzimas con especificidad modificada mediante ingeniería obtenidos por medio de la evolución directa (para revisar este campo véase: Kuchner, 1997; Harris, 1998, que se incorporan en el presente documento como referencia). Una evolución directa de una especificidad enzimática se consigue mediante la generación secuencial aleatoria de la mutagénesis dirigida por la región o dirigida por el sitio del gen o de los genes que codifican para la enzima, seguida por la selección o detección de clones que muestran la actividad y especificidad deseadas. Por ejemplo, Moore y los colaboradores realizaron siete ciclos de barajado de ADN (DNA shuffling) para cambiar la especificidad para el sustrato de paranitrobencil-esterasa para un sustrato antibiótico novedoso (Moore, 1996). Zhang y los colaboradores realizaron la evolución directa de una fucosidasa a partir de la galactosidasa mediante el barajado de ADN (Zhang, 1997). Shan y los colaboradores modificaron mediante ingeniería una especificidad para nucleótidos no naturales para la (virus del sarcoma de rous)-tirosina cinasa (Shan, 1997). Paulson y los colaboradores realizaron la mutación del motivo sialílico de la sialiltransferasa que altera la cinética de los sustratos donador y aceptor (Datta, 1998).

Síntesis enzimática direccionable paralela de bibliotecas combinatorias de hidratos de carbono complejos

Las siguientes secciones detallan una preparación enzimática paso a paso de una biblioteca combinatoria de hidratos de carbono complejos según con las enseñanzas de la presente invención.

Diseño de una biblioteca combinatoria enzimática de hidratos de carbono complejos

El diseño de una biblioteca combinatoria enzimática de hidratos de carbono complejos incluye, según la presente invención, determinar los constituyentes de hidratos de carbono complejos incluidos dentro de una biblioteca específica según una aplicación prevista de la misma.

La determinación de los elementos de hidratos de carbono complejos incluidos dentro de un

Por ejemplo, con el fin de utilizar una biblioteca combinatoria enzimática de hidratos de carbono complejos de la presente invención para identificar los hidratos de carbono funcionales como dianas farmacológicas, los elementos de hidratos de carbono complejos de la biblioteca son preferiblemente productos modificados o derivados de los hidratos de carbono complejos presentes en células humanas. La selección de una biblioteca de este tipo frente a otras moléculas derivadas de otras fuentes, tales como células humanas específicas o patógenos de las mismas, permite la identificación de hidratos de carbono complejos novedosos que actúan como receptores para estas moléculas, actuando *in vivo* como receptores de patógenos, o implicados en procesos de reconocimiento célula a célula.

Similarmente, con el fin de utilizar una biblioteca combinatoria enzimática de hidratos de carbono complejos de la presente invención para identificar los posibles fármacos, preferiblemente se sintetizan los elementos de hidratos de carbono complejos de la biblioteca similares o idénticos a los hidratos de carbono complejos naturales presentes en células humanas. La selección de una biblioteca de este tipo con candidatos a fármacos derivados de diversas fuentes sintéticas y naturales, permite la identificación de candidatos a fármacos que se unen a una o más de las estructuras de hidratos de carbono complejos de la biblioteca.

Otra biblioteca específica según la presente invención contiene hidratos de carbono complejos dedicados para la identificación de candidatos a fármacos novedosos. En este caso, se genera una biblioteca de diversidad de hidratos de carbono complejos maximizada, que representa entre otras, las estructuras de hidratos de carbono complejos no encontradas en la naturaleza. Después, se selecciona una biblioteca de este tipo para la posible unión de patógenos o moléculas derivadas de patógenos. Alternativamente, después se selecciona una biblioteca para la posible unión de moléculas que ocasionan otras enfermedades.

Para identificar los dominios de sitio activo dentro de un hidrato de carbono complejo conocido, se prepara una biblioteca según la presente invención que representa todos los posibles dominios del hidrato de carbono complejo. La selección de esta biblioteca para obtener la unión o bioactividad, permite identificar los dominios de sitio activo del hidrato de carbono complejo conocido.

Para detectar anticuerpos generados frente a, por ejemplo, glucoepítomos (marcadores) relacionados con cáncer, glucomarcadores relacionados con transplantes de órganos, u otros glucomarcadores en suero sanguíneo, se prepara y selecciona una biblioteca de hidratos de carbono complejos de combinaciones específicas de glucomarcadores. Por ejemplo, una biblioteca específica puede representar los glucomarcadores de varios estados de cáncer. Esta biblioteca se selecciona después frente a anticuerpos derivados de suero humano para identificar la presencia de anticuerpos frente a uno o más de estos glicomarcadores.

Para delimitar los glicomarcadores relacionados con, por ejemplo, cáncer o transplantes de órganos, se prepara y selecciona una biblioteca de hidratos de carbono complejos de combinaciones específicas de elementos de hidratos de carbono que son variaciones estructurales de los glicomarcadores normalmente asociados con tales estados.

Se prevén otras bibliotecas combinatorias enzimáticas de hidratos de carbono complejos, dedicadas a otras aplicaciones y están dentro del alcance amplio de la presente invención tal como se reivindica.

Construcción de módulos enzimáticos (ME): La construcción de módulos enzimáticos incluye la evaluación de las reacciones enzimáticas requeridas (RE), aceptores y donadores glicosílicos y enzimas que se requieren para la síntesis de cada hidrato de carbono complejo de una biblioteca. La construcción de ME incluye además la optimización y el desarrollo del proceso de las ER con consideraciones con respecto al tiempo de reacción, temperatura y concentraciones de reactivos. La construcción de ME incluye además, determinar el orden específico en el que deben utilizarse las RE para obtener cada ME.

Para permitir las reacciones de síntesis empleadas, se determina una secuencia específica de reacciones enzimáticas (RE) para cada constituyente de hidrato de carbono complejo de una biblioteca dada. Para hidratos de carbono complejos que tienen una estructura lineal no ramificada, la secuencia de RE sigue la de la secuencia de monosacárido de estructuras lineales no ramificadas de este tipo, en un modo por etapas. Para los hidratos de carbono complejos que tienen estructura(s) ramificada(s) y/o unidades de monosacárido repetitivas dispuestas en una disposición lineal, debe diseñarse un procesos de síntesis única empleando los ME únicos.

El siguiente ejemplo proporciona el fundamento para seleccionar las RE particulares para proporcionar un ME adaptado para la síntesis de un hidrato de carbono complejo distinto. La estructura final de hidratos de carbono complejos se describe en la figura 1 y el procedimiento de diseño se describe mediante la figura 4 y la tabla 7. Un ME de este tipo se diseña, según la presente invención, para cada hidrato de carbono complejo presente en una biblioteca dada. Tal como se detalla adicionalmente más adelante en el presente documento, se considera la eficacia cuando se afectan prácticamente cada uno de los ME mientras se construye una biblioteca según la presente invención.

TABLA 7

Una lista parcial de las RE incluyendo sus donadores, aceptores e índices						
índice	extensión	α/β	Pos.	aceptor	donador	C.E.
A1		α	3	D-Gal- β (1,3)-D-GalNAc-R	CMP-NeuAC	2.4.99.4
A2		α	6	D-Gal- β (1,4)-D-GlcNAc	CMP-NeuAC	2.4.99.1
A3		α	3	D-Gal- β (1,4)-D-GlcNAc-R	CMP-NeuAC	2.4.99.6
A4		α	6	D-GalNAc- α -R	CMP-NeuAC	2.4.99.3
A5	[NeuAc- α (2,3)-D-Gal- β (1,4)]	α	6	D-GalNAc- α -R	CMP-NeuAC	2.4.99.7
A6		α	8	D-NeuAc- α (2,3)-D-Gal- β -R	CMP-NeuAC	2.4.99.8
A7		α	8	D-NeuAc- α (2,6)-D-NeuAc-R	CMP-NeuAC(modificado)	ninguna
B1		α	2	D-Gal- β -R	GDP-L-Fuc	2.4.1.69
B2	[D-Gal- β (1,4)]	α	3	D-GlcNAc-R	GDP-L-Fuc	2.4.1.152

TABLA 7 (continuación)

Una lista parcial de las RE incluyendo sus donadores, aceptores e índices						
índice	extensión	α/β	Pos.	aceptor	donador	C.E.
B3	[D-Man- β (1,4)-D-GlcNAc- β (1,4)]	α	6	D-GlcNAc-R	GDP-L-Fuc	2.4.1.68
B4		α	6	D-GlcNAc-R	GDP-L-Fuc	ninguna
B5	[D-GlcNAc- β (1,4)]	α	6	D-GlcNAc-R	GDP-L-Fuc	ninguna
B6	[D-Gal- β (1,3)]	α	4	D-GlcNAc-R	GDP-L-Fuc	ninguna
B7	[D-Gal- β (1,4)]	α	3	D-Glc-R	GDP-L-Fuc	ninguna
B8		α	3	D-Glc-R	GDP-L-Fuc	ninguna
B9		α	4	D-GlcNAc- β -R	GDP-L-Fuc	ninguna
B10		α	3	D-GlcNAc- β -R	GDP-L-Fuc	ninguna
B11		α	4	D-GlcNAc- β (1,3)-Gal-R	GDP-L-Fuc	ninguna
B12		α	3	D-GlcNAc- β (1,6)-Gal-R	GDP-L-Fuc	ninguna
C1		β	4	D-GlcNAc- β (1,4)-D-GlcNAc-R	GDP-Man	ninguna
C2		α	3	D-Man- α (1,2)-Man- α (1,2)-Man-R	GDP-Man	ninguna
C3		α	2	D-Man- α (1,2)-Man-R	GDP-Man	2.4.1.131
C4		α	3	D-Man- β (1,4)-D-GlcNAc- β (1,4)-D-GlcNAc-R	GDP-Man	ninguna
C5	[D-Man- α (1,3)]	α	6	D-Man- β (1,4)-D-GlcNAc-R	GDP-Man	ninguna
C6		β		dolicol phosphate	GDP-Man	2.4.1.83
C7		α	6	D-Man- α (1,0)-R	GDP-Man	ninguna
C8		α	3	D-Man- α (1,0)-R	GDP-Man	ninguna
C9		α	4	D-GlcNAc- β (1,4)-R	GDP-Man	ninguna
C10		α	3	D-Man- β (1,4)-D-GlcNAc- β (1,0)-R	GDP-Man	ninguna
D1		β		ceramide	UDP-Gal	2.4.1.45
D2		β	6	D-Gal- β (1,4)-D-Gal- β (1,4)-D-Glc-ceramide	UDP-Gal	2.4.1.154
D3		α	3	D-Gal- β (1,4)-D-GlcNAc-R	UDP-Gal	2.4.1.151
D4		β	3	D-Gal- β (1,4)-D-Xly- β -P	UDP-Gal	2.4.1.134
D5		β	3	D-GalNAc-R	UDP-Gal	2.4.1.122
D6	[L-Fuc- α (1,2)]	α	3	D-Gal-R	UDP-Gal	2.4.1.37
D7		β	4	D-GlcNAc-R	UDP-Gal	2.4.1.38
D8		β	4	D-Xly- β -P	UDP-Gal	2.4.1.133

<i>Una lista parcial de las RE incluyendo sus donadores, aceptores e índices</i>						
<i>índices</i>	<i>extensión</i>	<i>α/β</i>	<i>Pos.</i>	<i>aceptor</i>	<i>donador</i>	<i>C.E.</i>
D9		β	4	D-Glc-R	UDP-Gal	2.4.1.38
D10		β	3	D-GlcNAc-R	UDP-Gal	ninguna
D11		β	3	D-GlcNAc-β(1,3)-Gal-R	UDP-Gal	ninguna
D12		β	4	D-GlcNAc-β(1,6)-Gal-R	UDP-Gal	ninguna
E1		β	3	D-Gal-(1,4)-D-Gal-(1,4)-D-Glc-ceramida	UDP-GalNAc	2.4.1.79
E2	[D-NeuAc-α(2,3)]-	β	4	D-Gal-β(1,4)-D-Glc-ceramida	UDP-GalNAc	2.4.1.92
E3	[L-Fuc-α(1,2)]	α	3	D-Gal-R	UDP-GalNAc	2.4.1.40
E4				Ser/Thr	UDP-GalNAc	2.4.1.41
F1				esfingosina	UDP-Glc	2.4.1.80
G1		β	3	D-Gal-β(1,3)-D-Gal-β(1,4)-D-Xly-β-P	UDP-GlcA	2.4.1.135
H1		β	3	D-Gal-β(1,3)-D-GalNAc-R	UDP-GlcNAc	2.4.1.146
H2		β	6	D-Gal-β(1,4)-D-GlcNAc	UDP-GlcNAc	2.4.1.150
H3		β	3	D-Gal-β(1,4)-D-GlcNAc-β(1,X)R.	UDP-GlcNAc	2.4.1.149
H4	[Gal-β(1,3)]	β	6	D-GalNAc-R	UDP-GlcNAc	2.4.1.102
H5		β	3	D-GalNAc-R	UDP-GlcNAc	2.4.1.147
H6	[GlcNAc-β(1,3)]	β	6	D-GalNAc-R	UDP-GlcNAc	2.4.1.148
H7	[D-Man-α(1,3)]	α	2	D-Man-α(1,2)-D-Man-α(1,2)-D-Man	UDP-GlcNAc	2.4.1.138
H8		β	2	D-Man-α(1,3)[R1]D-man-β(1,4)-R2	UDP-GlcNAc	2.4.1.101
H9		β	4	D-Man-α(1,3)[R1]D-Man-β(1,4)-R2	UDP-GlcNAc	2.4.1.145
H10		β	2	D-Man-α(1,6)[R1]D-man-β(1,4)-R2	UDP-GlcNAc	2.4.1.143
H11		β	6	D-Man-α(1,6)[R1]D-Man-β(1,4)-R2	UDP-GlcNAc	2.4.1.155
H12	[D-GlcNAc-β(1,2)][D-GlcNAc-β(1,6)]	β	4	D-Man-α(1,6)R	UDP-GlcNAc	ninguna
H13	[D-Man-α(1,3)][D-Man-β(1,6)]	β	4	D-Man-β(1,4)R	UDP-GlcNAc	2.4.1.144
H14	[D-GlcNAc-β(1,3)]	β	6	D-Gal-β(1,4)-D-GlcNAc	UDP-GlcNAc	ninguna
H15		β	3	D-Gal-β(1,4)-D-Glc	UDP-GlcNAc	ninguna

Una lista parcial de las RE incluyendo sus donadores, aceptores e índices						
índice	extensión	α/β	Pos.	aceptor	donador	C.E.
H16	[D-GlcNAc- β (1,3)]	β	6	D-Gal- β (1,4)-D-Glc	UDP-GlcNAc	ninguna
H17		β	4	D-GlcNAc-R	UDP-GlcNAc	ninguna
H18		β	4	D-Man-(1,0)R	UDP-GlcNAc	ninguna
H19	[D-GlcNAc- β (1,4)]	β	2	D-Man-(1,0)R	UDP-GlcNAc	ninguna
H20		β	3	D-Gal- β (1,4)-D-GlcNAc	UDP-GlcNAc	ninguna
H21		β	6	D-Gal-R	UDP-GlcNAc	ninguna
H22		β	3	D-Gal-R	UDP-GlcNAc	ninguna
H23	[D-GlcNAc- β (1,6)]	β	3	D-Gal-R	UDP-GlcNAc	ninguna
H24	[D-GlcNAc- β (1,6)]	β	3	D-Gal-R	UDP-GlcNAc-(4,1) α -Fuc	ninguna
I1		α	3	D-Glc- β -Ser	UDP-Xyl	ninguna
12		α	2	D-Man- β (1,4)-D-GlcNAc- β (1,4)-D-GlcNAc-R	UDP-Xyl	ninguna
13		α	3	D-Xly- α (1,3)-D-Glc- β -Ser	UDP-Xyl	ninguna

La primera etapa en la síntesis del hidrato de carbono complejo mostrada en la figura 1 se efectúa, tal como se muestra en la figura 4, mediante unión de un primer bloque estructural, GalNAc, sobre un soporte sólido (S) mediante un ligador apropiado que se describe adicionalmente en la presente memoria a continuación.

La segunda etapa (D5, para detalles véanse la tabla 7 y la figura 4) en la síntesis del hidrato de carbono complejo mostrada en la figura 1, implica la transferencia de Gal desde UDP-Gal hasta GalNAc-S mediante una β (1,3)-galactosiltransferasa (E.C. 2.4.1.122).

La tercera etapa (H1; para detalles véanse la tabla 7 y la figura 4) en la síntesis del hidrato de carbono complejo mostrado en la figura 1 implica la utilización de β (1,3)-N-acetilglucosaminiltransferasa (E.C. 2.4.1.146) para transferir un grupo acetilglucosamina desde UDP-GlcNAc hasta Gal- β (1,3)-GalNAc-S.

Luego, se añade una unidad de galactosa al aceptor (véase la figura 4), en vez de una unidad de fucosa debido a que la especificidad de las enzimas β (1,3)-fucosiltransferasa (E.C. 2.4.1.152) para el aceptor Gal- β (1,4)-GlcNAc-R en vez de para el GlcNAc desnudo.

Por tanto, en la cuarta etapa (D7, para detalles véanse la tabla 7 y la figura 4) en la síntesis del hidrato de carbono complejo mostrada en la figura 1, se añade galactosa a GlcNAc-R usando la enzima β (1,4)galactosiltransferasa (E.C. 2.4.1.38).

Tras la cuarta etapa de síntesis descrita anteriormente, el proceso de síntesis se complica debido a que las unidades de galactosa se ramifican en dos antenas (ramificaciones). Debido a que la estructura de estas antenas es idéntica en el punto de ramificación, pero diferente hacia sus extremos no reductores, un proceso de síntesis por etapas idéntico que forma simultáneamente las partes idénticas de los dos antenas no permitiría la síntesis posterior de un extremo único reductor para cada una de las antenas. Por tanto, la síntesis de las dos partes únicas de cada una de las antenas avanza de un modo por etapas independiente. En cualquier caso, en el ejemplo dado, la ramificación β (1,3) ha de sintetizarse en primer lugar debido a que su antena requiere fucosilación. Si se iniciara el proceso de síntesis con la otra ramificación, no podría efectuarse la fucosilación directa a la ramificación deseada.

Por tanto, la quinta etapa (H3, para detalles véanse la tabla 7 y la figura 4) en la síntesis del hidrato de carbono complejo mostrada en la figura 1 se efectúa usando β (1,3)-N-acetilglucosaminiltransferasa (E.C. 2.4.1.149) para transferir acetilglucosamina desde UDP-GlcNAc hasta Gal- β (1,4)-GlcNAc-R.

En la sexta etapa (D7, para detalles véanse la tabla 7 y la figura 4) en la síntesis del hidrato de carbono complejo mostrada en la figura 1, se añade una unidad de galactosa a GlcNAc-R usando una β (1,4)galactosiltransferasa (E.C. 2.4.1.38).

En la séptima etapa (D3, para detalles véanse la tabla 7 y la figura 4) en la síntesis del hidrato de carbono complejo mostrada en la figura 1, se añade un residuo de galactosa adicional a Gal- α (1,4)-GlcNAc-R usando α (1,3)galactosiltransferasa (E.C. 2.4.1.151).

En la octava etapa (H 14, para detalles véanse la tabla 7 y la figura 4) en la síntesis del hidrato de carbono complejo mostrada en la figura 1, se efectúa la ramificación usando $\beta(1,6)$ N-acetilglucosaminiltransferasa sobre el sustrato aceptor Gal[GlcNAc- $\beta(1,3)$] $\beta(1,4)$ -GlcNAc-R.

La novena etapa (B2, para detalles véanse la tabla 7 y la figura 4) en la síntesis de los hidratos de carbono complejos mostrada en la figura 1 implica dos de los cuatro monómeros de GlcNAc y se efectúa mediante $\alpha(1,3)$ fucosiltransferasa (E.C. 2.4.1.152) que transfiere fucosa a Gal- $\beta(1,4)$ -GlcNAc-R.

La décima etapa (D7, para detalles véanse la tabla 7 y la figura 4) en la síntesis del hidrato de carbono complejo mostrada en la figura 1 efectúa un alargamiento adicional de la segunda antena usando una $\beta(1,4)$ galactosiltransferasa (E.C. 2.4.1.38) sobre el sustrato aceptor GlcNAc-R.

En la undécima etapa (A3, para detalles véanse la tabla 7 y la figura 4) en la síntesis del hidrato de carbono complejo mostrada en la figura 1, se agrega un monómero de ácido siálico a la Gal- $\beta(1,4)$ GlcNAc-R de la antena en una orientación $\alpha(1,6)$ usando una $\alpha(2,3)$ sialiltransferasa (E.C. 2.4.99.6).

La duodécima etapa (A6, para detalles véanse la tabla 7 y la figura 4) en la síntesis del hidrato de carbono complejo mostrada en la figura 1 efectúa un alargamiento adicional de esta antena usando una $\alpha(2,8)$ sialiltransferasa (E.C. 2.4.99.8), añadiendo por tanto otra unidad de NeuAC al aceptor del sustrato NeuAC- $\alpha(2,3)$ -Gal-R.

El alargamiento adicional de esta antena requiere el uso de una (2,8)polisialiltransferasa con especificidad para el aceptor del sustrato NeuAC- $\alpha(2,8)$ -NeuAC-R. Desafortunadamente, una reacción enzimática con una enzima de este tipo provocará una polimerización incontrolable de múltiples monómeros de ácido siálico en vez de la adición requerida de solamente un único monómero de ácido siálico. Conseguir una adición controlable de un único monómero de ácido siálico en cada etapa de la RE necesita el uso de una enzima con una especificidad para el donador modificada. Como tal, en lugar de usar CMP-NeuAC como un sustrato donador, esta enzima modificada incorpora un grupo modificador al extremo glucano. La presencia de este grupo modificador evita la polimerización indeseada de múltiples monómeros de ácido siálico, debido a que esta enzima no puede agregar ácido siálico al aceptor NeuAC (modificado)- $\alpha(2,8)$ -NeuAC-R. En la última etapa de esta RE se elimina el grupo modificador.

Por tanto, en la etapa final (A7, para detalles véanse la tabla 7 y la figura 4) en la síntesis del hidrato de carbono complejo mostrada en la figura 1, la enzima modificada $\alpha(2,8)$ polisialiltransferasa se emplea junto con el donador modificado CMP-NeuAC y el aceptor NeuAC(modificado)- $\alpha(2,8)$ -NeuAC-R, para de ese modo generar el hidrato de carbono complejo mostrado en la figura 1.

La tabla 8 a continuación resume la síntesis por etapas del hidrato de carbono complejo mostrada en la figura 1, tal como se resumió en la figura 4.

TABLA 8

ME	Primer monosacárido inmovilizado	Secuencia RE (los detalles de RE se muestran en la tabla 7 y en la figura 4):
EM ₁	GalNAc-S	D5, H1, D7, H3, D7, D3, H14, B2, D7, A3, A6, A7

La selección de las RE para proporcionar un ME deseado se genera usando un algoritmo informático, teniendo en cuenta la estructura del hidrato de carbono complejo y las RE disponibles. Un algoritmo de este tipo puede programarse fácilmente por un experto en la técnica, basándose en las especificidades donador-aceptor de las diversas glicosiltransferasas, glicosidasas y transglicosilasas disponibles.

Selección y síntesis automatizada: el ME usado en la construcción de una biblioteca combinatoria de hidratos de carbono complejos según la presente invención se ejecutan para producir una biblioteca combinatoria de hidratos de carbono complejos unida a un soporte sólido usando tecnología automatizada. También se ejecuta la selección para identificar hidratos de carbono complejos bioactivos que reaccionan de manera cruzada con una sonda de interés, según las realizaciones preferidas de la invención, mediante tecnología automatizada.

Las diferentes características estructurales de cada hidrato de carbono complejo individual de una biblioteca específica dictan una multitud de protocolos de síntesis únicos. Como tal, las bibliotecas descritas por la presente invención se generan preferiblemente mediante un método de síntesis paralelo, en el que se ha considerado, preferiblemente, garantizar un número mínimo de etapas ejecutadas. Considérese, por ejemplo, un sistema de robótica que permite una

distribución direccionable paralela de los reactivos desde los recipientes de reactivo. En este caso, un número mínimo de etapas implica que se detalla cada uno de los recipientes de reactivo un número mínimo de veces. Por tanto, se ha considerado una secuencia de etapas de síntesis que garantizarán la finalización de la síntesis de la totalidad de los hidratos de carbono complejos de la biblioteca con un número mínimo de veces que se detalla cada recipiente de reactivo. Un algoritmo dedicado puede desarrollarse fácilmente por un experto habitual en la técnica para diseñar el protocolo de síntesis de biblioteca automatizado que cumplirá con los requisitos anteriores. De hecho, ya se ha desarrollado un algoritmo similar para la síntesis direccionable paralela de oligonucleótidos (Pease, 1994) y péptidos (Fodor, 1991) en microchips, ambos se incorporan como referencia tal como se expone completamente en el presente documento).

Las tecnologías que permiten la síntesis direccionable paralela de alto rendimiento automatizada han evolucionado enormemente en los últimos años. Los sintetizadores automatizados que pueden controlar y realizar muchos protocolos diferentes de síntesis en fase sólida al mismo tiempo están comúnmente disponibles hoy en día (Rivero, 1997). Estas tecnologías pueden clasificarse según el tipo de sustrato en fase sólida que se utiliza para la síntesis, los medios de la introducción y eliminación de los reactivos y el diseño de las cámaras de reacción.

Según la presente invención puede usarse tecnologías que permiten la síntesis paralela en fase sólida de alto rendimiento automatizada. Tales tecnologías incluyen, por ejemplo, (i) sistemas de reactor abierto (por ejemplo, placas de microtitulación convencionales; (ii) sistemas de reactor cerrado o sistemas de reactor semicerrado (por ejemplo, laboratorio en un chip); (iii) sistemas de bloque de reacción; (iv) síntesis sobre pernos poliméricos; (v) síntesis sobre láminas poliméricas; y (vi) síntesis sobre un microchip. Para una revisión comprensiva de estas tecnologías y sistemas véase Cargil, 1997, que se incorpora como referencia tal como se expone completamente en el presente documento.

Soporte en fase sólida: las bibliotecas según la presente invención se sintetizan preferiblemente sobre un soporte en fase sólida. Como tal, el primer bloque de formación está dotado de un grupo funcional adecuado para unirse a un soporte de este tipo. Grupos de unión adecuados incluyen hidroxilos, carbonilo, carboxilo, aminas, haluros, tioles, ésteres, boronatos, siloxilo, aza, oxo, oxireno, o cualquier grupo insaturado.

Varios soportes de matriz sólida son los más adecuados para generar bibliotecas de hidratos de carbono según la presente invención, tales como, pero sin limitarse a, poliestireno reticulado con divinilbenceno (Merrifield, 1963), copolímero de bloque de polietilenglicol-poliestireno (PEG-PS, Bayer, 1991), poliamidas (Dryland, 1986), poliacrilamida (Ashardy, 1979), polimetacrilamida (Hsiau, 1997) y celulosa (Frank, 1988). Series basadas en silicona micro-fabricadas producidas mediante técnicas habituales de procesamiento semiconductor (Fodor, 1991; Sosnowski, 1997; Cheng, 1998, U.S. -A-5.643.738; 5.681.484; y 5.585.069) pueden servir también como soporte en fase sólida.

Unión del primer bloque estructural de sacáridos al soporte en fase sólida: el primer bloque estructural de sacáridos se une preferiblemente de manera covalente a la matriz en fase sólida mediante un único átomo (por ejemplo, el grupo funcional en fase sólida) o un ligador. Las propiedades generales de un ligador incluyen: tener grupos bifuncionales que permiten la unión tanto al soporte sólido como al bloque estructural inicial, y como tal definir una estructura (Atherton, 1989). Debido a que la accesibilidad de la enzima a los sacáridos inmovilizados es de gran importancia, la flexibilidad y longitud del ligador son cruciales para un alto rendimiento. Como tal, los ligadores adecuados para la síntesis según la presente invención pueden incluir, por ejemplo, aminoácidos, péptidos, proteínas no glucosiladas, lípidos, lípido A, ceramidas, dolicol fosfatos, ciclodextrinas, oligosacáridos, monosacáridos, cadenas alquilo, ácidos nucleicos, u otras moléculas espaciadoras. Estos ligadores pueden ser escindibles o no escindibles y estar compuestos de entidades ramificadas, cíclicas, complejas o simples.

Disposición de la biblioteca: la disposición preferida de los constituyentes de la biblioteca según la presente invención está en una serie sintetizada sobre un soporte en fase sólida único plano de diversas formas geométricas y distribuciones, tales como: series bidimensionales, series multicapas, series tridimensionales (por ejemplo, microtítulos apilados).

Alternativamente, los constituyentes de la biblioteca pueden estar unidos a un soporte sólido único plano en cámaras de reacción (abierta o cerrada) y dispuestos sobre un soporte bidimensional o tridimensional. Cualquier disposición que permita el funcionamiento direccionable automático sencillo de la colección de ME puede usarse según la presente invención. Se presta especial atención a la distribución espacial de los hidratos de carbono de una biblioteca para garantizar las distancias más cortas entre los hidratos de carbono más similares, de modo que se garantice la eficacia del proceso de síntesis automatizado. Los sistemas de microfluído pueden y se emplean preferiblemente (U.S.-A-5.643.738; 5.681.484; y 5.585.069).

Selección de la biblioteca automatizada: hay numerosas tecnologías y procedimientos de selección empleados en la actualidad en la técnica que pueden aplicarse para seleccionar las bibliotecas de hidratos de carbono de la presente invención. Para revisiones véanse Broach, 1996 y Burbaum, 1997.

Como tal, las tecnologías adecuadas para la selección de alto rendimiento de unión o bioactividades puede basarse en lo siguiente: (i) métodos de detección radioactiva; (ii) métodos de detección de fluorescencia; (iii) métodos de detección basados en ELISA; y (iv) sistemas de ensayo de base celular por medio de genes indicadores.

Las sondas radiomarcadas que se unen a hidratos de carbono de una biblioteca dada pueden detectarse, por ejemplo, mediante un ensayo de centelleo por proximidad (SPA, (Scintillation Proximity Assay) Cook, 1996). Las principales ventajas del SPA son que (i) no requiere la eliminación de moléculas radiomarcadas libres; y (ii) se automatiza fácilmente. Métodos adicionales, tales como, fluorescencia pueden emplearse también o bien por medio de detección de fluorescencia directa de una molécula unida marcada de manera fluorescente o, por ejemplo, mediante las tecnologías de fluorescencia de resolución temporal homogénea (HTRF, (Homogenous Time-Resolved Fluorescence) Mathis, 1995) o del ensayo de polarización de la fluorescencia (PFA, Fluorescence Polarization Assay) (Checovich, 1995). Las principales ventajas de estas últimas tecnologías recaen en la capacidad para usar protocolos “mezcla y medida” sin la adición de etapas de complicación adicionales. Además, también pueden emplearse muchas variaciones del método de detección de ensayos de análisis de inmuno absorción ligado a enzimas (ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assays) según esta invención.

Las capacidades de unión y bioactividad de cada uno de los hidratos de carbono de una biblioteca según la presente invención pueden evaluarse usando sistemas de ensayo basados en células. Los sistemas de ensayo basados en células para la selección de alto rendimiento se han estudiado exhaustivamente y se han introducido pautas para seleccionar sistemas de selección apropiados (Rose, 1996). Los sistemas de ensayo que usan células de insectos y mamíferos, así como células bacterianas y levadura, se han descrito a fondo (Broach, 1996; Rose, 1996; Suto, 1997).

Uno de los métodos más comunes para detectar interacciones entre las moléculas expresadas en células y ligandos que pueden unir tales células es emplear un gen indicador. Esto implica juntar los elementos de control transcripcional de un gen diana con una secuencia de codificación de un gen indicador en un vector e introducir el vector en una línea celular adecuada con el fin de establecer un sistema de detección que responda a la modulación de la diana, en este caso mediante un hidrato de carbono derivado de la biblioteca direccionable. Ejemplos comunes de genes indicadores son enzimas tales como fosfatasa alcalina, cloramfenicol, acetiltransferasa, luciferasas bacterianas y de luciérnaga, y β -galactosidasa. Pueden detectarse niveles bajos de actividad para estas enzimas usando métodos de detección colorimétricos, quimioluminiscentes o bioluminiscentes. También pueden emplearse genes indicadores no enzimáticos tales como proteína fluorescente azul, hacia rojo y verde (Phillips, 1997).

Por tanto, según un aspecto de la presente invención se proporciona una biblioteca combinatoria de hidratos de carbono. La biblioteca combinatoria de hidratos de carbono según la presente invención incluye una pluralidad de estructuras de hidratos de carbono direccionables.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para producir una biblioteca de hidratos de carbono direccionable. El método según este aspecto de la presente invención se efectúa sintetizando enzimáticamente una pluralidad de estructuras de hidratos de carbono, cada una de las cuales está unida a, al menos, una posición direccionada de una pluralidad de posiciones de un soporte sólido único plano, dando como resultado una biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable.

Tal como se usa en el presente documento, en la sección de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones a continuación, los términos “direccionable” y “dirigido” se refieren tanto a la posición como a la identidad. Por tanto, la posición e identidad (composición) de una estructura de hidratos de carbono de una biblioteca según la presente invención se conocen por anticipado y esa estructura de hidratos de carbono es, por tanto, direccionable. Se entiende que la frase “una estructura de hidratos de carbono” se refiere a una pluralidad de moléculas de hidratos de carbono teniendo todas la misma estructura y localizadas en una posición direccionable y específica sobre el soporte sólido único plano.

Las estructuras de hidratos de carbono direccionables de una biblioteca según la presente invención se unen preferiblemente al soporte sólido por medio de un ligador (espaciador). El ligador según las realizaciones preferidas de la invención incluye al menos dos enlaces covalentes contiguos y es de una longitud de al menos 20 Ångstrom. Ligadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, un aminoácido, un péptido, una proteína no glicosilada, un lípido, una ceramida, dolicol fosfato, una ciclodextrina, un oligosacárido, un monosacárido, una cadena de alquilo, y un ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido).

El soporte sólido único plano sobre el que están unidas las estructuras de hidratos de carbono de una biblioteca según la presente invención puede incluir una plataforma plana direccionable.

Alternativamente, una placa de microtitulación, una membrana o un chip (por ejemplo, chip de silicona) sirven como el soporte sólido de plataforma plano según la presente invención.

Según una realización preferida actualmente de la invención, el soporte sólido único plano es un chip y se forman diferentes estructuras de hidratos de carbono de la pluralidad de estructuras de hidratos de carbono direccionables en pequeñas extensiones separadas entre sí no más de 2,25 mm (de centro a centro) sobre la superficie del chip, proporcionando así una densidad de al menos 20 estructuras de hidratos de carbono direccionables diferentes por centímetro cuadrado.

La sustancia de la que está hecho el soporte sólido puede ser, por ejemplo, poliestireno reticulado con divinilbenzeno, copolímero de bloque de polietilenglicol-poliestireno, poliamidas, poliacrilamida, polimetacrilamida, celulosa, vidrio, cuarzo, plástico o sílice.

Según una realización preferida de la presente invención, al menos una, preferiblemente al menos tres, más preferiblemente al menos diez, más preferiblemente al menos 100, más preferiblemente al menos 1000 de la pluralidad de estructuras de hidratos de carbono complejos direccionables de una biblioteca de la presente invención incluye al menos dos, tres, cuatro o al menos cinco o más unidades de sacáridos contiguas de una única especie. Tal como se detalló de manera adicional anteriormente en el presente documento y tal como se resolvió, una estructura de este tipo no es insignificante debido a la polimerización incontrolada.

Según otra realización preferida de la presente invención al menos una, preferiblemente al menos tres, más preferiblemente al menos diez, más preferiblemente al menos 100, más preferiblemente al menos 1000 de la pluralidad de estructuras de hidratos de carbono complejos direccionables de una biblioteca de la presente invención incluye al menos una, dos, tres, cuatro o al menos cinco o más ramificaciones.

Según todavía otra realización preferida de la presente invención al menos una, dos, tres o al menos cuatro de las ramificaciones están formadas de unidades de sacáridos idénticas de núcleo y de ramificaciones. Tal como se detalló de manera adicional anteriormente en presente documento y se resolvió, una estructura de este tipo no es insignificante especialmente si las antenas unidas a cada una de las ramificaciones difieren en la composición de unidades de sacáridos.

Según características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas, al menos una, preferiblemente al menos tres, más preferiblemente al menos diez, más preferiblemente al menos 100, más preferiblemente al menos 1000, de la pluralidad de estructuras de hidratos de carbono complejos direccionables incluye al menos 4, preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 7, más preferiblemente al menos 9, más preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 12, más preferiblemente al menos 15, 20, 25 o al menos 30, más preferiblemente al menos 50 o más unidades de sacáridos.

Dependiendo de su uso deseado, tal como se detalla de manera adicional a continuación en el presente documento, la pluralidad de estructuras de hidratos de carbono complejos direccionables de una biblioteca según la presente invención puede ser una representación que incluye hidratos de carbono complejos naturales o no naturales, por ejemplo, que se derivan de una fuente humana, tales como tejido, células o fluidos corporales de un ser humano. Alternativamente, la pluralidad de estructuras de hidratos de carbono complejos direccionables puede ser una representación de dominios (fragmentos) de al menos un hidrato de carbono complejo natural. Una biblioteca de este tipo, tal como se detalla de manera adicional en el presente documento, puede emplearse para identificar un sitio activo del hidrato de carbono complejo natural.

Según todavía otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para identificar un hidrato de carbono complejo que puede unirse a una entidad. El método según este aspecto de la presente invención se efectúa proporcionando una biblioteca combinatoria de hidratos de carbono complejos direccionable según cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento y seleccionando la biblioteca combinatoria de hidratos de carbono complejos direccionable con la entidad para identificar el hidrato de carbono complejo que puede unirse a la entidad.

Tal como se muestra a modo de ejemplo de manera adicional a continuación en el presente documento, puede usarse cualquier entidad para seleccionar una biblioteca combinatoria de hidratos de carbono complejos direccionable según la presente invención. Por ejemplo, la entidad puede ser un candidato para un material biológicamente activo, tal como un candidato a fármaco derivado de un origen sintético o natural. En este caso, el método según este aspecto de la invención sirve para identificar un hidrato de carbono complejo que es una diana para el candidato para el material biológicamente activo. Alternativamente, la entidad puede ser un ligando que se sabe que se une a un hidrato de carbono complejo natural específico. En este caso, la biblioteca combinatoria de hidratos de carbono complejos direccionable puede ser una representación de los dominios del hidrato de carbono complejo natural específico, mientras que el método sirve en este caso para identificar un dominio específico de los dominios que une el ligando para, así, identificar el sitio activo del hidrato de carbono complejo natural.

Según todavía otro aspecto la presente invención se proporciona un método de diagnóstico de un trastorno caracterizado por estructuras de hidratos de carbono complejos propias y no propias y obtención de anticuerpos frente a éstas. El método según este aspecto de la presente invención se efectúa proporcionando una biblioteca combinatoria de hidratos de carbono complejos direccionable que representa los hidratos de carbono complejos propios y no propios empleando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento para sintetizar una biblioteca de este tipo. La biblioteca combinatoria de hidratos de carbono complejos direccionable se hace reaccionar después con anticuerpos derivados de un paciente que se sospecha que padece el trastorno para así generar un patrón de las posiciones a las que se unen los anticuerpos, de modo que comparando ese patrón con un patrón conocido que caracteriza a un individuo sano, puede obtenerse un diagnóstico del trastorno.

Los trastornos que se sabe que están asociados con la producción o introducción de estructuras de hidratos de carbono complejos propios y/o no propios incluyen, pero no se limitan a, oncogenia, metástasis, embarazo, angiopatía, enfermedad del corazón, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad autoinmunitaria y trasplante de órganos. Las enfermedades neurodegenerativas incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedades degenerativas de los núcleos basales, enfermedades de motoneurona, encefalopatía espongiiforme ovina, encefalopatía espongiiforme y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, infertilidad, alergias, embriogenia, apoptosis y trastornos neurodegenerativos.

A continuación se resumen algunas estrategias empleadas mientras se seleccionan bibliotecas específicas generadas por el método según la presente invención.

Por tanto, con el fin de identificar los receptores de hidratos de carbono complejos, asociados a proteínas, lectinas y/o dianas farmacológicas, se selecciona una serie enzimáticamente combinatoria de hidratos de carbono complejos compuesta de estructuras de hidratos de carbono complejos conocidas de células humanas o estructuras novedosas de hidratos de carbono generadas a partir de mapeo de reducción frente a una variedad de sondas marcadas de fuentes tales como, homogeneizados de tejido humano marcado, receptores marcados, proteínas marcadas codificadas para colecciones EST, proteínas recombinantes marcadas, bibliotecas de presentación en fago, células marcadas de o bien tejidos humanos, patógenos o disoluciones que contienen mezclas de moléculas de proteínas marcadas de fuentes de tejido humano o de células patógenas. El objetivo de tal selección es identificar las moléculas marcadas de las fuentes mencionadas anteriormente que se unen específicamente a un hidrato de carbono complejo de la biblioteca. Tras el aislamiento y la caracterización, estas moléculas pueden someterse a prueba adicionalmente como posibles candidatos para farmacoterapia o dianas para farmacoterapia. Estas estrategias pueden emplearse también para identificar nuevos receptores, lectinas o cualquier proteína o molécula que se une a constituyentes de hidratos de carbono complejos específicos de la biblioteca.

Para identificar compuestos líder que se unen a un hidrato de carbono complejo específico, se seleccionan una biblioteca combinatoria enzimática de hidratos de carbono complejos de estructuras de hidratos de carbono complejos conocidas de células humanas o estructuras de hidratos de carbono novedosas generadas a partir del mapeo de reducción de células que se han vuelto patógenas o normales o patógenos frente a un grupo diverso de moléculas marcadas. El objetivo de esta selección es conseguir un entendimiento más claro de las interacciones específicas entre el hidrato de carbono complejo encontrado en o sobre estas células y el respectivo ligando de las mismas. Los ligandos caracterizados y aislados pueden entonces utilizarse como moduladores de actividades biológicas importantes, tales como comunicación de célula a célula, reconocimiento celular, desarrollo celular y metástasis de células tumorales.

Para la identificación de hidratos de carbono complejos bioactivos novedosos, una biblioteca de hidratos de carbono complejos, según la presente invención, está preparada compuesta de una serie diversa de estructuras de hidratos de carbono complejos, incluyendo estructuras tales que normalmente no se encuentran en la naturaleza. Entonces se selecciona esta biblioteca de hidratos de carbono complejos frente a sistemas de ensayo basados en células, o frente a moléculas diana marcadas microbianas o humanas definidas, tales como lectinas o receptores. Tal selección conduce a la identificación de nuevos candidatos farmacológicos basados en hidratos de carbono complejos. Alternativamente, tal selección conduce a la identificación de un hidrato de carbono complejo asociado a una enfermedad. Tal hidrato de carbono complejo asociado a una enfermedad puede usarse para obtener anticuerpos para esto, los anticuerpos pueden usarse después para identificar y aislar una glicoproteína que alberga el hidrato de carbono asociado a enfermedad, para así identificar la nueva proteína y genes asociados con esa enfermedad.

Para identificar un sitio activo de un hidrato de carbono complejo novedoso o conocido, se prepara una biblioteca según la presente invención compuesta de todos los fragmentos del dominio posibles de este hidrato de carbono complejo en particular. Como tal, estos fragmentos del dominio pueden entonces seleccionarse con un receptor marcado que normalmente se une al hidrato de carbono complejo que incluye tales dominios. La especificidad de unión para cada uno de los fragmentos del dominio puede entonces evaluarse para permitir el aislamiento del fragmento del dominio de un hidrato de carbono complejo en particular responsable de la actividad de unión, es decir, el sitio activo. Este objetivo puede realizarse en paralelo para varios de los pares receptor - hidrato de carbono complejo bien caracterizados.

La presente invención también permite el mapeo de anticuerpos frente a glicomarcadores propios o no propios encontrados en el suero sanguíneo de un paciente. Como tal, una biblioteca de hidratos de carbono complejos según la presente invención se sintetiza para incluir una serie diversa de glicomarcadores presentes en el suero sanguíneo de un paciente. Luego se selecciona esta biblioteca frente a conjuntos marcados de anticuerpos del suero de este paciente y puede implementarse un perfil de anticuerpos generado resultante como una herramienta anterior al diagnóstico para el cáncer y compatibilidad en el transplante de órganos.

También pueden usarse series específicas de glicoantígenos para la identificación de nuevos glicomarcadores relacionados con el cáncer, enfermedades cardiovasculares o transplante de órganos. Tales series de glicoantígenos se seleccionan según la presente invención frente a anticuerpos del suero marcados de una población diversa. El perfil de anticuerpos de un individuo enfermo puede entonces compararse con el perfil de la población sana. Esta comparación produce un perfil único de anticuerpos asociados con la respuesta inmunitaria frente a un estado de enfermedad y como tal, un hidrato de carbono complejo en particular que reacciona con un anticuerpo del perfil único se convierte en un marcador de diagnóstico para esa enfermedad en particular.

Objetos adicionales, ventajas y características novedosas de la presente invención se harán evidentes para los expertos habituales en la técnica con la examinación de los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención, tal como se definieron anteriormente en el presente documento y tal como se reivindican en la sección de las reivindicaciones a continuación, encuentra apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de manera no limitativa.

Los siguientes ejemplos detallan la estructura de hidratos de carbono complejos sintetizados usando una colección de enzimas seleccionadas de manera específica. Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en bioquímica que se describen a continuación son aquellos bien conocidos y empleados en la técnica. Como tal, se apreciará que los siguientes procedimientos de síntesis podrían realizarse con facilidad por un experto en la técnica.

En vista de los hallazgos de que los residuos de azúcar de las glucoproteínas desempeñan un papel importante en el control de la función celular y el reconocimiento celular, la investigación de la función de los hidratos de carbono en estados patológicos ha llevado a la asignación de algunos hidratos de carbono complejos como marcadores específicos de tumores (Orntoft, 1995). En casi todos los carcinomas se producen cambios drásticos en la glucosilación de proteínas (Hakomori, 1989), lo cual refleja regularmente cambios en las rutas de biosíntesis.

Por ejemplo, el bloqueo de las rutas biosintéticas de glicosilación conlleva a una sobre producción de estructuras que se encuentran típicamente en cantidades pequeñas en células normales. Además, las alteraciones en las rutas de glicosilación pueden llevar al uso de rutas alternativas, lo que, a su vez, conduce a la formación de nuevas estructuras de hidratos de carbono complejas que normalmente no están presentes dentro o sobre las células. Tal regulación de rutas de glicosilación en la célula pueden con frecuencia atribuirse a actividades de la glicosiltransferasa.

Se considera que las estructuras alteradas de hidratos de carbono de glicoproteínas de varios tejidos tumorales, son la base del comportamiento anómalo de las células tumorales, comportamiento que incluye la metástasis y la invasión de células tumorales en tejidos sanos (Kobata, 1998).

Los marcadores de tumores son importantes para el diagnóstico y el tratamiento de células malignas. Cualquier epítipo específico presentado por las células tumorales, tales como péptidos, glicopéptidos, glicolípidos, o cualesquiera combinaciones de los mismos, pueden ser marcadores posibles. Estos epítopes únicos pueden identificarse específicamente por anticuerpos monoclonales y por esto los patrones únicos de glicosilación se investigaron, y se investigan intensamente como marcadores de tumores posibles para la inmunoterapia y diagnóstico del cáncer (Ronin, 1998).

El uso de la presente invención permite el uso de marcadores de tumores no sólo para la inmunoterapia y diagnóstico sino también como dianas posibles para la farmacoterapia. Con este fin, una serie combinatoria que incluye tanto hidratos de carbono complejos específicos de tumor (TSCC) como estructuras de hidratos de carbono normales permitirían el aislamiento de nuevos fármacos candidatos mediante la identificación de moléculas que se unen específica y únicamente a estructuras de hidratos de carbono complejos asociadas a condiciones tumorales.

Ejemplo 1

El cáncer de pulmón es una enfermedad de proporciones casi epidémicas. Aproximadamente 157.000 casos nuevos que causaron 142.000 muertes se registraron en 1990 (Faber, 1991). El carcinoma escamoso de pulmón (CEP) que es del tipo del cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), representa aproximadamente el 35% de todos los cánceres de pulmón. Se correlaciona estrechamente con fumar y se diagnostica con más frecuencia en varones. El carcinoma escamoso se origina en la región central o hilar del pulmón y puede cavitar cuando se encuentra en una ubicación periférica. Se clasifica como una forma de cáncer grave y maligna. Aunque se diferencia mal, el SLC presenta antígenos únicos de hidratos de carbono complejos únicos asociados tanto con glicoproteínas unidas a la membrana como con moléculas de tipo mucina que se liberan en el sistema circulatorio y sirven como marcadores de suero (Martensson, 1988).

Las tablas siguientes describen los componentes y módulos enzimáticos (ME) necesarios para la síntesis de una biblioteca de hidratos de carbono complejos para la selección y aislamiento de compuestos químicos, proteínas u otras moléculas que se unen a marcadores de SLC de manera específica. Tales moléculas pueden servir como posibles nuevos candidatos a fármacos o fármacos útiles para la prevención de la metástasis del cáncer escamoso de pulmón.

Las tablas 9-10 presentan hidratos de carbono complejos de estructuras anómalas de cadenas de hidratos de carbono del SLC liberadas en el sistema circulatorio (marcadas A1, A2, A3, A8, A9 y A10), todos los posibles fragmentos derivados de tales cadenas de hidratos de carbono del SLC (asociadas con A1, A2, A3, A8, A9 y A10 mediante a1, a2, a3, a8, a9 y a10, respectivamente), antígenos de sangre normal (marcados A4, A5, A6, A7, A11 y A12) y todos los posibles fragmentos de antígenos de sangre normal derivados de los mismos (asociados con A4, A5, A6, A7, A11 y A12 mediante a4, a5, a6, a7, a11 y a12, respectivamente).

TABLA 9

Fuente	Hidratos de carbono	ME
A1 SLC	$ \begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow6)} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \quad \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)-D-Glc} \\ \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow3)-}\beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)} \end{array} $	1
A2 SLC	$ \begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow6)} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \quad \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)-D-Glc} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow4)} \quad \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)} \\ \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow3)} \end{array} $	2
A3 SLC	$ \begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)-}\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow3)} \quad \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow6)} \\ \quad \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \quad \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)-D-Glc} \\ \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow3)-}\beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)} \end{array} $	3
A4 Antígeno HI de sangre normal	$\alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow2)-}\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow3)-}\beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)-}\beta\text{-D-Glc-(2\rightarrow1)-}$ Corenida	4
A5 Antígeno HII de sangre normal	$\alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow2)-}\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)-}\beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)-}\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)-}\beta\text{-D-Glc-(1\rightarrow1)-}$ Coramida	5
A6;a7 Antígeno Lewis a normal	$ \begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)-}\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)-}\beta\text{-D-Glc-(1\rightarrow1)-} \text{Coramida} \\ \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow3)} \end{array} $	6
A7 Antígeno Lewis b normal	$ \begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)-}\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)-}\beta\text{-D-Glc-(1\rightarrow1)-} \text{Coramida} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow2)-}\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow3)} \end{array} $	7
A8 SLC	$ \begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)-}\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow3)} \quad \text{D-Glc} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \end{array} $	8
A9 SLC	$ \begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow3)-}\beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)-}\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)-}\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)-D-Glc} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \end{array} $	9
A10 SLC	$ \begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)-}\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow3)} \quad \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)-}\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)-D-Glc} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \end{array} $	10
All Antígeno Lewis x normal	$ \begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)-}\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)-}\beta\text{-D-Glc-(1\rightarrow1)-} \text{Coramida} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \end{array} $	11
A12 Antígeno Lewis x normal	$ \begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow2)-}\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)-}\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)-}\beta\text{-D-Glc-(1\rightarrow1)-} \text{Coramida} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \end{array} $	12

TABLA 10

Fuente	Subfragmentos de hidratos de carbono	ME
a1;a2;a3; a8; a9;a10	β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glc	13
a8	α -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)-D-Glc	14
a1;a2;a3; a4; a6;a7; a8;a9; a10	β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-GlcpNac-(1 $\rightarrow$	15
a1;a2;a3; a9; a10	β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNac-(1 $\rightarrow$	16
a1;a2;a3	β -D-GlcpNac-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$	17
a1;a2;a3; a4; a5;a6; a7;a8; a9; a10;a11; a12	β -D-GlcpNac-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$	18
a4;a5;a7	α -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 2) - β -D-Galp- (1 $\rightarrow$	19
a2;a3;a6; a7; a8;a10	α -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 4) - β -D-GlcpNac-(1 $\rightarrow$	20
a1;a2;a3; a9; a10; a11;a12	α -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-GlcpNac-(1 $\rightarrow$	21
a1;a2;a3	β -D-GlcpNac-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glc	22
a1;a2;a3; a9; a10	β -D-GlcpNac-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glc	23
a1;a2;a3; a4; a6;a7; a8;a9; a10	β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-GlcpNac-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$	24
a1;a2;a3	β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNac-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$	25
5;a9;a10;a 11;a12	β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4) - β -D-GlcpNac-(1 $\rightarrow$ 3) - β -D-Galp-(1 $\rightarrow$	26
a1;a2;a3	α -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-GlcpNac-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$	27
a2;a3;a6; a7; a8	α -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNac-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$	28
a4;a7	α -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3) - β -D-GlcpNac-(1 $\rightarrow$	29
a5	α -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNac-(1 $\rightarrow$	30
a9;a10; a11; a12	α -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-GlcpNac-(1 $\rightarrow$ 3) - β -D-Galp-(1 $\rightarrow$	31

Fuente	Subfragmentos de hidratos de carbono	ME
a9;a10	α -L-Fucp-(1→3)- β -D-GlcpNAc-(1→3)- β -D-Galp-(1→4)-D-Glc	32
a2	α -L-Fucp-(1→4)- β -D-GlcpNAc-(1→3)- β -D-Galp-(1→4)-D-Glc	33
a1;a2;a3;	α -L-Fucp-(1→3)- β -D-GlcpNAc-(1→6)- β -D-Galp-(1→4)-D-Glc	34
a9;a10	β -D-Galp-(1→4)- β -D-GlcpDNAc-(1→3)- β -D-Galp-(1→4)-D-Glc	35
a1;a2;a3	β -D-Galp-(1→4)- β -D-GlcpNAc-(1→6)- β -D-Galp-(1→4)-D-Glc	36
a1;a2;a3; a8	β -D-Galp-(1→3)- β -D-GlcpNAc-(1→3)- β -D-Galp-(1→4)-D-Glc	37
a4;a7	α -L-Fucp-(1→2)- β -D-Galp-(1→3)- β -D-GlcpNAc-(1→3)- β -D-Galp-(1→	38
a5;a12	α -L-Fucp-(1→2)- β -D-Galp-(1→4)- β -D-GlcpNAc-(1→3)- β -D-Galp-(1→	39
a9;a10	β -D-GlcpNAc-(1→3)- β -D-Galp-(1→4)- β -D-GlcpNAc-(1→3)- β -D-Galp-(1→	40
a9;a10	β -D-GlcpNAc-(1→3)- β -D-Galp-(1→4)- β -D-GlcpNAc-(1→3)- β -D-Galp-(1→4)-D-Glc	41
a3	β -D-GlcpNAc-(1→3)- β -D-Galp-(1→4)- β -D-GlcpNAc-(1→6)- β -D-Galp-(1→4)-D-Glc	42
a3	α -L-Fucp-(1→4)- β -D-GlcpNAc-(1→3)- β -D-Galp-(1→4)- β -D-GlcpNAc-(1→6)- β -D-Galp-(1→	43
a3	β -D-Galp-(1→3)- β -D-GlcpNAc-(1→3)- β -D-Galp-(1→4)- β -D-GlcpNAc-(1→6)- β -D-Galp-(1→	44
a9;a10	β -D-Galp-(1→3)- β -D-GlcpNAc-(1→3)- β -D-Galp-(1→4)- β -D-GlcpNAc-(1→3)- β -D-Galp-(1→	45
a3	β -D-Galp-(1→3)- β -D-GlcpNAc-(1→3)- β -D-Galp-(1→4)- β -D-GlcpNAc-(1→6)- β -D-Galp-(1→4)- β -Glc	46
a10	* véase a continuación	47
a3	α -L-Fucp-(1→4)- β -D-GlcpNAc-(1→3)- β -D-Galp-(1→4)- β -D-GlcpNAc-(1→6)- β -D-Galp-(1→4)-D-Glc	48
a9	β -D-Galp-(1→3)- β -D-GlcpNAc-(1→3)- β -D-Galp-(1→4)- β -D-GlcpNAc-(1→3)- β -D-Galp-(1→4)-D-Glc	49
a8	$ \begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp-(1→4)} \\ \\ \beta\text{-Glc} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1→3)} \end{array} $	50
a1;a2;a3; 9; a10;a11; a12	$ \begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp-(1→4)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcpNAc-(1→} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1→3)} \end{array} $	51
a1;a2;a3	$ \begin{array}{c} \beta\text{-D-GlcpNAc-(1→6)} \\ \\ \beta\text{-D-Galp-(1→} \\ \\ \beta\text{-D-GlcpNAc-(1→3)} \end{array} $	52
a2;a6;a7; a8; a10	$ \begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp-(1→4)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcpNAc-(1→} \\ \\ \beta\text{-D-Galp-(1→3)} \end{array} $	53
a2	$ \begin{array}{c} \beta\text{-D-GlcpNAc-(1→6)} \\ \\ \beta\text{-D-Galp-(1→} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1→4)-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1→3)} \end{array} $	54
9;a10;a11; a12	$ \begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp-(1→4)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcpNAc-(1→3)-}\beta\text{-D-Galp-(1→} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1→3)} \end{array} $	55

Fuente	Subfragmentos de hidratos de carbono	ME
a12	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow2)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow) \\ \quad \quad \quad \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow3) \end{array}$	56
a2;a3;a6; a7; a8;a10	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow4) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow5)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow3) \end{array}$	57
a7	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow4) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow) \\ \quad \quad \quad \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow2)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow3) \end{array}$	58
a3;a9;a10	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow3)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow) \\ \quad \quad \quad \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow3) \end{array}$	59
a1;a2;a3	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow6) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4)-\beta\text{-Glc} \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow3) \end{array}$	60
a1;a2;a3	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow3)-\beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow6) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow3) \end{array}$	61
a1;a2;a3	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow6)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow) \\ \quad \quad \quad \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow3) \end{array}$	62
a1;a2;a3	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow6) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow3)-\beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow3) \end{array}$	63
a1;a2;a3	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow6)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow) \\ \quad \quad \quad \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow3) \end{array}$	64
a1;a2;a3	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow6) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4)-\beta\text{-Glc} \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow3)-\beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow3) \end{array}$	65
a1;a2;a3	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow6)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4)-\beta\text{-Glc} \\ \quad \quad \quad \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow3) \end{array}$	66
a1;a2;a3	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow3)-\beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow6) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4)-\beta\text{-Glc} \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow3) \end{array}$	67
a1;a2;a3	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4)-\beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow6) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4)-\beta\text{-Glc} \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow3) \end{array}$	68
a1;a2;a3	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow3)-\beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow6) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow3)-\beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow3) \end{array}$	69

Fuente	Subfragmentos de hidratos de carbono	ME
a1;a2	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow6)} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)} \end{array}$	70
a2	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow6)} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\alpha\text{-Glc} \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)} \end{array}$	71
a2;a8;a9	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow4)} \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\alpha\text{-Glc} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	72
a2	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow6)} \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow4)} \quad \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)} \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	73
a2	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow6)} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)} \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)} \end{array}$	74
a2	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow6)} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)} \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)} \end{array}$	75
a8	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)} \\ \alpha\text{-Glc} \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	76
a8	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)} \\ \alpha\text{-Glc} \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	77
a12	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow2)}-\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)} \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)} \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	78
a9;a10	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)} \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)} \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	79
a9;a10	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)} \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\alpha\text{-Glc} \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	80
a7	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow4)} \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)} \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow2)}-\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	81
a10	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow4)} \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow6)} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	82
a3;a9;a10	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)} \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1\rightarrow6)} \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	83

Fuente	Subfragmentos de hidratos de carbono	ME
a1;a2;a3	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow3)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow6) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4)-\text{D-Glc} \\ \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow3)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow3) \end{array}$	84
a1;a2;a3	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow6) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4)-\text{D-Glc} \\ \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow3)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow3) \end{array}$	85
a1;a2;a3	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow6) \\ \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow3) \quad \quad \quad \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4)-\text{D-Glc} \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow3) \end{array}$	86
a1;a2;a3	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow6) \\ \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow3) \quad \quad \quad \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4) \\ \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow3)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow3) \end{array}$	87
a2	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow6) \\ \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow4) \quad \quad \quad \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4)-\text{D-Glc} \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow3) \end{array}$	88
a2	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow6) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4)-\text{D-Glc} \\ \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow4)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow3) \end{array}$	89
a2	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow3)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow6) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4)-\text{D-Glc} \\ \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow4)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow3) \end{array}$	90
a2	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow3)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow6) \\ \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow4) \quad \quad \quad \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow3) \end{array}$	91
a2	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow6) \\ \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow4) \quad \quad \quad \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow3) \\ \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow3) \end{array}$	92
a2	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow6) \\ \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow3) \quad \quad \quad \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4) \\ \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow4)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow3) \end{array}$	93
a3;a10	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow4) \\ \quad \quad \quad \beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow3)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4) \\ \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow3) \quad \quad \quad \beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow4) \\ \quad \quad \quad \alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow3) \end{array}$	94

ES 2 277 588 T3

Fuente	Subfragmentos de hidratos de carbono	ME
a3	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \\ \\ \beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow6)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow} \\ \\ \beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	95
a3	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow6)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	96
a3	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow6)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	97
a9;a10	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-glcp} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	98
a9;a10	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	99
a2	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow6)} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-glcp} \\ \\ \beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow3)} \\ \\ \beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	100
a2	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow6)} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-glcp} \\ \\ \beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow3)} \\ \\ \beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	101
a2	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow6)} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-glcp} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow3)} \end{array}$	102
a10	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-glcp} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	103
a3	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow6)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-glcp} \\ \\ \beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	104
a3	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow6)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-glcp} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	105
a3	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow6)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-glcp} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	106
a3	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow3)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow4)} \\ \\ \beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow3)} \\ \\ \beta\text{-D-glcpnac-(1\rightarrow6)}-\beta\text{-D-glcp-(1\rightarrow} \\ \\ \alpha\text{-L-Fucp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	107

[illegible]

101520253035404550556062

La Tabla 11 incluye una lista de los ME requeridos para la síntesis de la colección de hidratos de carbono complejos descritos en las tablas 9-10.

TABLA 11

ME	Primer monosacárido inmovilizado	Secuencia de RE (los detalles de RE se encuentran en la tabla 7).
1	Glc-S	<i>D9,H15,D10,H16,D7,B2</i>
2	Glc-S	<i>D9,H15,D10,B6,H16,D7,B2</i>
3	Glc-S	<i>D9,H15,D10,H16,D7,B2,H20,D10,B6</i>
4	Glc-S	<i>D9,H15,D10,B1</i>
5	Glc-S	<i>D9,H15,D7,B1</i>
6	Glc-S	<i>D9,H15,D10,B6</i>
7	Glc-S	<i>D9,H15,D10,B6,D1</i>
8	Glc-S	<i>D9,H15,D10,B6,B7</i>
9	Glc-S	<i>D9,H15,D7,H3,B2,D10</i>
10	Glc-S	<i>D9,H15,D7,H3,B2,D10,B6</i>
11	Glc-S	<i>D9,H15,D7,B2</i>
12	Glc-S	<i>D9,H15,D7,B2,B1</i>
13	Glc-S	<i>D9</i>
14	Glc-S	<i>B8</i>
15	GlcNAc-S	<i>D10</i>
16	GlcNAc-S	<i>D7</i>
17	Gal-S	<i>H21</i>
18	Gal-S	<i>H22</i>
19	Gal-S	<i>B1</i>
20	GlcNAc-S	<i>B9</i>
21	GlcNAc-S	<i>B10</i>
22	Gal-S	<i>D9,H21</i>
23	Gal-S	<i>D9,H22</i>
24	Gal-S	<i>H22,D10</i>
25	Gal-S	<i>H21,D7</i>
26	Gal-S	<i>H22,D7</i>
27	Gal-S	<i>H21,B10</i>
28	Gal-S	<i>H22,B9</i>

ES 2 277 588 T3

ME	Primer monosacárido inmovilizado	Secuencia de RE (los detalles de RE se encuentran en la tabla 7):
29	GlcNAc-S	D10,B1
30	GlcNAc-S	D7,B1
31	Gal-S	H22,B10
32	Glc-S	D9,H22,B10
33	Glc-S	D9,H22,B9
34	Glc-S	D9,H21,B10
35	Glc-S	D9,H22,D7
36	Glc-S	D9,H21,D7
37	Glc-S	D9,H22,D10
38	Gal-S	H22,D10,B1
39	Gal-S	H22,D7,B1
40	Gal-S	H22,D7,H3
41	Glc-S	D9,H15,D7,H3
42	Glc-S	D9,H21,D7,H3
43	Gal-S	H21,D7,H3,B9
44	Gal-S	H21,D7,H3,D10
45	Gal-S	H22,D7,H3,D10
46	Glc-S	D9,H21,D7,H3,D10
47	Glc-S	D9,H22,D7,H3,B9
48	Glc-S	D9,H21,D7,H3,B9
49	Glc-S	D9,H22,D7,H3,D10
50	Glc-S	D9,B7
51	GlcNAc-S	D7,B2
52	Gal-S	H21,H23
53	GlcNAc-S	D10,B6
54	Gal-S	H21,H23,B11
55	Gal-S	H22,D7,B2
56	GlcNAc-S	D7,B2,B1
57	Gal-S	H22,D10,B6
58	GlcNAc-S	D10,B6,B1
59	GlcNAc-S	D7,B2,H22
60	Glc-S	D9,H21,H23
61	Gal-S	H21,H23,B12
62	Gal-S	H21,D7,B2
63	Gal-S	H21,H23,D11
64	Gal-S	H21,D7,B2
65	Glc-S	D9,H21,H23,D11
66	Glc-S	D9,H21,D7,B2

ES 2 277 588 T3

ME	Primer monosacárido inmovilizado	Secuencia de RE (los detalles de RE se encuentran en la tabla 7):
67	Glc-S	D9, H21, H23, B12
68	Glc-S	D9, H21, H23, D12
69	Gal-S	H21, H23, B12, D11
70	Gal-S	H21, H23, D11, D12
71	Glc-S	D9, H21, H23, B11
72	Glc-S	D9, H22, D11, B6
73	Gal-S	H21, H23, D11, B6
74	Gal-S	H21, H23, D12, B11
75	Gal-S	H21, H23, B11, B12
76	Glc-S	D9, B7, H22, D11
77	Glc-S	D9, B7, H22, B11
78	Gal-S	H22, D7, B2, B1
79	Gal-S	H22, D7, H3, B2
80	Glc-S	D9, H22, D7, B2
81	Gal-S	H22, D11, B6, B1
82	GlcNAc-S	D10, H3, D11, B6
83	GlcNAc-S	D7, B2, H3, D11
84	Glc-S	D9, H21, H23, D11, B12
85	Glc-S	D9, H21, H23, D11, D12
86	Glc-S	D9, H21, H23, D12, B2
87	Gal-S	H21, H23, D12, B2, D11
88	Glc-S	D9, H21, H23, D11, B6
89	Glc-S	D9, H21, H23, D12, B11
90	Glc-S	D9, H21, H23, B11, B12
91	Gal-S	H21, H23, B12, D10, B6
92	Gal-S	H21, H23, D12, D10, B6
93	Gal-S	H21, H23, B11, D7, B2
94	GlcNAc-S	D7, B2, H3, D10, B6
95	Gal-S	H21, D12, H3, D10, B6
96	Gal-S	H21, D12, B2, H3, D10
97	Gal-S	H21, D12, B2, H3, B9
98	Glc-S	D9, H15, D7, B2, H22
99	Gal-S	H22, D7, B2, H22, D10
100	Glc-S	D9, H21, H23, B12, D11, B6
101	Glc-S	D9, H21, H23, D12, D11, B6
102	Glc-S	D9, H21, H23, D12, B2, B11
103	Glc-S	D9, H22, D7, B2, H22, B11
104	Glc-S	D9, H21, D7, H3, D10, B6

ME	Primer monosacárido inmovilizado	Secuencia de RE (los detalles de RE se encuentran en la tabla 7):
105	Glc-S	D9,H21,D7,B2,H22,D11
106	Glc-S	D9,H21,D7,B2,H22,B11
107	Gal-S	H21,D7,B2,H22,D11,B6
108	Gal-S	H21,D12,H22,D11,B6,H23
109	Gal-S	H21,H23,D12,B2,D11,H20
110	Gal-S	H21,D12,H20,B2,D11,H23
111	Gal-S	H21,D12,H20,B2,B11,H23
112	Gal-S	H21,D12,H20,B9,H23,D11
113	Gal-S	H22,D7,B2,H22,D11,B6
114	Glc-S	D9,H21,D7,B2,H22,D11,B6
115	Glc-S	D9,H21,D12,H22,D11,B6,H23
116	Glc-S	D9,H21,H23,D12,B2,H3,D11
117	Glc-S	D9,H21,D12,B2,H3,D11,H23
118	Glc-S	D9,H21,D12,B2,H3,B11,H23
119	Glc-S	D9,H21,D12,H3,B11,H23,D11
120	Gal-S	H21,D12,B2,H3,D11,B6,H23
121	Gal-S	H21,D12,H3,D11,B6,H23,D11
122	Gal-S	H21,D12,B2,H3,B9,H23,D11
123	Gal-S	H21,D12,B2,H3,D11,H23,D11
124	Glc-S	D9,H21,D12,B2,H3,D11,B6,H23
125	Glc-S	D9,H21,D12,B2,H3,D11,B6,H23
126	Glc-S	D9,H21,D12,B2,H3,D11,H23,D11
127	Glc-S	D9,H21,D12,H3,D11,B6,H23,D11

Ejemplo 2

La gonadotropina coriónica humana (GCh) es una hormona glicoprotéica producida por las células de trofoblasto de la placenta. Se detectan niveles altos de GCh en muestras de sangre y orina tomadas de pacientes con una variedad de enfermedades trofoblásticas. Como tal, los niveles en orina y en suero de GCh se han empleado como marcadores útiles para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades trofoblásticas, así como también son marcadores del embarazo. Un estudio que compara los hidratos de carbono complejos liberados de las GCh purificadas de la orina de mujeres embarazadas con aquellos purificados de la orina de pacientes con enfermedad trofoblástica, reveló la existencia de varias alteraciones en las cadenas de azúcares de GCh purificada de estos últimos (Mizuochi, 1983; Endo, 1987).

Las tablas 12-14 presentan los componentes y los ME necesarios para sintetizar una biblioteca de hidratos de carbono complejos para seleccionar y aislar moléculas que se unen específicamente a los marcadores anómalos de la GCh o sus subfragmentos. Las tablas 12-13 enumeran estructuras de hidratos de carbono complejos incorporadas a series específicas para GCh. Tales estructuras incluyen cadenas de azúcar anómalas representadas en las GCh presentes en enfermedades trofoblásticas malignas (marcadas B5, B6, B7 y B8), todas las posibles cadenas de azúcar fragmentadas de tales GCh presentes en enfermedades trofoblásticas malignas (asociadas con B5, B6, B7 y B8 mediante b5, b6, b7 y b8, respectivamente), cadenas de azúcares normales tal como se encuentran típicamente en las GCh de presentes en la orina de mujeres embarazadas (marcadas B1, B2, B3 y B4) y todos sus posibles fragmentos (asociados con B1, B2, B3 y B4 mediante b1, b2, b3 y b4, respectivamente). La tabla 14 presenta la colección de los ME que se necesitan para la síntesis de hidratos de carbono complejos de las tablas 12-13.

TABLA 12

Fuente	Hidrato de carbono	ME
B1; b5 Normal	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fuc-(1\rightarrow6)} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow2)}-\alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow6)} \\ \alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow4)} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow2)}-\alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	1
B2; b1;b5; b6 Normal	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fuc-(1\rightarrow6)} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow2)}-\alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow6)} \\ \alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow2)}-\alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	2
B3; b1;b2 Normal	$\begin{array}{c} \alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow6)} \\ \alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow2)}-\alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow3)} \end{array}$	3
B4; b1;b5; b7 Normal	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fuc-(1\rightarrow6)} \\ \alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow6)} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow2)}-\alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow3)} \\ \alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow4)} \end{array}$	4
B5 Anómalo	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fuc-(1\rightarrow6)} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow2)}-\alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow6)} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow4)} \\ \alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow4)} \\ \alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow3)} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow2)} \end{array}$	5
B6 Anómalo	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fuc-(1\rightarrow6)} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow2)}-\alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow6)} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow4)} \\ \alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac} \\ \alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow3)} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow2)} \end{array}$	6
B7; b5 Anómalo	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fuc-(1\rightarrow6)} \\ \alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow6)} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow4)} \\ \alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow4)} \\ \alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow3)} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow2)} \end{array}$	7
B8; b5;b6; b7 Anómalo	$\begin{array}{c} \alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow6)} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow4)} \\ \alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac} \\ \alpha\text{-D-Manp-(1\rightarrow3)} \\ \beta\text{-D-Galp-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow2)} \end{array}$	8

TABLA 13

Fuente	Subfragmentos de hidratos de carbono	ME
b1;b4;b5; b7	$\alpha\text{-L-Fuc-(1\rightarrow6)}-\beta\text{-D-GlcpNac}$	9
b1;b2;b3; b4;b5;b6; b7;b8	$\beta\text{-D-GlcpNac-(1\rightarrow4)}-\beta\text{-D-GlcpNac}$	10

Fuente	Subfragmentos de hidratos de carbono	ME
b1;b2;b3; b4;b5;b6; b7;b8	α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc	11
b1;b2;b3; b4;b5;b6; b7;b8	α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc	12
b1;b2;b3; b4;b5;b6; b7;b8	α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc	13
b1;b2;b5; b6	β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc	14
b1;b2;b3; b4;b5;b6; b7;b8	β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc	15
b5;b6;b7; b8	β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc	16
b1;b2;b5; b6	β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc	17
b1;b2;b3; b4;b5;b6; b7;b8	β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc	18
b5;b6;b7; b8	β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc	19
b5;b6;b7; b8	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow4) \\ \\ \alpha\text{-D-Manp}-(1\rightarrow6) \\ \\ \beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow2) \end{array}$	20
b1;b4;b5; b7	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fuc}-(1\rightarrow6) \\ \\ \beta\text{-D-GlcpNAc} \\ \\ \beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow4) \end{array}$	21
b5;b6;b7; b8	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow4) \\ \\ \alpha\text{-D-Manp}-(1\rightarrow6) \\ \\ \beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow2) \end{array}$	22
b5;b6;b7; b8	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow4) \\ \\ \alpha\text{-D-Manp}-(1\rightarrow6) \\ \\ \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow2) \end{array}$	23
b1;b4;b5; b7	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fuc}-(1\rightarrow6) \\ \\ \beta\text{-D-GlcpNAc} \\ \\ \alpha\text{-D-Manp}-(1\rightarrow4)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow4) \end{array}$	24
b5;b6;b7; b8	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow4) \\ \\ \alpha\text{-D-Manp}-(1\rightarrow6) \\ \\ \beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow4)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow2) \end{array}$	25
b5;b6;b7; b8	$\begin{array}{c} \alpha\text{-D-Manp}-(1\rightarrow6) \\ \\ \beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow4) \quad \alpha\text{-D-Manp}-(1\rightarrow4) \\ \\ \alpha\text{-D-Manp}-(1\rightarrow3) \\ \\ \beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow2) \end{array}$	26

ES 2 277 588 T3

Fuente	Subfragmentos de hidratos de carbono	ME
b5;b6;b7; b8	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-GlcNAc-(1+4)} \\ \\ \alpha\text{-D-Manp-(1+3)}-\alpha\text{-D-Manp-(1+4)} \\ \\ \beta\text{-D-Galp-(1+4)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1+2)} \end{array}$	27
b5;b6;b7; b8	$\begin{array}{c} \alpha\text{-D-Manp-(1+6)} \\ \\ \alpha\text{-D-Manp-(1+4)} \\ \\ \beta\text{-D-Galp-(1+4)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1+4)}-\alpha\text{-D-Manp-(1+3)} \end{array}$	28
b1;b4;b5; b7	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fuc-(1+6)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc} \\ \\ \alpha\text{-D-Manp-(1+6)}-\alpha\text{-D-Manp-(1+4)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1+4)} \end{array}$	29
b1;b4;b5; b7	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fuc-(1+6)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc} \\ \\ \alpha\text{-D-Manp-(1+3)}-\alpha\text{-D-Manp-(1+4)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1+4)} \end{array}$	30
b5;b6;b7; b8	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp-(1+4)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1+4)} \\ \\ \alpha\text{-D-Manp-(1+3)}-\alpha\text{-D-Manp-(1+4)} \end{array}$	31
b5;b6	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-GlcNAc-(1+2)}-\alpha\text{-D-Manp-(1+6)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1+4)} \\ \\ \alpha\text{-D-Manp-(1+3)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1+2)} \end{array}$	32
b5;b6;b7; b8	$\begin{array}{c} \alpha\text{-D-Manp-(1+6)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1+4)} \\ \\ \alpha\text{-D-Manp-(1+3)} \\ \\ \beta\text{-D-Galp-(1+4)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1+2)} \end{array}$	33
b1;b2;b5; b6	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-GlcNAc-(1+2)}-\alpha\text{-D-Manp-(1+6)} \\ \\ \alpha\text{-D-Manp-(1+4)} \\ \\ \beta\text{-D-Galp-(1+4)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1+4)}-\alpha\text{-D-Manp-(1+3)} \end{array}$	34
b1;b4;b5; b7	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fuc-(1+6)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1+2)}-\alpha\text{-D-Manp-(1+3)}-\alpha\text{-D-Manp-(1+4)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1+4)} \end{array}$	35
b1;b5	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fuc-(1+6)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1+2)}-\alpha\text{-D-Manp-(1+6)}-\alpha\text{-D-Manp-(1+4)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1+4)} \end{array}$	36
b5;b6;b7; b8	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fuc-(1+6)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1+4)}-\alpha\text{-D-Manp-(1+3)}-\alpha\text{-D-Manp-(1+4)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1+4)} \end{array}$	37
b1;b5	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fuc-(1+6)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc} \\ \\ \beta\text{-D-Galp-(1+4)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1+2)}-\alpha\text{-D-Manp-(1+6)}-\alpha\text{-D-Manp-(1+4)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1+4)} \end{array}$	38
b1;b4;b5; b7	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Fuc-(1+6)} \\ \\ \beta\text{-D-GlcNAc} \\ \\ \beta\text{-D-Galp-(1+4)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1+2)}-\alpha\text{-D-Manp-(1+3)}-\alpha\text{-D-Manp-(1+4)}-\beta\text{-D-GlcNAc-(1+4)} \end{array}$	39

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

La tabla 14 incluye una lista de los ME requeridos para la síntesis de la colección de hidratos de carbono complejos descritos en las tablas 12-13.

TABLA 14

ME	Primer monosacárido inmovilizado	Secuencia de RE (los detalles de RE se encuentran en la tabla 7)
1	GlcNac-S	<i>H17,C1,C4,H8,C5,H10,D7,B3</i>
2	GlcNac-S	<i>H17,C1,C4,H8,C5,H10,D7</i>
3	GlcNac-S	<i>H17,C1,C4,H8,C5,D7,H10</i>
4	GlcNac-S	<i>H17,C1,C4,H8,C5,D7,H10,D7,B3</i>
5	GlcNac-S	<i>H17,C1,C4,H8,H9,C5,H10,D7,B3</i>
6	GlcNac-S	<i>H17,C1,C4,H8,H9,C5,H10,D7</i>
7	GlcNac-S	<i>H17,C1,C4,H8,H9,C5,D7,B3</i>
8	GlcNac-S	<i>H17,C1,C4,H8,H9,C5,D7,B3</i>
9	GlcNac-S	<i>B4</i>
10	GlcNac-S	<i>H17</i>
11	GlcNac-S	<i>H17,C1</i>
12	GlcNac-S	<i>H17,C1,C7</i>
13	GlcNac-S	<i>H17,C1,C4</i>
14	GlcNac-S	<i>H17,C1,C7,H10</i>
15	GlcNac-S	<i>H17,C1,C4,H8</i>
16	GlcNac-S	<i>H17,C1,C4,H9</i>
17	GlcNac-S	<i>H17,C1,C7,H10,D7</i>
18	GlcNac-S	<i>H17,C1,C4,H8,D7</i>
19	GlcNac-S	<i>H17,C1,C4,H9,D7</i>
20	D-Man- α -(1,0)-S	<i>H18,H19</i>
21	GlcNac-S	<i>H17,B5</i>
22	D-Man- α -(1,0)-S	<i>H18,D7,H19</i>
23	D-Man- α -(1,0)-S	<i>H18,H19,D7</i>
24	GlcNac-S	<i>H17,C1,B3</i>
25	D-Man- α -(1,0)-S	<i>H18,H19,D7</i>
26	D-Man- α -(1,0)-S	<i>C8,H8,H9,C7</i>
27	D-Man- α -(1,0)-S	<i>C8,H8,D7,H9</i>
28	D-Man- α -(1,0)-S	<i>C8,H8,D7,C7</i>
29	GlcNac-S	<i>H17,C1,C7,B3</i>
30	GlcNac-S	<i>H17,C1,C4,B3</i>
31	D-Man- α -(1,0)-S	<i>C8,H8,H9,D7</i>
32	D-Man- α -(1,0)-S	<i>C8,H8,H9,C7,H10</i>
33	D-Man- α -(1,0)-S	<i>C8,H8,D7,H9,C7</i>
34	D-Man- α -(1,0)-S	<i>C8,H8,D7,C7,H10</i>
35	GlcNac-S	<i>H17,C1,C4,H8,B3</i>
36	GlcNac-S	<i>H17,C1,C7,H10,B3</i>

ME	Primer monosacárido inmovilizado	Secuencia de RE (los detalles de RE se encuentran en la tabla 7):
37	GlcNac-S	H17,C1,C8,H9,B3
38	GlcNac-S	H17,C1,C4,H8,B3,D7
39	GlcNac-S	H17,C1,C7,H10,B3,D7
40	GlcNac-S	H17,C1,C8,H9,B3,D7
41	D-Man- α -(1,0)-S	C8,H8,H9,C7,D7
42	D-Man- α -(1,0)-S	C7,H10,D7,H8,H9
43	D-Man- α -(1,0)-S	C8,H8,D7,H9,C7,H10
44	D-GlcNac- β -(1,0)-S	C9,C10,H8,H9,D7
45	D-Man- α -(1,0)-S	C7,H8,C8,H10,D7
46	D-Man- α -(1,0)-S	C7,H8,H9,D7,C8,H10
47	D-Man- α -(1,0)-S	C7,H9,C8,H10,D7,C8
48	D-Man- α -(1,0)-S	C7,H8,C8,H10,D7,H8
49	D-GlcNac- β -(1,0)-S	C9,C10,H8,C5,H10,D7
50	D-Man- α -(1,0)-S	C7,H8,H9,C8,H10,D7

Ejemplo 3

Durante la última mitad del siglo se ha demostrado que muchos polisacáridos de bacterias, hongos y plantas tienen actividades antivirales, anticoagulantes, antitrombóticas, anticardiovasculares y antitumorales (Witczak, 1997). También se encontró que un patrón estructural general es común a todos estos hidratos de carbono complejos. La mayoría de estos hidratos de carbono complejos incluyen una o dos unidades de monosacárido de repetición conectadas con uno o dos tipos de enlaces glicosídicos y decoradas con puntos ramificados de longitud constante.

La tabla 15 resume ejemplos parciales de tales estructuras únicas.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 15

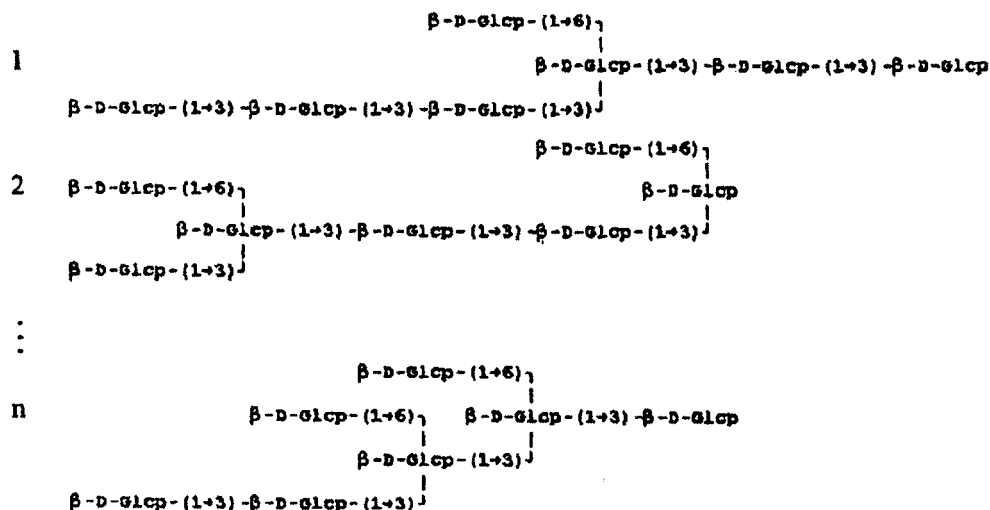
Fuente	Nombre común	Actividad	Contenido de monosacárido	Configuración	Referencia
<i>Nothogenia fastigiata</i>	Xilomanano	antiviral	xilosa-manosa	manosa con enlace 1,3 (98%) sulfatada en las posiciones 2 y 6 con fragmentos simples de β -1,2-xilosa	Matulewicz, 1978
<i>Agardhiella tenera</i>	Sulfato de galactano	antiviral	galactosa	D y L-galactosas con enlace 1,3 con 3,6-anhidro-D y L-galactosa con semiéster sulfato.	Rees, 1965
<i>Ecklonia kurome</i>	Fucoidano	anticoagulante	fucosa	unidades con enlace α -1,2 de L-fucosa-4-sulfato con ramificación o una segunda unidad de sulfato en la posición 3	Nishino, 1989
<i>Saccharomyces cerevisia</i>	Glucano (Zimosano)	antitumoral	glucosa	β -1,3-D-glucosa con ramificaciones de β -1,6-D-glucosa	Konis, 1976; Misaki, 1968
<i>Mycobacterium bovis</i>	LAM	evoca al TNF y otras citocinas	arabinosa manosa	Núcleo de α -1,2-manosa con ramificaciones de α -1,2-D-manosa alargada con cadenas lineales de α -1,5-D-arabinosa	Chatterjee, 1998; Nigou, 1997
<i>Alcaligenes faecalis</i> var.	Curdano	antitumoral	glucosa	β -1,3-D-glucosa lineal	Sasaki, 1978
Síntesis química	Ara-curdano	antitumoral	arabinosa glucosa	β -1,3-D-glucosa con α -1,5-D-arabinosa unida en la posición 4 ó 6	Matuzaki, 1986

Estudios de viscosidad así como análisis por rayos X, sugieren que las posibles estructuras helicoidales y helicoidales triples son responsables de las actividades mencionadas anteriormente (Misaki, 1997). Sin embargo, estudios adicionales demostraron que los fragmentos derivados de la hidrólisis parcial de estos hidratos de carbono complejos también tienen algunas actividades terapéuticas (Misaki, 1980).

Como tal, la presente invención puede utilizarse para seleccionar bibliotecas combinatorias de oligosacáridos que incluyen oligómeros cortos derivados de los hidratos de carbono complejos enumerados anteriormente. Tales fragmentos pueden, por ejemplo, incluir una o dos unidades de monosacárido de repetición unidas entre ellas a través de uno o dos tipos de enlaces glicosídicos. Tales fragmentos también pueden incluir ramificación moderada cuando se requiera. Tales series combinatorias de polisacáridos pueden utilizarse para el aislamiento de nuevos agentes antivirales, anticoagulantes, antitrombóticos, anticardiovasculares y antitumorales.

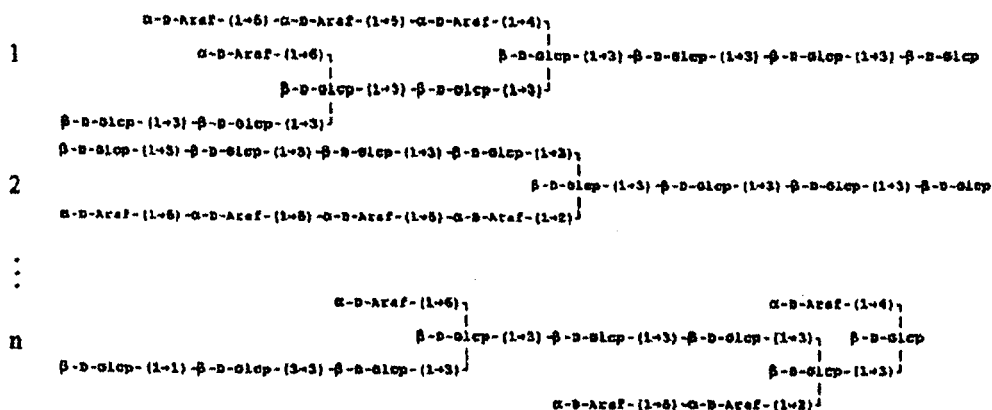
Ejemplo 4

El siguiente ejemplo representa hidratos de carbono complejos sintetizados que incluyen ramas de $\beta(1,3)$ D-glucosa y $\beta(1,6)$ D-glucosa. Cada uno de los oligómeros mostrados incluye 7 monómeros. Se apreciará que un oligómero que consiste en de 2 a 30 unidades o más también puede sintetizarse mediante el método de la presente invención tal como se describe en el presente documento.



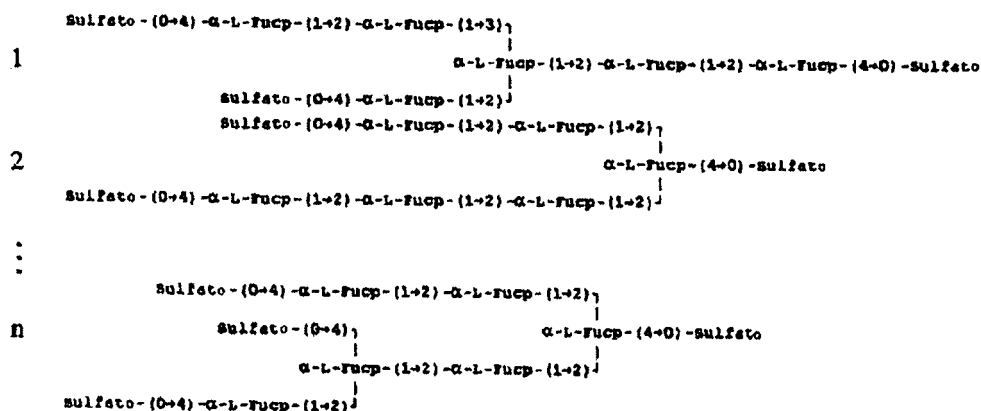
Ejemplo 5

El siguiente ejemplo representa hidratos de carbono complejos sintetizados que consisten de un esqueleto de unidades de $\beta(1,3)$ D-glucosa y ramificaciones de $\alpha(1,5)$ D-arabinosa, que se colocan en cualquier ubicación deseada a lo largo del esqueleto. Cada uno de los oligómeros mostrados a continuación incluye 12 monómeros. Se apreciará que un oligómero que consiste en de 2 a 40 unidades o más también puede sintetizarse mediante el método de la presente invención.



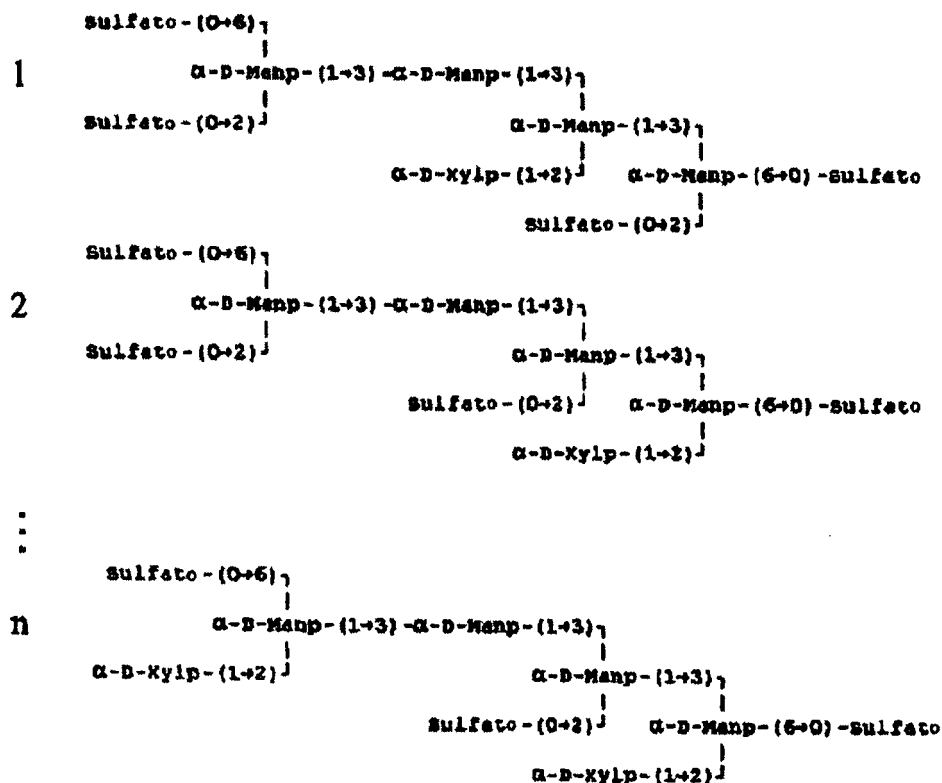
Ejemplo 6

El siguiente ejemplo representa hidratos de carbono complejos sintetizados que consisten en α -L-fucosa o α -L-fucosa-4-sulfato con enlace $\alpha(1,2)$ con ramificaciones o unidades secundarias de sulfato colocadas en la posición 3. Cada uno de los oligómeros mostrados a continuación incluye 6 monómeros de sacárido. Se apreciará que un oligómero que consiste en de 2 a 20 unidades o más puede sintetizarse mediante el método de la presente invención.



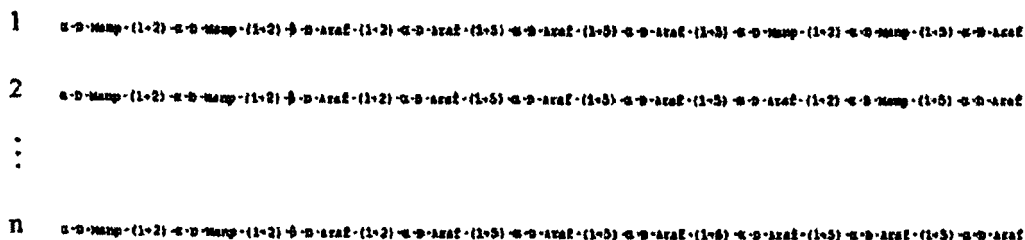
Ejemplo 7

El siguiente ejemplo representa hidratos de carbono complejos sintetizados que consisten en α -D-manosa o α -D-manosa sulfatadas con enlaces (1,3) colocadas en las posiciones 2 y/o 6, y que incluyen fragmentos simples de $\beta(1,2)$ xilosa. Cada uno de los oligómeros mostrados a continuación incluye 5 monómeros de sacárido. Se apreciará que un oligómero que consiste en de 3 a 20 unidades o más también puede sintetizarse mediante el método de la presente invención.



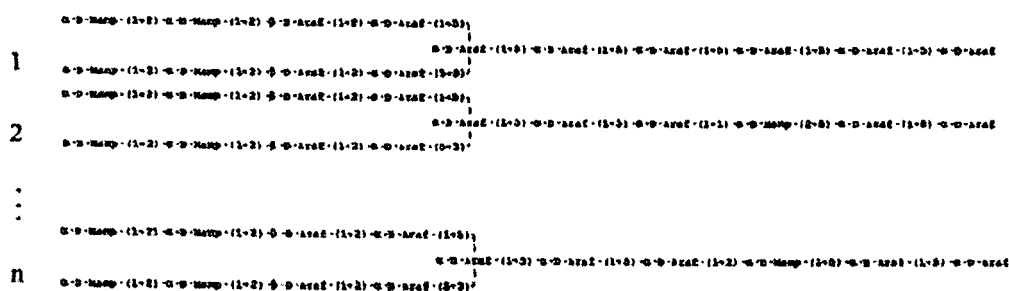
Ejemplo 8

El siguiente ejemplo representa hidratos de carbono complejos sintetizados que consisten en unidades de $\alpha(1,5)$ D-arabinosa y $\alpha(1,2)$ D-manosa con un núcleo de una unidad de α -D-arabinosa conectada a la unidad de α -D-arabinosa en la posición 2 o a la unidad de α -D-manosa en cualquier posición. Cada uno de los oligómeros mostrados a continuación incluye 9 monómeros de sacárido. Se apreciará que un oligómero que consiste en de 2 a 70 unidades o más también puede sintetizarse mediante el método de la presente invención.



Ejemplo 9

El siguiente ejemplo representa hidratos de carbono complejos sintetizados que consisten en unidades de α -1,5-D-arabinosa y α -1,2-D-manosa unidas a un único núcleo de una unidad de β -D-arabinosa, que está conectado a la unidad de α -D-arabinosa en la posición 2 o a la unidad de α -D-manosa en cualquier posición. Los hidratos de carbono complejos también incluyen una β -D-arabinosa ramificada que está colocada en la posición 3. La antena ramificada incluye, tal como un oligómero principal, un único núcleo de una unidad de β -D-arabinosa conectada a α -D-arabinosa en la posición 2 o a α -D-manosa en cualquier posición. Cada uno de los oligómeros mostrados a continuación incluye 14 monómeros de sacárido. Se apreciará que un oligómero que consiste en de 2 a 70 unidades o más también puede sintetizarse mediante el método de la presente invención.



Síntesis de la biblioteca de hidratos de carbono complejos

Los siguientes ejemplos describen en detalle experimentos que demuestran la síntesis enzimática secuencial bi-bliotecas de hidratos de carbono complejos de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención.

Materiales y Métodos

Abreviaciones usadas a continuación: BSA - Albúmina de suero bovino; GlcNAc - N-acetilglucosamina; PNP-GlcNAc - p-nitrofenil-N-acetil- β -D-GlcNAc; GlcNAc-COOH - 2-(2-carboxietiltio)-etil 2- β -D-GlcNAc; NHS - N-hidroxisuccinimida; EDC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; D.O. - densidad óptica; WGA - aglutinina de germen de trigo; RCA120 - lectina de *Ricinus communis*; BS-I- lectina de *Bandeiraea simplicifolia*; TGP - lectina de *Tereagonolobus purpureas*; TML - lectina de *Tritrichomonas mobilensis*; ECorA - lectina de *Erythrina corallodendron*; FITC - isotiocianato de fluoresceína.

Materiales generales: PBS - tampón fosfato 0,1 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M (Sigma S-7653); TBS - Tris/HCl 50 mM, pH 7,5 (Sigma T-6791), NaCl 0,15 M; TBST - TBS, Tween 20 al 0,05% (Sigma P-9416); Tampón de lavado de alta fuerza iónica - PBS, NaCl 2 M, MgSO_4 60 milimolar, Tween 20 al 0,05%. Se preparó una disolución de sustrato de peroxidasa mediante la mezcla en agua de diclorhidrato de *O*-fenilendiamina, 0,4 mg/ml, peróxido de hidrógeno de urea, 0,4 mg/ml, tampón fosfato - citrato, 0,05 M (preparada a partir del kit de sustrato de peroxidasa FAST de SIGMA, kit P-9187). Se obtuvo el Covalink NH de NUNC (Número de catálogo 478042). Se midieron la densidad óptica y la fluorescencia usando un contador de marcadores múltiples VICTOR² (Wallac OY, Finlandia). Todas las incubaciones en placas de microtitulación se realizaron a una temperatura y velocidad de agitación controladas usando

ES 2 277 588 T3

un incubador de placas de microtitulación que se obtuvo del incubador/agitador Anthos ThermoStar, Rosys Anthos GmbH Salzburg Austria (Número de catálogo 8850001).

Condiciones y mezclas de reacciones enzimáticas generales (RE)

5 D7: Se añadieron a cada pocillo de una placa de microtitulación 100 μ l de MOPS 50 mM (SIGMA M-9027), BSA 10 mg/ml (SIGMA A-7030), $MnCl_2$ 20 mM (SIGMA M- 9522), UDP-Gal 0,5 mg/ml (Calbiochem 670111) y 20 miliunidades/ml de β 1,4 galactosiltransferasa recombinante (Calbiochem 345650) a pH 7,4 y se agitó la placa a 50 rpm a 37°C durante 3 horas. Después de la incubación, se extrajo la mezcla de reacción y se lavaron los pocillos tres veces con 200 μ l de TBST, consistiendo el último lavado en un remojo de 15 minutos. Se reemplazó el TBST con TBS NaN_3 al 0,2% (Sigma S- 8032) y se guardó la placa a 4°C para las reacciones enzimáticas posteriores.

15 A2: Se añadieron a cada pocillo de una placa de microtitulación 100 μ l de MOPS 50 mM (SIGMA M-9027), BSA 10 mg/ml (SIGMA A-7030), CMP-NeuAC 0,5 mg/ml (Calbiochem 233263), y 5 miliunidades/ml de α 2,3(N)-sialiltransferasa recombinante (Calbiochem 566218) a pH 7,4 y se agitó la placa a 50 rpm a 37°C durante 4 horas. Después de la incubación, se extrajo la mezcla de reacción y los pocillos se lavaron tres veces con 200 μ l de TBST, consistiendo el último lavado en un remojo de 15 minutos. Se reemplazó el TBST con TBS NaN_3 al 0,2% (Sigma S- 8032) y la placa se guardó a 4°C para las reacciones enzimáticas posteriores.

20 B2: Se añadieron a cada pocillo de una placa de microtitulación 100 μ l de MOPS 50 mM (SIGMA M-9027), BSA 10 mg/ml (SIGMA A-7030), $MnCl_2$ 20 mM (SIGMA M- 9522), GDP-Fuc 0,5 mg/ml (Calbiochem 371443) y 5 miliunidades/ml de α 1,3 fucosiltransferasa recombinante (Calbiochem 344323) a pH 7,2 y se agitó la placa a 50 rpm a 37°C durante 4 horas. Después de la incubación, se extrajo la mezcla de reacción y los pocillos se lavaron tres veces con 200 μ l de TBST, consistiendo el último lavado en un remojo de 15 minutos. Se reemplazó el TBST con TBS NaN_3 al 0,2% (Sigma S- 8032) y la placa se guardó a 4°C para las reacciones enzimáticas posteriores.

30 D3: Se añadieron a cada pocillo de una placa de microtitulación 100 μ l de tampón de cacodilato de sodio 100 mM (SIGMA C-4945), BSA 10 mg/ml (SIGMA A-7030), $MnCl_2$ 20 mM (SIGMA M-9522), UDP-Gal 0,5 mg/ml (Calbiochem 670111) y 5 miliunidades/ml de α 1,3 galactosiltransferasa recombinante (Calbiochem 345648) a pH 6,5 y se agitó la placa a 50 rpm a 37°C durante 4 horas. Después de la incubación, se extrajo la mezcla de reacción y los pocillos se lavaron tres veces con 200 μ l de TBST, consistiendo el último lavado en un remojo de 15 minutos. Se reemplazó el TBST con TBS NaN_3 al 0,2% (Sigma S- 8032) y la placa se guardó a 4°C para las reacciones enzimáticas posteriores.

35 A3: Se añadieron a cada pocillo de una placa de microtitulación 100 μ l de tampón de cacodilato de sodio 50 mM (SIGMA C-4945), BSA 10 mg/ml (SIGMA A-7030), CMP-NeuAC 0,5 mg/ml (Calbiochem 233263) y 5 miliunidades/ml de α 2,6-(N)-sialiltransferasa recombinante (Calbiochem 566222) a pH 6,0 y se agitó la placa a 50 rpm a 37°C durante 4 horas. Después de la incubación, se extrajo la mezcla de reacción y los pocillos se lavaron tres veces con 200 μ l de TBST, consistiendo el último lavado en un remojo de 15 minutos. Se reemplazó el TBST con TBS NaN_3 al 0,2% (Sigma S- 8032) y la placa se guardó a 4°C para las reacciones enzimáticas posteriores.

45 H3: Se añadieron a cada pocillo de una placa de microtitulación 100 μ l de tampón de cacodilato de sodio 50 mM (SIGMA C-4945), $MnCl_2$ 20 mM (SIGMA M-9522), BSA 10 mg/ml (SIGMA A-7030), dimetilsulfóxido al 5%, UDP-GlcNAc 0,5 milimolar (Calbiochem 670107), trifosfato de adenosina 0,75 milimolar y 5 miliunidades/ml de β 1,3-N-acetilglucosaminil-transferasa recombinante (preparada tal como se describe en Zhou *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA volumen 96 páginas 406-411) a pH 7,0 y se agitó la placa a 50 rpm a 37°C durante 10 horas. Después de la incubación, se extrajo la mezcla de reacción y los pocillos se lavaron tres veces con 200 μ l de TBST, consistiendo el último lavado en un remojo de 15 minutos. Se reemplazó el TBST con TBS NaN_3 al 0,2% (Sigma S- 8032) y la placa se guardó a 4°C para las reacciones enzimáticas posteriores.

50 Se omite el BSA de la mezcla de reacción y las etapas de lavado se realizan usando tampón de alta fuerza iónica en lugar de TBST cuando las reacciones enzimáticas se realizan en placas Covalink NH incluyendo un monosacárido acoplado covalentemente.

55 Ensayos de unión lectina/anticuerpo

60 WGA: Se añadieron a las placas 100 μ l de lectina de WGA conjugada con peroxidasa 5 μ g/ml (SIGMA L-3892, 150 unidades de peroxidasa por mg de proteína) y se incubaron durante 1 hora a 25°C en TBS que contenía BSA al 1% y 10 milimolar de $MnCl_2$ y $CaCl_2$. Se lavaron los pocillos 3 veces con 200 μ l de TBST, consistiendo el último lavado en un remojo de 15 minutos. Para detectar la WGA marcada con peroxidasa, se añadieron 100 μ l de disolución reciente de sustrato de peroxidasa, y una hora más tarde se determinó la D.O. de la disolución (a 450 nm).

65 RCA120: Se añadieron a las placas 100 μ l de lectina de RCA120 conjugada con peroxidasa 10 μ g/ml (SIGMA L-2758, 11 unidades de peroxidasa por mg de proteína) y se incubaron durante 1 hora a 25°C en TBS que contenía BSA al 1% y 10 milimolar de $MnCl_2$ y $CaCl_2$. Se lavaron los pocillos 3 veces con 200 μ l de TBST, consistiendo el último lavado en un remojo de 15 minutos. Se añadieron 100 μ l de disolución reciente de sustrato de peroxidasa, y una hora más tarde se determinó la D.O. de la disolución (a 450 nm).

TGP: Se añadieron a las placas 100 μ l de TGP-lectina 20 μ g/ml conjugada con peroxidasa (SIGMA L-1508, 10 unidades de peroxidasa por mg de proteína) y se incubaron durante 1 hora a 25°C en TBS que contenía BSA al 1% y 10 milimolar de $MnCl_2$ y de $CaCl_2$. Se lavaron los pocillos tres veces con 200 μ l de TBST, consistiendo el último lavado en un remojo de 15 minutos. Se añadieron 100 μ l de disolución reciente de sustrato de peroxidasa, y una hora más tarde se determinó la D.O. de la disolución (a 450 nm).

BS-I: Se añadieron a las placas 100 μ l de BS-I 20 μ g/ml conjugada con biotina (SIGMA L-3759) y se incubaron durante 1 hora a 25°C en TBS que contenía BSA al 1% y 10 milimolar de $MnCl_2$ y de $CaCl_2$. Se lavaron los pocillos tres veces con 200 μ l de TBST, consistiendo el último lavado en un remojo de 15 minutos, después del cual se añadieron a las placas 100 μ l de TBS que contenía BSA al 1% y 5 μ g/ml de avidina conjugada con peroxidasa (SIGMA A-3151, 40 unidades de peroxidasa por mg de proteína) y se incubaron durante 1 hora a 25°C. Se lavaron los pocillos tres veces con 200 μ l de TBST, consistiendo el último lavado en un remojo de 15 minutos. Se añadieron 100 μ l de disolución reciente de sustrato de peroxidasa, y una hora más tarde se determinó la D.O. de la disolución a 450 nm.

TML: Se añadieron a las placas 100 μ l de TML 20 μ g/ml conjugada con biotina (Calbiochem 431803) y se incubaron durante 1 hora a 25°C en TBS que contenía BSA al 1%. Se lavaron los pocillos 3 veces con 200 μ l de TBST, consistiendo el último lavado en un remojo de 15 minutos, después del cual se añadieron a las placas 100 μ l de TBS que contenían BSA al 1% y 5 μ g/ml de avidina conjugada con peroxidasa (SIGMA A-3151, 40 unidades de peroxidasa por mg de proteína) y se incubaron durante 1 hora a 25°C. Se lavaron los pocillos 3 veces con 200 μ l de TBST, consistiendo el último lavado en un remojo de 15 minutos. Se añadieron 100 μ l de disolución reciente de sustrato de peroxidasa, y una hora más tarde se determinó la D.O. de la disolución a 450 nm.

Anti-sialil-Lewis X: Se añadieron a las placas 100 μ l de IgM anti-sialil-Lewis X 10 μ g/ml de ratón (Calbiochem 565953) y se incubaron durante 1 hora a 25°C en TBS que contenía BSA al 1%. Se lavaron los pocillos 3 veces con 200 μ l de TBST, consistiendo el último lavado en un remojo de 15 minutos, después del cual se añadió a las placas una disolución de TBS que contenían BSA al 1% y 100 μ l de IgM de cabra anti-ratón 5 mg/ml conjugada con biotina (SIGMA b-9265) y se incubaron durante 1 hora a 25°C. Se lavaron los pocillos 3 veces con 200 μ l TBST, consistiendo el último lavado en un remojo de 15 minutos, seguido por la incubación con 100 μ l de TBS que contenían BSA al 1% y 5 μ g/ml de avidina conjugada con peroxidasa (SIGMA A-3151, 40 unidades de peroxidasa por mg de proteína) y se incubaron durante 1 hora a 25°C. Se lavaron los pocillos 3 veces con 200 μ l de TBST, consistiendo el último lavado en un remojo de 15 minutos. Se añadieron 100 μ l de disolución reciente de sustrato de peroxidasa, y una hora más tarde se determinó la D.O. de la disolución (a 450 nm).

ECorA: Se añadieron a las placas 100 μ l de ECorA 20 μ g/ml conjugada con biotina (SIGMA L-0893) y se incubaron durante 1 hora a 25°C en TBS que contenía BSA al 1% y 10 milimolar de $MnCl_2$ y de $CaCl_2$. Se lavaron los pocillos tres veces con 200 μ l de TBST, consistiendo el último lavado en un remojo de 15 minutos, después del cual se añadieron a las placas 100 μ l de TBS que contenían BSA al 1% y 5 mg/ml de avidina conjugada con peroxidasa (SIGMA A-3151, 40 unidades de peroxidasa por mg de proteína) y se incubaron durante 1 hora a 25°C. Se lavaron los pocillos 3 veces con 200 μ l de TBST, consistiendo el último lavado en un remojo de 15 minutos. Se añadieron 100 μ l de disolución reciente de sustrato de peroxidasa, y una hora más tarde se determinó la D.O. de la disolución a 450 nm.

Cuando se llevaron a cabo los ensayos de unión descritos anteriormente en aceptores de monosacáridos acoplados covalentemente, tal como es el caso con las placas Covalink NH, se reemplazó la disolución de incubación de TBS con TBST y se realizaron las etapas de lavado usando tampón de alta fuerza iónica en lugar de TBST.

Ejemplo 10

Inmovilización de aceptores - la primera etapa

Mientras se simplificaba la presente invención para la práctica, se perfeccionaron varios métodos para la inmovilización de aceptores de monosacáridos en placas de microtitulación. Los aceptores de monosacáridos se unieron a la superficie de una placa de microtitulación a través de un ligador y las lectinas o anticuerpos dirigidos contra de los hidratos de carbono complejos sintetizados se utilizaron para medir la eficiencia de unión tal como se describió además anteriormente en el presente documento.

Se llevó a cabo la inmovilización en placa del primer elemento estructural del aceptor de monosacáridos mediante o bien (i) la adsorción de la neoglicoproteína BSA-GlcNAc (β -D-GlcNAc conjugada con BSA) a la superficie de una placa de microtitulación; o bien (ii) la inmovilización covalente usando un ligador apropiado. Se realizó la inmovilización covalente usando o bien la activación con cloruro cianúrico (figura 5), o bien la activación con NHS/EDC (figura 6) de las placas CovaLink NH. El uso de la activación con cloruro cianúrico permitió un alargamiento del ligador de aproximadamente 1,5 nanómetros en cada ciclo de alargamiento. Se midió la presencia de monosacárido inmovilizado (GlcNAc) según su unión a lectina usando WGA-lectina conjugada con peroxidasa o FITC. Se cuantificó la unión usando detección de señal colorimétrica o fluorescente, tal como se muestra en las figuras 7a-c.

*Materiales y métodos**Adsorción de GlcNAc conjugado a BSA a placas Maxisorb*

Se separó una solución de Na_2CO_3 0,1 M, pH 9,6, incluyendo 0-3000 ng de BSA-GlcNAc (preparado tal como se describe por Monsigny *et al.*, Biol. Cell, 51, 187 1984) en alícuotas de 100 μl en pocillos de una placa de microtitulación Maxisorb (NUNC n° de catálogo 469914) y se incubó la placa a 4°C durante 16 horas. Después de la incubación, se extrajo la disolución y se añadieron 200 μl de Na_2CO_3 0,1 M, pH 9,6, incluyendo BSA 1% y se incubaron las placas durante 2 horas adicionales para bloquear la unión no específica de proteínas (tales como enzimas o lectinas) a la superficie del pocillo. Después del bloqueo, se reemplazó la disolución de BSA-GlcNAc con tampón TBS/ NaN_3 al 0,2%/BSA al 1% y se guardaron las placas a 4°C.

Se verificó la adsorción de BSA-GlcNAc mediante WGA conjugada a peroxidasa tal como se describió anteriormente en el presente documento.

Resultados

Se cubre el área de superficie de una molécula única de BSA de 66 kDa (aproximadamente 50 nm²) con aproximadamente 25 grupos GlcNAc. En una superficie Maxisorb que está totalmente cubierta con BSA-GlcNAc, la distancia media entre grupos GlcNAc adyacentes es aproximadamente 1,0 nm y el diámetro del sitio de reconocimiento de hidratos de carbono de la lectina es de aproximadamente 2 nm. Por tanto, para prevenir la interferencia estérica entre lectinas unidas de manera adyacente o entre lectina unida y otros monosacáridos, la densidad de los monosacáridos inmovilizados no deberá exceder 10¹⁴ por cm². Ya que en este caso el monosacárido inmovilizado forma una parte de una molécula de proteína unida que es de aproximadamente 5 nm de diámetro, los grupos de monosacárido están localizados aproximadamente 5 nanómetros por encima de la superficie de la placa y por tanto están disponibles para el alargamiento enzimático por la glicosiltransferasa. La figura 8a describe una curva de saturación para BSA-GlcNAc unido a una placa de microtitulación Maxisorb.

Después de la unión de BSA-GlcNAc, se lavaron las placas con TBST, un tampón que contiene un detergente de fuerza iónica media (NaCl 0,15 M), para eliminar las lectinas unidas de manera no específica. Esta etapa de lavado no elimina la BSA unida y por tanto permite reacciones enzimáticas secuenciales. Tal como se muestra en la figura 8b, la BSA unida fue estable durante 12 ciclos extensivos de lavado. Después de cada etapa de lavado, se midió la cantidad de BSA-GlcNAc (empezando a 200 ng/pocillo) mediante la unión con lectina WGA tal como se describió anteriormente.

Se realizó la inmovilización covalente de GlcNAc a Covalink NH, así como también el alargamiento de Covalink NH con 13 átomos adicionales en cada ciclo de alargamiento subsiguiente, tal como se muestra en la figura 5. Los resultados de unión para la inmovilización de WGA a β -D-GlcNAc (con ciclos de un alargamiento único) o a Covalink NH activada con NHS/EDC, mediada por el cloruro cianúrico, se muestran en las figuras 7a-b. La densidad de los grupos amino en la superficie de Covalink NH es de 10¹⁴ por cm² y la distancia promedio entre los grupos GlcNAc es de 1 nm, que es suficiente para la unión a lectina. Tras la incubación con la mezcla de reacción D7 (β -1,4 galactosiltransferasa, descrita en la figura 8c), la transferencia de β -D-galactosa a fenil- β -D-GlcNAc inmovilizado a la placa (conector de 22 átomos) se verifica utilizando el ensayo de unión a lectina EcorA, tal como se describió anteriormente. No se detectó la transferencia de β -D-galactosa a β -D-GlcNAc inmovilizada a la placa (placa activada con NHS/EDC con un conector de 20 átomos). Esto podría deberse a diferencias en la longitud del conector.

Los métodos de inmovilización covalente descritos anteriormente permiten el uso de un tampón de fuerza iónica muy alta (por ejemplo, guanidina HCl 6 M o NaOH 100 mM) en etapas de lavado posteriores, permitiendo así la verificación precisa “*in situ*” de cada etapa enzimática utilizada mediante el procedimiento.

La eliminación de moléculas unidas no específicamente es crucial para la síntesis precisa de bibliotecas. Dado que las glicosiltransferasas son glicoproteínas con hidratos de carbono complejos presentados en su superficie exterior, la adsorción no específica de la enzima puede interferir con, o generar errores en, la síntesis. Las lectinas y los anticuerpos también son glicoproteínas y como tal, las uniones no específicas de los mismos pueden conducir a una predicción estructural imprecisa. El agente de bloqueo convencional utilizado comúnmente en las reacciones enzimáticas, es leche desnatada. Dado que la leche desnatada contiene muchas proteínas glicoconjugadas, no es adecuada para la síntesis enzimática de hidratos de carbono complejos. En cambio, las reacciones de síntesis realizadas según la presente invención utilizaron BSA como agente de bloqueo, puesto que no está glicosilado. Tal como se muestra mediante la figura 7b, aunque los agentes de bloqueo químico interferían con la unión a lectina, el bloqueo con BSA permitió la unión específica a lectina, mientras que redujo sustancialmente la unión no específica. Durante la práctica, se observó que puesto que los grupos amino activados del cloruro cianúrico se hidrolizan espontáneamente en agua, no hay necesidad de bloqueo adicional cuando se utiliza este procedimiento de acoplamiento en placa.

Ejemplo 11

Síntesis de bibliotecas

El alto rendimiento es crítica para una síntesis enzimática en fase sólida iterativa. Dado que las glicosiltransferasas catalizan la transferencia de un resto de azúcar desde un donante de azúcar de nucleótido fosfato hasta un aceptor apropiado, la degradación del enlace energético fosfodiéster del azúcar del nucleótido es irreversible. Como tal, no hay ningún obstáculo teórico que impida la finalización de las reacciones de síntesis. Preferiblemente, la concentración de azúcar del nucleótido de la reacción debe ser aproximadamente de 10 a 20 veces superior a un valor de K_m de la enzima para el donante, que oscila desde varios hasta varios cientos de milimolares. En un único pocillo de placa de microtitulación que contiene aproximadamente 100 μ l de disolución, están disponibles 0,2 nanomoles de grupos de sacárido unidos al pocillo para la reacción enzimática. Como tal, es suficiente una concentración de azúcar del nucleótido igual a o superior a 1 milimolar.

Materiales y métodos

Activación con NHS/EDC y acoplamiento de β -D-GlcNAc: Se dispensaron alícuotas de 50 μ l de una disolución de 2-(2-carboxietiltilio)-etil-2- β -DGlcNAc (NNI SS-01-003) en tiras de CovaLink NH y las tiras se incubaron en pocillos que contenían 50 μ l de una disolución que incluía 3 mg/ml de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) (Sigma E-7750) y 3 mg/ml de N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma H-7377). Los pocillos se sellaron y las placas se agitaron a 50 RPM a 37°C durante 24 horas. Los pocillos se lavaron tres veces con agua destilada y los grupos amino sin reaccionar en los pocillos se bloquearon durante 2 horas en 300 ml de una disolución que contenía metanol/anhídrido acético/agua (85/10/5 V/V/V, respectivamente). Tras cuatro lavados con agua destilada, las placas se secaron al aire y se incubaron durante 12 horas con una disolución de bloqueo que incluía un 1% de BSA en PBS.

Activación con cloruro cianúrico: Una disolución que contenía 48 mg de cloruro cianúrico (Aldrich, número de catálogo C95501) disuelto en 3 ml de acetona se añadió, mientras se agitaba, a 45 ml de tampón fosfato 0,1 M. Se añadió rápidamente una alícuota (200 μ l) de esta disolución (en el plazo de 2 minutos) a cada pocillo de una placa de Covalink NH. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos tras lo cual se desechó la disolución y la placa se lavó tres veces con agua doblemente destilada y se secó a 50°C durante 30 minutos.

Ciclo de alargamiento del ligador de amino: Se añadieron 100 μ l de una disolución de 1,8-diamino 3,6 (MERCK 818116) (3 ml en 50 ml de tampón carbonato 0,1 M, pH 9,6) o disolución de 1,8-diaminooctano (ALDRICH D2, 240-1) (100 mg por ml de tampón carbonato 0,1 M, pH 9,6) a cada pocillo de una placa activada con cloruro cianúrico. Los pocillos se sellaron y la placa se incubó a 25°C durante 12 horas. Tras la incubación, los pocillos se lavaron cuatro veces con agua y la placa se activó con cloruro cianúrico, tal como se describió anteriormente. Se repitió un ciclo de alargamiento de 1,8-diamino-3,6-dioxaoctano hasta que se logró la longitud deseada del conector.

Acoplamiento de β -D-GlcNAc (primer bloque estructural de monosacárido): Se unieron moléculas del monosacárido GlcNAc a las placas activadas descritas anteriormente. Se utilizó el siguiente procedimiento para llevar a cabo la unión: se añadió una disolución que contenía ditionito de sodio 60 mg/ml en carbonato de sodio 0,1 M a cada pocillo de las filas B-H de la placa. Se diluyó seriadamente dos veces una alícuota de 200 μ l de una segunda disolución que contenía 20 mg de p-nitrofenil-N-acetil- β -D-GlcNAc (Calbiochem, número de catálogo 487052) y 200 mg de ditionito de sodio (Fluka, número de catálogo 71700) que se disolvieron en 6 ml de agua doblemente esterilizada y se valoraron hasta un pH de 7,5 utilizando 3 ml de carbonato de sodio 0,1 M (pH 9,6) a partir de las filas A a H. Los pocillos se sellaron y se incubaron a temperatura ambiente durante la noche. Tras la incubación, los pocillos se lavaron cuatro veces con agua doblemente destilada y después tres veces con metanol (200 μ l/pocillo), incluyendo el tercer lavado un remojo de 15 minutos a temperatura ambiente. El metanol se desechó, y las placas se secaron al aire y se almacenaron a 4°C.

Unión de WGA a β -D-GlcNAc acoplada covalentemente: La presencia de β -D-GlcNAc unida covalentemente se verificó mediante la unión de WGA conjugado a peroxidasa o fluoresceína-iso-tio-cianato (FITC). La detección se realizó tal como sigue: se incubaron 100 μ l de WGA conjugada con 5 μ g/ml peroxidasa (SIGMA L-3892, 150 unidades de peroxidasa por mg de proteína) o FITC (SIGMA L-4895) preparado en TBST que incluía 10 milimolar de $MnCl_2$ y $CaCl_2$ en cada pocillo a 25°C durante una hora. Los pocillos se lavaron tres veces con 200 μ l de solución de lavado de alta fuerza iónica, consistiendo el último lavado en 15 minutos de remojo. Para desarrollar WGA marcado con peroxidasa, se añadieron 100 μ l de disolución reciente de sustrato con peroxidasa y una hora más tarde se midió la D.O. a 450 nm. El WGA conjugado con FITC unido a las tiras de β -DGlcNAc-Covalink NH blanco (NUNC 453690) se excitó (485 nm) y se midió la emisión de fluorescencia de las mismas (520 nm).

Transferencia de β -1,4-galactosa para unirse covalentemente a β -D-GlcNAc: Se añadieron 100 μ l de MOPS 50 mM, pH 7,4 (SIGMA M-9027), Triton CF 32 al 0,2% (Sigma), $MnCl_2$ 20 mM (SIGMA M-9522), UDP-Gal 0,5 mg/ml (Calbiochem 670111) y 20 miliunidades/ml de una recombinante β 1,4-galactosiltransferasa (Calbiochem 345650) a cada pocillo de una placa acoplada con β -D-GlcNAc. La placa se agitó a 50 RPM a 37°C durante 12 horas. Tras la incubación, la mezcla de reacción se extrajo y los pocillos se lavaron tres veces con 200 μ l de tampón de lavado de alta fuerza iónica, consistiendo el último lavado en una inmersión de 15 minutos. La transferencia de β 1,4-galactosa se detectó mediante lectina conjugada con biotina (*Erythourina corallodenron* ECorA) tal como sigue: se añadió una alícuota que incluía ECorA 20 μ g/ml conjugada con biotina (SIGMA L-0893, 5 moles de biotina por mol de proteína)

preparada en TBST que incluía 10 milimolar de MnCl_2 y de CaCl_2 a cada pocillo y la placa se incubó durante una hora a 25°C. Los pocillos se lavaron 3 veces con 200 μl de tampón de lavado de alta fuerza iónica, consistiendo el último lavado en una inmersión de 15 minutos. Tras la incubación con 100 ml de avidina conjugada con peroxidasa (5 mg/ml en TBST), los pocillos se lavaron 3 veces con 200 ml de tampón de lavado de alta fuerza iónica, consistiendo el último lavado en una inmersión de 15 minutos. Para detectar la unión, se añadieron 100 μl de disolución reciente de sustrato de peroxidasa y una hora más tarde se midió la D.O. a 450 nm.

Medición de la cinética de β 1,4-galactosiltransferasa (D7) en fase sólida: La mezcla de reacción enzimática es tal como se describe para D7, con la excepción de que en este caso, se utilizaron 3,9 miliunidades/ml de β 1,4-galactosiltransferasa. La fase sólida consistió en placas de Maxisorb recubiertas con 3 mg/pocillo de BSA-GlcNAc. La mezcla de enzimas se añadió a cada pocillo a intervalos de 10 minutos. Los pocillos se lavaron entonces con TBST tres veces y se midió la unión de RCA_{120} tal como se describió anteriormente.

Resultados

Los resultados obtenidos mientras se lleva a la práctica la presente invención indican que una reacción en fase sólida es más lenta que una reacción en fase líquida. Tal como se muestra en la figura 12, la transferencia enzimática de galactosa a 0,5 nanomoles de GlcNAc unida usando 0,5 mU de β -1,4 galactosiltransferasa tarda aproximadamente una hora en completarse, comparado con aproximadamente un minuto que tarda en completarse la misma reacción en disolución. Por tanto, para alcanzar un rendimiento máximo, se emplearon 0,5 miliunidades de cada enzima durante 3-4 horas.

Los nucleótido fosfatos (UDP, CMP, GDP) que resultan de la ruptura del azúcar de nucleótido son subproductos de estas reacciones enzimáticas. Se observó que estos subproductos inhiben la actividad de la glicosiltransferasa. Como tal, una adición de una fosfatasa para degradar el (los) nucleótido fosfato(s) puede aumentar sustancialmente la tasa de la reacción en fase sólida.

La longitud del ligador, la flexibilidad del hidrato de carbono complejo, la inmovilización de grupos de hidrato de carbono y el impedimento estérico, también son factores que afectan a la eficacia de la síntesis. Tal como se reveló a partir de la experimentación conducida como parte del presente estudio, una superficie Maxisorb recubierta por neoglicoproteína puede utilizarse de manera eficaz para inmovilizar el primer monosacárido, obtener la reacción enzimática de la glicosiltransferasa y evitar problemas de impedimentos estéricos. Un ligador covalente alargado basado en ácido cianúrico y p-nitrofenilo permite el acoplamiento del primer monosacárido a un ligador de 2-8 nanómetros evitando así el impedimento estérico cuando el primer monosacárido se une covalentemente a la superficie y origina la reacción enzimática de la glicosiltransferasa.

Ejemplo 12

Biblioteca 1

La figura 9 describe las etapas enzimáticas necesarias para la síntesis de una biblioteca que consiste en las estructuras descritas en la tabla 17 inmovilizadas en una placa, resumiendo la organización de la placa de microtitulación, las reacciones enzimáticas realizadas en cada etapa y los ensayos de unión de lectinas/anticuerpo. Cada etapa enzimática se verifica frente a una banda control que no contiene el azúcar de nucleótido añadido.

Se realizó un conjunto diferente de reacciones enzimáticas (descritas en detalle anteriormente en el presente documento) en cada banda según procedimientos desarrollados por la presente invención. Las tablas a continuación describen en detalle las diversas reacciones y componentes utilizados con el fin de generar esta biblioteca. La tabla 16 resume las reacciones enzimáticas usadas para sintetizar la primera biblioteca, la tabla 17 describe los módulos enzimáticos (ME, descritos de manera adicional en los Ejemplos 1-9), las estructuras de hidratos de carbono complejos formados y los ensayos de unión lectina/anticuerpo realizados para cada banda, mientras que la tabla 18 describe los ensayos de unión lectinas/anticuerpos que se usaron para verificar la estructura de hidratos de carbono complejos formada siguiendo cada etapa enzimática.

TABLA 16

Reacciones enzimáticas utilizadas en la síntesis de la primera biblioteca (donadores, aceptores e índices)							
Índice	Extensión	α/β	Pos.	Aceptor	Donador	N° cat. Enzima	C.E.
A2		α	3	D-Gal- $\beta(1,4)$ - D- GlcNAc-R	CMP-NeuAC	Calbio-chem 56621	2.4.99 .6
A3		α	6	D-Gal- $\beta(1,4)$ - D- GlcNAc-R	CMP-NeuAC	Calbio-chem 56622	2.4.99 .1
B2	D-Gal- $\beta(1,4)$	α	3	D- GlcNAc-R	GDP-L-Fuc	Calbio-chem 34432	2.4.1. 152
D3		α	3	D-Gal- $\beta(1,4)$ - D- GlcNAc-R	UDP-Gal	Calbio-chem 34564	2.4.1. 151
D7		β	4	D- GlcNAc-R	UDP-Gal	Calbio-chem 34565	2.4.1. 38

TABLA 17

Lista ME				
ME	Primer monosacárido inmovilizado	Secuencia de las RE	Fórmula de estructura	Ensayos de unión lectina/anticuerpos
1	GlcNAc-S	D7	Gal β 1,4 GlcNAc-S	RCA120 +
2	GlcNAc-S	D7,A2	NeuAC a 2,3 Gal β 1,4 GlcNAc-S	TML+, RCA120-
3	GlcNAc-S	D7,A3	NeuAC a 2,6 Gal β 1,4 GlcNAc-S	TML+, RCA120 -
4	GlcNAc-S	D7,D3	Gal α 1,3 Gal β 1,4 GlcNAc-S	BS-I+ , RCA120 -
5	GlcNAc-S	D7,B2	Gal β 1,4 (Fuc a 1,3) GlcNAc-S	TGP+
6	GlcNAc-S	D7,A2,B2	NeuAC a 2,3 Gal β 1,4 (Fuc a 1,3)GlcNAc	IgM Anti-Sialil Lewis X+

TABLA 18

Ensayos de unión lectina/anticuerpo					
Nombre	Tipo de molécula	Especificidad	N° Cat.	Fuente	Marcaje
WGA	Lectina	GlcNAc	Sigma	<i>Triticum</i>	Peroxidasa

			L-3892	<i>vulgaris</i>	/FITC
RCA120	Lectina	β -Gal	Sigma L-2758	<i>Ricinus communis</i>	Peroxidasa
BS-I	Lectina	α -Gal, α -GalNA	Sigma L-3759	<i>Bandeiraea simplicifolia</i>	Biotina
TGP	Lectina	α -Fuc	Sigma L-1508	<i>Tereagonolobus purpureas</i>	Peroxidasa
TML	Lectina	Ácido siálico	Calbio 431803	<i>Tritrichomonas mobilensis</i>	Biotina
Anti-Sialil Lewis X	IgM	Sialil Lewis X	Calbio 565953	Ratón	Anti ratón de cabra/peroxidasa

Resultados

Las figuras 10a-f describen los ensayos de unión lectinas/anticuerpos realizados en cada banda tras cada reacción enzimática. El aumento de unión de RCA₁₂₀ (figura 10a) indica transferencia de β -D-Galactosa a GlcNAc y formación de un enlace β -1,4-glicosídico estable. La eficacia de la segunda etapa enzimática se verificó por medio de un aumento en la unión BS-I (figura 10b) que es indicativo de una transferencia de α -D-galactosa a Gal β -1,4 GlcNAc y la formación de un enlace α -1,3-glicosídico estable entre ellos. El aumento en la unión TGP (figura 10c) es indicativo de una transferencia de α -L-fucosa a Gal β -1,4 GlcNAc y la formación de un enlace α -1,3 glicosídico estable entre ellos. El oligosacárido ramificado formado mediante esta reacción es un antígeno-Lewis-X. Como se muestra en las figuras 10d-e un aumento en las uniones TML indica una transferencia de α -D-NeuAC a Gal β -1,4 GlcNAc formando un enlace α -2,6- 2,3- glicosídico entre ellos. El aumento de uniones anti-sialil-Lewis-X IgM (figura 10f) indica una transferencia de α -L-fucosa a NeuAC α -2,3 Gal β -1,4 GlcNAc formando un enlace α -1,3 glicosídico estable y generando un antígeno-sialil-Lewis-X compuesto de cuatro tipos distintos de monosacáridos.

Ejemplo 13

Biblioteca 2

La siguiente biblioteca es un ejemplo de la capacidad del método de síntesis de la presente invención para sintetizar cadena de poli-N-acetil-lactosamina de tipo II de distintas longitudes. La figura 11 describe la organización de la placa de microtitulación, las reacciones enzimáticas que pueden realizarse en cada etapa y los ensayos de unión a lectinas que pueden usarse para verificar la eficacia de las distintas etapas enzimáticas. Cada etapa enzimática se verifica frente a una tira de control que no contiene el azúcar de nucleótido añadido. Cada tira se somete a un conjunto de reacciones enzimáticas distintas (módulo enzimático-ME) que se realizan según los procedimientos desarrollados en la presente invención.

La tabla 19 describe las mezclas de reacción enzimática y las condiciones (descritas con detalle anteriormente en el presente documento) que se utilizan para la síntesis de la biblioteca de poli-N-acetil-lactosamina según las enseñanzas de la presente invención. La tabla 20 describe los módulos enzimáticos (ME) y las estructuras de hidratos de carbono complejos. El ensayo de unión a RCA₁₂₀ se lleva a cabo después de cada etapa enzimática tal como se describió anteriormente para evaluar la adición de Galactosa (unión a RCA₁₂₀) o GlcNAc (desaparición de unión a RCA₁₂₀) para alargar la cadena de poli-N-acetil-lactosamina.

TABLA 19

Una lista de reacciones enzimáticas empleadas para la síntesis de la biblioteca de poli-N-acetil-lactosamina (donantes, aceptores e índices)							
Índice	Extensión	α/β	Pos.	Aceptor	Donante	N° cat. enzimas	C.E.

D7		β	4	D-GlcNAc-R	UDP-Gal	Calbiochem 345650	2.4.1.38
H3		β	3	D-Gal- $\beta(1,4)$ -D- GlcNAc-R	UDP- GlcNAc	Zhou et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 96 págs. 406- 411	

TABLA 20

<i>Lista de ME</i>			
ME	Secuencia de las RE	Fórmula estructural	Ensayos de unión a RCA120
1	D7,H3	GlcNAc β 1,3 Gal β 1,4 GlcNAc-S	RCA120-
2	D7,H3,D7	Gal β 1,4 GlcNAc β 1,3 Gal β 1,4 GlcNAc-S	RCA120+
3	D7,H3,D7,H3	GlcNAc β 1,3 Gal β 1,4 GlcNAc β 1,3 Gal β 1,4 GlcNAc-S	RCA120-
4	D7,H3,D7,H3,D7	Gal β 1,4 GlcNAc β 1,3 Gal β 1,4 GlcNAc β 1,3 Gal β 1,4 GlcNAc-S	RCA120+
5	D7,H3,D7,H3,D7,H3	GlcNAc β 1,3 Gal β 1,4 GlcNAc β 1,3 Gal β 1,4 GlcNAc β 1,3 Gal β 1,4 GlcNAc-S	RCA120-
6	D7,H3,D7,H3,D7,H3,D7	Gal β 1,4 GlcNAc β 1,3 Gal β 1,4 GlcNAc β 1,3 Gal β 1,4 GlcNAc β 1,3 Gal β 1,4 GlcNAc-S	RCA120+

Ejemplo 14

Biblioteca 3

La siguiente biblioteca es un ejemplo de la capacidad de los métodos de síntesis de la presente invención para sintetizar cadena de poli-N-acetil-lactosamina de tipo II de distintas longitudes y sus modificaciones. Esta biblioteca incluye estructuras de oligosacárido con dos ramificaciones. El primer monosacárido está unido a la superficie por medio de BSA. La tabla 21 describe las reacciones enzimáticas que se utilizan para la síntesis, mientras que la tabla 22 describe los módulos enzimáticos (ME) utilizados y las estructuras de hidratos de carbono complejos formadas de esta manera. Para verificar la precisión de esta síntesis secuencial enzimática, se libera el oligosacárido unido al pocillo empleando una proteasa y se somete a análisis empleando HPLC, análisis de metilación o MALD-TOF-MS (Rudd, P. M. Dwek, R. A. (1997) Current Opinion in biotechnology 8 488-497).

TABLA 21

Reacciones enzimáticas utilizadas en la síntesis de la biblioteca 3							
Índice	Extensión	α/β	Pos.	Aceptor	Donante	N° cat. enzimas	C.E.
D7		β	4	D-GlcNAc-R	UDP-Gal	Calbiochem 345650	2.4.1. 38
A2		α	3	D-Gal- β 1,4) - D GlcNAc-R	CMP- NeuAC	Calbiochem 566218	2.4.99 .6
B2	D-Gal- β (1,4)	α	3	D-GlcNAc-R	GDP-L- Fuc	Calbiochem 344323	2.4.1. 152
H3		β	3	D-Gal- β (1,4) - DGlcNAc-R	UDP- GlcNAc	Zhou et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 96, págs. 406-411	

TABLA 22

Lista de ME		
ME	Secuencia de las RE	Fórmula de estructura
1	D7, H3, D7, B2	Gal β 1,4 (Fuc α 1,3) GlcNAc β 1,3 Gal β 1,4 (Fuc α 1,3) GlcNAc-S
2	D7, H3, D7, A2, B2	NeuAC a 2,3 Gal β 1,4 (Fuc α 1,3) GlcNAc β 1,3 Gal β 1,4 (Fuc α 1,3) GlcNAc-S

Así, la presente invención proporciona un método eficaz y preciso para la síntesis en fase sólida de carbohidratos complejos de estructura ramificada o no ramificada.

Bibliografía

1. Arya, P. and Ben, R.N. (1997) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 36 1280-1282.
2. Ashardy, E., Atherton, E., Gait, M.J. Lee, K. and Sheppard, R.C. (1979) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 423-425.
3. Atherton, E. and Sheppard, R.C. (1989) in *Solid phase peptide synthesis: A practical approach*, IRL: Oxford.
4. Bayer, E. (1991) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30 113-129.
5. Bergh, M. L. and van den Eijnden, D. H. (1983) *Eur. J. Biochem.* 136 113-8.
6. Bierhuizen, M.F., Mattei, M.G. and Fukuda, M. (1993) *Genes Dev.* 7 468-478.
7. Bierhuizen, M.F. and Fukuda, M. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89 9326-9330.
8. Blondelle, S.E. and Houghten R.A. (1996) *TIBTECH* 14 60-65.

9. **Boons, G.J., Heskamp, B. and Hout, F.** (1995) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35 2845-2847.
10. **Borman, S.** (1996) *C&EN* 12 29-54.
- 5 11. **Bosio, A., Binczek, E., Le Beau, M.M., Fernald, A.A. and Stoffel, W.** (1996) *Genomics* 34 69-75.
12. **Brockhausen, I., Matta, K.L., Orr, J. and Schachter, H.** (1985) *Biochemistry* 24 1866-1874.
13. **Brockhausen, I., Rachaman, E.S., Matta, K.L. and Schachter, H.** (1983) *Carbohydr. Res.* 120 3-16.
- 10 14. **Brockhausen, I., Hul, I. E., Hindsgaul, O., Schachter, H., Shah, R.N., Michnick, S.W., and Carver, J.P.** (1989) *J. Biol. Chem.* 264 11211-11221.
- 15 15. **Burbaum, J.J. and Sigal, N.H.** (1997) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1 72-78.
16. **Cadwell, R.C. and Joyce, G. F.** (1994) in *Mutagenic PCR* cold spring harbor laboratory.
17. **Cargill, J.F. and Lebl, M.** (1997) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1 67-71.
- 20 18. **Chabala, J.C.** (1995) *Curr. Opin. Biotechnol.* 6 632-639.
19. **Chang, M.L., Eddy, R.L., Shows, T.B. and Lau, J.T.** (1995) *Glycobiology* 5 319-325.
20. **Chatterjee, D. and Khoo, K.-H.** (1998) *Glycobiology* 8 113-120.
- 25 21. **Cheng, J., Sheldon, E.L., Wu, L., Uribe, A., Gerrue, L.O., Carrino, J., Heller M.J. and O'Connell, J.P.** (1998) *Nat. Biotechnol.* 16 541-546.
- 30 22. **Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E. 3rd, Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K. and Barrell, B.G.** (1998) *Nature* 393 537-44.
- 35 23. **Datta, A.K., Sinha, A. and Paulson, J.C.** (1998) *JBC* 273 9608-9614.
24. **David, S., Auge, C. and Gautheron, C.** (1991) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 49 175-237.
25. **Douglas, R.H., Ballou, C.E.** (1982) *Biochemistry* 21 1561-1570.
- 40 26. **Drews, J.** (1996) *Drug Infor. J.* 30 97-108.
27. **Drews, J.** (1996) *Nat. Biotechnol.* 14 1516-1518.
28. **Dryland, A. and Sheppard, R.C.** (1986) *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 1 125-137.
- 45 29. **Endo, T., Nishimura, R., Kawano, T., M, M. and Kobata, A.** (1987) *Cancer Res.* 47 5242-5245.
30. **Faber, L.P.** (1991) in *Clinical Oncocology*, Holleb, A.I., (eds), *American cancer society*, pp.195-210.
- 50 31. **Fodor, S.P.A., Read, J.L., Pirrung, M.C., Stryer, Lu, A.T.L. and Solas, D.** (1991) *Science* 251 767-773.
32. **Frank, R. and Doring, R.** (1988) *Tetrahedron Lett.* 19 6031-6040.
33. **Frechest, J.M. and Schuerch, C.** (1971) *JACS* 93 492-494.
- 55 34. **Frechest, J.M. and Schuerch, C.** (1972) *C. J. Am. Chem. Soc.* 9 604-605.
35. **Frechest, J.M. and Schuerch, C.** (1972) *Carbohydr. Res.* 22 399-402.
- 60 36. **Furukawa, K. and Roth, S.** (1985) *Biochem. J.* 227 573-582.
37. **Gaasterland, T.** (1998) *Nat. Biotechnol.* 16 625-627.
38. **Gillespie, W., Kelm, S. and Paulson, J.,C.** (1992) *J. Biol. Chem.* 267 21004-21010.
- 65 39. **Granelin, C.R.** (1992) in *Medicinal Chemistry for the 21st Century*, eds. **Wwormuth, C.G., Koga, N., Koning, H. and Metcalf, B.W.** (Blackwell, London), pp. 3-12.

40. Gleeson, P.A. (1988) *Current topics in microbiology and immunology* 139 1-34.
41. Grout, D. HG. And Vic, G. (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2 98-111.
- 5 42. Grundmann, U., Nerlich, C., Rein, T. and Zettlmeissl G. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18 667.
43. Guthrie, R.D., Jenkins, A.D. and Stehilcek, J. (1971) *J. Chem. Soc. C* 2690-2691.
44. Hagen, F. K., Van Wuyckhuysse, B. and Tabak, L. A. (1993) *JBC* 268 18960-18965.
- 10 45. Hakomori, S. (1989) *Adv. Cancer Res.* 52 257-331.
46. Halcomb, R.L., Huang, H. and Wong, C.-H. (1994) *JACS* 116 11315-11322.
- 15 47. Hamamoto T., Kawasaki M., Kurosawa N., Nakaoka T., Lee Y.C., Tsuji S. (1993) *Bioorg. Med. Chem.* 1 141-145.
48. Harris, J. L. and Craik, C. S. (1998) *Current Opinion in Chemical Biology* 2 127-132.
- 20 49. Hassid, W.Z. and Doudoroff, M. (1950) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 5 29-48.
50. Hendrickson, W. (1991) *Science* 25 51-58.
51. Herrmann, G.H., Ichikawa, Y., Wandrey, C., Gaeta, F.C.A., Paulson, J.C. and Wong, C.-H. (1993) *Tetra-*
25 *hedron lett.* 34 3091-3094.
52. Hidari, J.K., Ichikawa, S., Furukawa, K., Yamasaki, M. and Hirabayashi, Y. (1994) *Biochem. J.* 303 957-965.
- 30 53. Hitoshi, S., Kusunoki, S., Kanazawa, I. and Tsuji, S. (1995) *JBC* 270 8844-8850.
54. Hogan Jr., J.C. (1997) *Nat. Biotechnol.* 15 328-330.
55. Hoheisel, J.D. (1997) *TIBTECH* 15 465-469.
- 35 56. Hosomi, O., Takeya, A. and Kogure, T. (1984) *J. Biochem.* 95 1655-16.
57. Hsiau, L.T., Lee, W.C. and Wang, F.S. (1997) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 62 303-315.
- 40 58. Nunez, H.A. and Barker, R. (1980) *Biochemistry* 19 485-489.
59. Ichikawa, Y., Look, G.C. and Wong, C.-H. (1992) *Anal. Biochem.* 202 215-238.
60. Ichikawa, Y. (1997) in *Glycopeptides and Related Compounds*, eds. Large, D.G. and Warren, C.D. PP. 79-205.
- 45 61. Ichikawa, Y., Look, G.C. and Wong, C.-H. (1992) *Anal. Biochem.* 202 215-238.
62. Ichikawa, S., Sakiyama, H., Suzuki, G., Hidari, K.,I. and Hirabayashi, Y. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
93 4638-4643.
- 50 63. Jacobs, J.W. and Fodor S.P.A. (1994) *TIBTECH* 12 19-26.
64. Janda, K.D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 10779-10785.
- 55 65. Joziase, D.H., Shaper, J.H., Van den Eijnden, D.H., Van Tunen, A.J. and Shaper N.L. (1989) *JBC* 264 14290-14297.
66. Kahne, D. (1997) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1 130-135.
- 60 67. Kanie, O., Barresi, F., Ding, Y., Labbe, J., Otter A., Foesberg L.S., Ernst, B. and Hindsgaul, O. (1995)
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 34 2720-2722.
68. Kaushal, G.P. and Elbein, A.D. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 250 38-47.
- 65 69. Kaushal, G.P. and Elbein, A.D. (1987) *Biochemistry* 26 7953-7960.
70. Kawashima, H., Yamamoto, K., Osawa, T. and Irimura T. (1993) *JBC* 268 27118-27126.

71. Kenan, D.J., Tsai, D.E. and Keene, J.D. (1994) *TIBS* 19 57-64.
72. Kitagawa, H. and Paulson, J.C. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194 375-382.
- 5 73. Kitagawa H., Tone Y., Tamura J., Neumann K.W., Ogawa T., Oka S., Kawasaki T., Sugahara K. (1998) *J. Biol. Chem.* 273 6615-6618.
74. Kobata, A. (1998) *Glycoconjug. J.* 15 323-331.
- 10 75. Konishi, Y. and Misaki, A. (1976) *Abstr. Paper of Jap. Agric. Chem. Soc.*
76. Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985) *Ann. Rev Biochem.* 54 631-664.
77. Kuchner, O. and Arnold, F. H. (1997) *TIBTECH* 15 523-530.
- 15 78. Kudo, T., Ikehara, Y., Togayachi, A., Kaneko, M., Hiraga, T., Sasaki, K. and Narimatsu H. (1998) *JBC* 273 26729-26738.
79. Kurosawa, N., Hamamoto, T., Inoue, M. and Tsuji S. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1244 216-222.
- 20 80. Laine, R.A. (1994) *Glycobiology* 4 759-767.
81. Larsen, R.D., Ernst, L. K., Nair, R. P. and Lowe J.B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 6674-6678.
- 25 82. Larsen, R.D., Rajan, V.P., Ruff, M.M., Kukowska-Latallo, J., Cummings, R.D., Lowe, J.B. (1989) *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 8227-8231.
83. Leloir, L.F. (1971) *Science* 172 1299-1303.
- 30 84. Leong, P. and Schachter, H. (1995) *Eur. J. Biochem.* 231 317-328.
85. Liang, R., Loebach, J., Horan, N., Ge, M., Thompson, C., Yan, L. and Kahne, D. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 10554-10559.
- 35 86. Liang, R., Yan, L., Loebach, J., Ge, M., Uozumi, Y., Sekanina, K., Horan, N., Gildersleeve, J., Thompson, C. Smith, A., Biswas, K., Still W.C. and Kahne, D. (1996) *Science* 274 1520-1522.
87. Lockney, M.W. and Sweely, C.S. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 712 234-241.
- 40 88. Mackenzie, P.I., Owens, I.S., Burchell, B., Bock, K.W., Bairoch, A., Belanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D.W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., Chowdhury, J.R., Ritter, J.K., Schachter, H., Tephly, T.R., Tipton, K.F. and Nebert, D.W. (1997) *Pharmacogenetics* 7 255-69.
89. Martensson, S., Due, C., Pahlsson, P., Nilsson, B., Eriksson, H., Zopf, D., Olsson, L. and Lundblad, A. 45 (1988) *Cancer Res.* 48 2125-2131.
90. Masibay, A.S. and Qasba, P.K. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 86 5733-5737.
91. Matulewich, M.C. and Cerezo, A.S. (1978) *Carbohydrate Pol.* 7 121-132.
- 50 92. Matuzaki, K., Sato, T., Enomoto, K., Yamamoto, L., Oshima, R., Hatanaka, K., Uryu, T., Kahu, H., Sone, Y. and Misaki, A. (1986) *Carbohydr. Res.* 157 171-183.
93. McDevitt, J.P. and Lansbury Jr, P.T. (1996) *JACS* 118 3818-3828.
- 55 94. Meldal, M., Auzanneau, F. I., Hindsgaul, O. and Palcic, M.,M. (1994) *J. Chem. Soc. Commun.* 1849-1850.
95. Mendicino, J., Sivakami, S., Davila, M. and Chandrasekaran, E.V. (1982) *JBC* 257 3987-3994.
- 60 96. Mengling, B.J. and Turco S.J. (1998) *Current opinion in structural biology* 8 572-577.
97. Merrifield, R.B.J. (1963) *JACS* 85 2149-2154.
98. Meurer, J.A., Naylor, J.M., Baker, C.A., Thomsen, D.R., Homa, F.L. and Elhammer, A. P. (1995) *J. Bio-* 65 *chem.* 118 568-574.
99. Michels, P.C., Khmel'nitsky, Y.L., Dordick, J.S. and Clark, D.S. (1998) *TIBTECH* 16 210-215.

100. Minamida, S., Aoki, K., Natsuka, S., Omichi, K., Fukase, K., Kusumoto, S. and Hase S. (1996) *J. Biochem.* 120 1002-1006.
101. Minowa, M.T., Oguri, S., Yoshida, A., Hara, T., Iwamatsu, A., Ikenaga and H., Takeuchi, M. (1998) *JBC* 273 11556-11562.
102. Misaki, A., Kakuta, M., Sasaki, T. and Miyaji, H. (1980) *Carbohydr. Res.* 92 115-129.
103. Misaki, A., Johnson, J., Kirkwood, S., Scaletti, J.V. and Smith F. (1968) *Carbohydr. Res.* 6 150-164.
104. Mizuochi, T., Nishimura, R., Derappe, C., Taniguchi, T., Hamamoto, T., Mochizuki, M. and Kobata, A. (1983) *JBC* 258 14126-14129.
105. Moore, J.C. and Arnold, F.H. (1996) *Nat. Biotechnol.* 14 458-467.
106. Nagata Y, Yamashiro S, Yodoi J, Lloyd KO, Shiku H, Furukawa K (1992) *JBC* 267 12082-12089.
107. Nara K., Watanabe Y., Maruyama K., Kasahara K., Nagai Y., Sanai Y. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 7952-7956.
108. Nicholls, A., Sharp, K. and Honig, B. (1991) *Proteins Struct. Funct. Genet.* 11 281-296.
109. Nicolaou, K.C., Florke, H., Egan, M.G., Barth, T. and Estevez, V.A. (1995) *Tetrahedron Lett.* 36 1775-1778.
110. Nigou, J., Gilleron, M., Cahuzac, B., Bounery, J.-D., Herold, M., Thurnher, M. and Puzo, G. (1997) *JBC* 272 23094-23103.
111. Nilsson, K.G.L. (1988) *TIBTECH* 6 256-264.
112. Nilsson, K.G.L. (1996) in *Modern Methods in Carbohydrate Synthesis*, eds. Khan, S.H. and O'Neill R.A. p. 518-546.
113. Nishikar A., Ihara Y., Hatakeyama M., Kangawa K., Taniguchi N. (1992) *JBC* 267 18199-18204.
114. Nishino, T., Yokoyama, G., Dobashi, K., Fujihara, M. and Nagumo, T. (1989) *Carbohydr. Res.* 186 119-129.
115. Omichi, K., Aoki, K., Minamida, S. and Hase, S. (1997) *Eur. J. Biochem.* 245 143-146.
116. Orlean, P., Albright, C. and Robbins, P.W. (1988) *JBC* 263 17499-17507.
117. Orntoft, T. F. and Bech, E. (1995) *Glycoconj. J.* 12 200-205.
118. Oths, P.J., Hayer, R.M. and Floss, H.G. (1990) *Carbohydr. Res.* 198 91-99.
119. Palcic, M.M. (1994) *Methods in enzymology* 230 300-316.
120. Palcic, M.M., Heerze, L.D., Pierce, M. and Hingsaul, O. (1988) *Glycocon. J.* 5 49-63.
121. Palcic, M., Venot, A.P., Ratcliffe, R.M. and Hingsaul, O. (1989) *Carbohydr. Res.* 190 1-11.
122. Pease, A., Solas, D., Sullivan, E.J., Cornin, M.T., Holmes, C.P. and Fodor, S.P.A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 5022-5026.
123. Prieto, P.A., Mukerji, P., Kelder, B., Erney, R., Gonzales, D., Yun, J.S., Smith, D.F., Moremen, K.W., Nardelli, C., Pierce, M., Li, Y., Chen, X., Wagner, T.E, Cummings, R.D. and Kopchick, J.J. (1995) *JBC* 270 295115-29519.
124. Rademann, J. and Schmidt, R.R. (1996) *Tetrahedron Lett.* 37 3989-3990.
125. Ramsay, G. (1998) *Nat. Biotechnol.* 16 40-44.
126. Rees, D.A. (1965) *Ann. Rep. Chem. Soc. (London)* 469-477.
127. Robinson, J.A., Robinson, H.C. (1985) *Biochem. J.* 227 805-814.
128. Rodebaugh, R., Joshi, S., Fraser-Reid, B. and Geysen, H.M. (1997) *J. Org. Chem.* 62 5660-5661.

129. **Romero, P.A., Lussier, M., Sdicu, A.M., Bussey, H. and Herscovics, A. (1997) *Biochem. J.* 321 289-295.**
130. **Ronin, C. (1998) *Clin. Chem. Lab. Med.* 36 373-378.**
- 5 131. **Saito, H., Gu, J., Nishikawa, A., Ihara, Y., Fujii, J., Kohgo, Y. and Taniguchi, N. (1995) *Eur. J. Biochem.* 233 18-26.**
132. **Sanson, C. (1997) *Nat. Biotechnol.* 15 1253-1256.**
- 10 133. **Sasaki, T., Abiki, N., Nitta, K., Takatsuka, N. and Sugino, Y (1978) *Cancer Res.* 38 379-383.**
134. **Schachter, H., Brockhausen, I. and Hull, E. (1989) *Methods Enzymol.* 179 351-397.**
- 15 135. **Schachter, H. (1994) in Molecular Glycobiology, Fukuda, M. and Hindsagul, O. (eds) *Oxford University Press*, NY pp. 88-149.**
136. **Schaeper, R.J., Das, K.K., Zhixiong, L. and Basu, S. (1992) *Carbohydr. Res.* 236 227-244.**
137. **Schawrtz, N. (1976) *JBC* 251 285-291.**
- 20 138. **Schenkman, S., Jiang, M.-S., Hart, G.W. and Nussenzweig, A. (1991) *Cell* 65 1117-1125.**
139. **Schullek, J.R., Butler, J.H., Ni, Z.-J., Chen, D. and Yuan, Z. (1997) *Ana. Biochem.* 246 20-29.**
- 25 140. **Schulte, S. and Stoffel W. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90 10265-10269..**
141. **Schuster, M., Wang P., Paulson C. and Wong C., H. (1994) *JACS* 116 1135.**
142. **Schwartz, N.B. and Rodn, L. (1975) *JBC* 250 5200-5207.**
- 30 143. **Seitz, O. and Wong, C.-H. (1997) *JACS* 119 8766-8776.**
144. **Shah, K., Liu, Y., Deirmengian, C. and Shkat, K.M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 3565-3570.**
- 35 145. **Shoreibah, M., Peng, G.S., Adler, B., Weinstein, J., Basu, R., Cupples, R., Wen, D., Browne, J.K., Buckhaults, P. and Fregien, N. (1993) *JBC* 268 15381-15385.**
146. **Simon, P.M. (1996) *Drug Discovery Today* 1 552-528.**
- 40 147. **Sittampalam, G.S., Kahl, S.D. and Janzen, W.P. (1997) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1 384-391.**
148. **Smith, T.K., Cottaz, S., Brimacombe, J.S. and Ferguson (1996) *JBC* 271 6476.**
149. **Sosnowski, R.G., Tu, G., Butler, W.F., and Heller, M.J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 1119-1123.**
- 45 150. **Spaller, M.R., Burger, M.T., Fardis, M. and Bartlett, P.A. (1997) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1 47-53.**
151. **Stinson, S.C. (1998) *C&EN* 16 42-46.**
- 50 152. **Strahan, K.M., Gu, F., Preece, A.F., Gustavsson, I., Andersson, L. and Gustafsson K. (1995) *Immunogenetics* 41 101-105.**
153. **Stults, C.L.M. and Macher, B.A., (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* 280 20-26.**
- 55 154. **Tan, J., D'Agostaro, A.F., Bendiak, B., Reck, F., Sarkar, M., Squire, J.A., Leong, P. and Schachter, H. (1995) *Eur. J. Biochem.* 231 317-328.**
155. **Toki D., Sarkar M., Yip B., Reck F., Joziassse D., Fukuda M., Schachter H., Brockhausen I. (1997) *Biochem. J.* 325 63-69.**
- 60 156. **Toone, E.J., Simon, M.D., Bednarski, G.M. and Whitesides, G.M. (1989) *Tetrahedron* 45 5365-5422.**
157. **Unverzagt, C. (1996) *Anew Chem Int Ed.* 35 2350-2352.**
- 65 158. **Uozumi, N., Yanagidani, S., Miyoshi, E., Ihara, Y., Sakuma, T., Gao, C.X., Teshima, T., Fujii, S., Shiba, T. and Taniguchi, N. (1996) *JBC* 271 27810-27817.**
159. **Van den Eijnden, D.H., Koenderman, A.H.L. and Schiphorst, W.E.C.M. (1988) *JBC* 263 12461-12471.**

160. **Voynow**, J.A., **Kaiser**, R.S., **Scanlin**, T.F. and **Glick**, M.,C. (1991) *JBC* 266 21572-21577.
161. **Watt**, G.M., **Lowdsen**, P.A.S. and **Filtsch**, S.L. (1997) *Curr. Opin. Struc. Biol.* 1 652-660.
- 5 162. **Wen**, D.X., **Livingston**, B.D., **Medzihradzsky**, K.F., **Kelm**, S., **Burlingame**, A.L. and **Paulson**, J.C. (1992) *JBC* 267 21011-21019.
163. **Witczak**, Z.J. and **Nieforth**, K.A. (1997) in: Carbohydrates in drug design (eds.) *Marcel Dekker*, N.Y.
- 10 164. **Wong**, C.-H. (1996) in Modern Methods in Carbohydrate Synthesis, eds. Khan, S.H. and O'Neill R.A. pp. 467-491.
165. **Wong**, C.H., **Ye**, X.S. and **Zhang**, Z. (1998) *JACS* 120 7137-7138
- 15 166. **Yamamoto**, F., **Marken**, J., **Tsuji**, T., **White**, T., **Clausen**, H. and **Hakomori**, S. (1990) *JBC* 265 1146-1151.
167. **Yan**, L.Y., **Smith**, D.F. and **Cummings**, R.D., (1994) *Anal. Biochem.* 223 111-118.
168. **Yanagidani**, S., **Uozumi**, N., **Ihara**, Y., **Miyoshi**, E., **Yamaguchi**, N. and **Taniguchi** N. (1997) *J. Biochem.* 20 121 626-632.
169. **Yip**, C.L., **Welch**, S.K., **Klebl**, F., **Gilbert**, T., **Seide**, I.P., **Grant**, F.J., **Ohara**, P.J. and **MacKay**, V.L. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 2723-2727.
- 25 170. **Zehavi**, U. and **Herchman**, M. (1984) *Carbohydr. Res.* 128 160.
171. **Zehavi**, U., **Sadeh**, S. and **Herchman**, M. (1983) *Carbohydr. Res.* 124 23.
172. **Zeng**, Y., **Bannon**, G., **Thomas**, V.H., **Rice**, K., **Drake**, R. and **Elbein**, A. (1997) *JBC* 272 31340-31347.
- 30 173. **Zhang**, J.H., **Dawes**, G. and **Stemmer**, W.P.C. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 4504-4509.

REIVINDICACIONES

1. Biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable producida enzimáticamente *in situ* que comprende una pluralidad de estructuras de hidratos de carbono, uniéndose cada una a una posición específica y direccionable de un soporte sólido único plano, en la que cada una de dicha pluralidad de estructuras de hidratos de carbono se compone de monosacáridos, de tal modo que se define una estereoespecificidad de cada enlace que interconecta dichos hidratos de carbono por dicha posición direccionable sobre dicho soporte sólido único plano.
2. Biblioteca de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 1, en la que cada una de dicha pluralidad de estructuras de hidratos de carbono se une a dicho soporte sólido único plano por medio de un ligador.
3. Biblioteca de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 2, en la que dicho ligador puede escindir-se.
4. Biblioteca de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 2, en la que dicho ligador incluye al menos dos enlaces covalentes contiguos.
5. Biblioteca de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 2, en la que dicho ligador se selecciona del grupo que consiste en un aminoácido, un péptido, una proteína no glucosilada, un lípido, una ceramida, fosfato de dolicol, una ciclodextrina, un oligosacárido, un monosacárido, una cadena alquílica y un ácido nucleico.
6. Biblioteca de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 2, en la que dicho ligador tiene al menos 20 Angstrom de longitud.
7. Biblioteca de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 2, en la que dicho ligador comprende al menos un derivado de etilenglicol, al menos dos derivados de cloruro cianúrico y un grupo anilina.
8. Biblioteca de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 1, en la que dicho soporte sólido único plano es una plataforma plana.
9. Biblioteca de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 8, en la que dicho soporte único sólido plano es un chip y además en la que diferentes estructuras de hidratos de carbono de dicha pluralidad de estructuras de hidratos de carbono están dispuestas sobre dicho chip en pequeñas extensiones separadas no más de 2,25 mm entre sí, de centro a centro.
10. Biblioteca de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 1, en la que dicho soporte sólido único plano es de una sustancia seleccionada del grupo que consiste en poliestireno reticulado con divinilbenceno, copolímero de bloque de polietilenglicol-poliestireno, poliamidas, poliacrilamida, polimetacrilamida, sílice, vidrio, cuarzo, plástico y celulosa.
11. Biblioteca de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 1, en la que al menos una de dicha pluralidad de estructuras de hidratos de carbono comprende al menos dos unidades de sacárido idénticas unidas covalentemente.
12. Biblioteca de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 1, en la que al menos una de dicha pluralidad de estructuras de hidratos de carbono comprende al menos una ramificación.
13. Biblioteca de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 1, en la que al menos una de dicha pluralidad de estructuras de hidratos de carbono comprende al menos 4 unidades de sacárido.
14. Biblioteca de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 1, en la que al menos una de dicha pluralidad de estructuras de hidratos de carbono comprende al menos 5 unidades de sacárido.
15. Biblioteca de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 1, en la que al menos una de dicha pluralidad de estructuras de hidratos de carbono comprende al menos 6 unidades de sacárido.
16. Biblioteca de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 1, en la que la menos una de dicha pluralidad de estructuras de hidratos de carbono comprende al menos 7 unidades de sacárido.
17. Biblioteca de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 1, en la que al menos una parte de dicha pluralidad de estructuras de hidratos de carbono son estructuras de hidratos de carbono que no se producen naturalmente.
18. Biblioteca de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 1, en la que al menos una parte de dicha pluralidad de estructuras de hidratos de carbono son estructuralmente idénticas a las estructuras de hidratos de carbono que se producen naturalmente.

19. Biblioteca de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 18, en la que dichas estructuras de hidratos de carbono que se producen naturalmente se derivan de células humanas.

20. Biblioteca de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 18, en la que dichas estructuras de hidratos de carbono que se producen naturalmente se derivan de tejido, células y/o líquidos corporales de un ser humano.

21. Biblioteca de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 18, en la que al menos una parte de dicha pluralidad de estructuras de hidratos de carbono son estructuralmente idénticas a los dominios de al menos una estructura de hidrato de carbono que se produce naturalmente.

22. Biblioteca de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 21, en la que dicho al menos un hidrato de carbono que se produce naturalmente se deriva de células humanas.

23. Biblioteca de hidratos de carbono direccionable según la reivindicación 1, en la que dicha pluralidad de estructuras de hidratos de carbono se seleccionan del grupo que consiste en:

Fuc(α 1,2)Gal(β)

NeuAC(a2,3)Gal(β 1,3)GlcNAc(α)

NeuAC(a2,3)Gal(β 1,3)GlcNAc(β)

NeuAC(a2,6)Gal(β 1,4)GlcNAc(α)

NeuAC(a2,6)Gal(β 1,4)GlcNAc(β)

NeuAC(a2,3)Gal(β 1,4)GlcNAc(α)

Fuc(α 1,2)[Gal(β 1,4)]GlcNAc(β)

Fuc(α 1,2)[Gal(β 1,4)]GlcNAc(α)

Fuc(α 1,6)[Man(β 1,4)GlcNAc(β 1,4)]GlcNAc(β)

Man(β 1,4)GlcNAc(β 1,4)GlcNAc(β)

Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man(α)

Man(α 1,3)Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man(α)

Gal(α 1,3)Gal(β 1,4)GlcNAc(β)

GalNAc(α 1,3)[Fuc(α 1,2)]Gal(β)

GalNAc(β 1,4)[NeuAC(a2,3)]Gal(β 1,4)GlcNAc(β)

GlcA(β 1,3)Gal(β 1,3)Gal(β 1,4)Xyl(β)

GlcNAc(β 1,6)Gal(β 1,4)GlcNAc(β)

GlcNAc(β 1,6)GalNAc(β 1,3)Gal(α)

GlcNAc(β 1,2)Man(α 1,3)[Man(α 1,6)]Man(β)

GlcNAc(β 1,2)Man(α 1,3)[Man(α 1,6)]Man(β)

NeuAC(a2,6)GalNAc(α)

Fuc(α 1,2)Gal(β)

Fuc(α 1,2)[Gal(β 1,4)]GlcNAc(β)

Fuc(α 1,6)GlcNAc(β)

Fuc(α 1,3)Glc(β)

Fuc(α 1,4)GlcNAc(β)

ES 2 277 588 T3

	Fuc(α 1,3)GlcNAc(β)
	Gal(β 1,3)GlcNAc(α)
5	Gal(β 1,3)GlcNAc(β)
	Gal(β 1,4)Xyl(β)
10	Gal(β 1,3)GlcNAc(β)
	GlcNAc(β 1,3)GalNAc(β)
	GlcNAc(β 1,3)GalNAc(α)
15	GlcNAc(β 1,4)GlcNAc(α)
	GlcNAc(β 1,4)GlcNAc(β)
20	GlcNAc(β 1,6)Gal(α)
	GlcNAc(β 1,6)Gal(β)
	GlcNAc(β 1,3)Gal(α)
25	GlcNAc(β 1,3)Gal(β)
	Gal(β 1,3)GlcNAc(β 1,3)Gal(β 1,4)Glc(β)
	Gal(β 1,4)GlcNAc(β 1,3)Gal(β 1,4)Glc(β)
30	Gal(β 1,3)GlcNAc(β 1,3)Gal(β)
	Gal(β 1,4)GlcNAc(β 1,6)Gal(β)
35	Gal(β 1,4)GlcNAc(β 1,3)Gal(β)
	Fuc(α 1,3)GlcNAc(β 1,6)Gal(β)
	Fuc(α 1,4)GlcNAc(β 1,3)Gal(β)
40	Fuc(α 1,2)Gal(β 1,3)GlcNAc(β)
	Fuc(α 1,2)Gal(β 1,4)GlcNAc(β)
45	Fuc(α 1,3)GlcNAc(β 1,3)Gal(β)
	Fuc(α 1,3)GlcNAc(β 1,3)Gal(β 1,4)Glc(β)
	Fuc(α 1,4)GlcNAc(β 1,3)Gal(β 1,4)Glc(β)
50	Fuc(α 1,3)GlcNAc(β 1,6)Gal(β 1,4)Glc(β)
	Gal(β 1,4)GlcNAc(β 1,6)Gal(β 1,4)Glc(β)
55	Gal(β 1,4)GlcNAc(β 1,3)Gal(β 1,4)Glc(β)
	Gal(β 1,3)GlcNAc(β 1,6)Gal(β 1,4)Glc(β)
	Fuc(α 1,2)Gal(β 1,3)GlcNAc(β 1,3)Gal(β)
60	Fuc(α 1,2)Gal(β 1,4)GlcNAc(β 1,3)Gal(β)
	GlcNAc(β 1,3)Gal(β 1,4)GlcNAc(β 1,3)Gal(β)
65	Fuc(α 1,2)[Gal(β 1,4)]Glc(β)
	Fuc(α 1,3)[Gal(β 1,4)]GlcNAc(β)

ES 2 277 588 T3

GlcNAc(β 1,3)[GlcNAc(β 1,6)]Gal(β)
 Fuc(α 1,4)[Gal(β 1,3)]GlcNAc(β)
 5 GlcNAc(β 1,3)[GlcNAc(β 1,6)]Gal(β)
 Fuc(α 1,3)[Gal(β 1,4)]GlcNAc(β 1,3)Gal(β)
 Fuc(α 1,3)[Fuc(α 1,2)Gal(β 1,4)]GlcNAc(β)
 10 Fuc(α 1,4)[Gal(β 1,3)]GlcNAc(β 1,3)Gal(β)
 Fuc(α 1,2)Gal(β 1,4)[Fuc(α 1,3)]GlcNAc(β)
 15 Fuc(α 1,3)[GlcNAc(β 1,3)Gal(β 1,4)]GlcNAc(β)
 GlcNAc(β 1,6)[GlcNAc(β 1,3)]Gal(β 1,4)Glc(β)
 Fuc(α 1,3)GlcNAc(β 1,6)[GlcNAc(β 1,3)]Gal(β)
 20 Fuc(α 1,3)[Gal(β 1,4)]GlcNAc(β 1,6)Gal(β)
 GlcNAc(β 1,6)[Gal(β 1,3)GlcNAc(β 1,3)]Gal(β)
 25 Fuc(α 1,6)GlcNAc(β)
 GlcNAc(β 1,4)GlcNAc(β)
 Man(α 1,4)GlcNAc(β 1,4)GlcNAc(β)
 30 Man(α 1,6)Man(α 1,4)GlcNAc(β 1,4)GlcNAc(β)
 Man(α 1,3)Man(β 1,4)GlcNAc(β 1,4)GlcNAc(β)
 35 GlcNAc(β 1,4)[GlcNAc(β 1,2)]Man(α)
 Fuc(α 1,6)[GlcNAc(β 1,4)]Man(α)
 Gal(β 1,4)GlcNAc(β 1,4)[GlcNAc(β 1,2)]Man(α)
 40 GlcNAc(β 1,4)[Gal(β 1,4)GlcNAc(β 1,2)]Man(α)
 Man(α 1,4)GlcNAc β 1,4[Fuc(α 1,6)]GlcNAc(β)
 45 Gal(β 1,4)GlcNAc(β)
 Gal(α 1,3)Gal(β 1,4)GlcNAc(β)
 Gal(β 1,4)[Fuc(α 1,3)]GlcNAc(β)
 50 NeuAC(α 2,3)Gal(β 1,4)[Fuc(α 1,3)]GlcNAc(β)
 Gal(β 1,4)GlcNAc(β 1,3)Gal(β 1,4)GlcNAc(β)
 55 Glc(β 1,3)Glc(β)
 Glc(β 1,2)Glc(β)
 Glc(β 1,6)Glc(β)
 60 Glc(α 1,2)Glc(α)
 Glc(α 1,3)Glc(α)
 65 Glc(α 1,4)Glc(α)
 Glc(α 1,6)Glc(α)

ES 2 277 588 T3

	Ara(α 1,2)Ara(α)
	Ara(α 1,5)Ara(α)
5	Ara(α 1,2)Glc(β)
	Ara(α 1,3)Glc(β)
10	Ara(α 1,4)Glc(β)
	Ara(α 1,6)Glc(β)
	Xyl(α 1,2)Man(α)
15	Man(α 1,2)Man(α)
	Man(α 1,3)Man(α)
20	Man(α 1,6)Man(α)
	Gal(α 1,2)Gal(α)
	Gal(α 1,3)Gal(α)
25	Gal(α 1,4)Gal(α)
	Gal(α 1,6)Gal(α)
30	Gal(β 1,2)Gal(β)
	Gal(β 1,3)Gal(β)
	Gal(β 1,6)Gal(β)
35	NeuAc(α 2,3)Gal(β 1,3)GalNAc(α)
	NeuAc(α 2,6)Gal(β 1,3)GalNAc(α)
40	NeuAc(α 2,3)Gal(β 1,4)GlcNAc(α)
	NeuAc(α 2,3)Gal(β 1,3)[NeuAc(α 2,6)]GalNAc(α)
	NeuAc(α 2,8)NeuAc(α 2,3)Gal(β)
45	Man(β 1,4)GlcNAc(β 1,4)[Fuc(α 2,6)]GlcNAc(β)
	GlcNAc(β 1,4)[Fuc(α 2,6)]GlcNAc(β)
50	Man(α 1,3)Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man(α)
	Man(α 1,2)Man(α 1,2)Man(α)
	Man(α 1,3)[Man(α 1,6)]Man(β 1,4)GlcNAc(β)
55	Man(β 1,4)GlcNAc(β)
	Gal(β 1,6)Gal(β 1,4)Gal(β 1,4)Glc(β)
60	Gal(β 1,3)Gal(β 1,4)Xyl(β)
	Gal(α 1,3)[Fuc(α 1,2)]Gal(β 1,4)
	Gal(β 1,4)GlcNAc(β 1,6)Gal(β)
65	GalNAc(β 1,3)Gal(β 1,4)Gal(β 1,4)Glc(β)
	GalNAc(β 1,4)Gal(β 1,4)Glc(β)

GalNAc(α 1,3)[Fuc(α 1,2)]Gal(β 1,4)

Gal(β 1,3)Gal(β 1,4)Xyl(β)

5 GlcNAc(β 1,3)Gal(β 1,3)GlcNAc(β)

GlcNAc(β 1,6)Gal(β 1,3)GlcNAc(β)

10 GlcNAc(β 1,3)Gal(β 1,4)GlcNAc(β)

GlcNAc(β 1,6)[Gal(β 1,3)]GlcNAc(β)

GlcNAc(β 1,3)[GlcNAc(β 1,6)]GlcNAc(β)

15 GlcNAc(β 1,3)[GlcNAc(β 1,6)]Gal(β)

Xyl(α 1,3)Glc(β)

Xyl(α 1,3)Xyl(α 1,3)Glc(β)

20 Gal(β 1,3)GalNAc(β)

Gal(β 1,3)GlcNAc(β)

25 GlcNAc(β 1,3)GalNAc(β).

24. Biblioteca de hidratos de carbono según la reivindicación 1, en la que al menos algunos de dichos monosacáridos están en configuración alfa.

30 25. Biblioteca de hidratos de carbono según la reivindicación 1, en la que al menos algunos de dichos monosacáridos están en configuración beta.

26. Biblioteca de hidratos de carbono según la reivindicación 1, en la que al menos algunos de dichos monosacáridos están sulfatados.

35 27. Método de producción de una biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable, comprendiendo el método:

40 (a) proporcionar un soporte sólido único plano que tiene una pluralidad de posiciones direccionables; y

(b) sintetizar enzimáticamente una pluralidad de estructuras de hidratos de carbono sobre dicho soporte sólido único plano, en la que cada una de dicha pluralidad de estructuras de hidratos de carbono se compone de monosacáridos, de tal modo que se define una estereoespecificidad de cada enlace que interconecta dichos monosacáridos por dicha posición direccionable sobre dicho soporte sólido único plano, produciéndose así la biblioteca de hidratos de carbono direccionable.

28. Método según la reivindicación 27, en la que dicha biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable es la biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable según las reivindicaciones 1-26.

50 29. Método de identificación de un hidrato de carbono que puede unirse a una entidad, comprendiendo el método las etapas de:

(a) producir una biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable mediante:

55 (i) proporcionar un soporte sólido único plano que tiene una pluralidad de posiciones direccionables; y

(ii) sintetizar enzimáticamente una pluralidad de estructuras de hidratos de carbono sobre dicho soporte sólido único plano, en la que cada una de dicha pluralidad de estructuras de hidratos de carbono se compone de monosacáridos, de tal modo que se define una estereoespecificidad de cada enlace que interconecta dichos monosacáridos por dicha posición direccionable sobre dicho soporte sólido único plano, produciéndose así la biblioteca de hidratos de carbono direccionable; y

60 (b) seleccionar dicha biblioteca de hidratos de carbono direccionable con la entidad para identificar el hidrato de carbono que puede unirse a la entidad.

65 30. Método según la reivindicación 29, en el que dicha biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable es la biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable según las reivindicaciones 1-26.

31. Método según la reivindicación 29, en el que dicha entidad se selecciona del grupo que consiste en proteínas codificadas por una biblioteca EST y proteínas extraídas de una fuente natural.

32. Método de identificación de glucomarcadores asociados con una enfermedad o estado, comprendiendo el método:

- (a) sintetizar enzimáticamente una biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable que representa los glucomarcadores, en la que dicha biblioteca de hidratos de carbono direccionable comprende una pluralidad de estructuras de hidratos de carbono, uniéndose cada una a una posición específica y direccionable de un soporte sólido único plano, en la que cada una de dicha pluralidad de estructuras de hidratos de carbono se compone de monosacáridos, de tal modo que se define una estereoespecificidad de cada enlace que interconecta dichos monosacáridos por dicha posición direccionable sobre dicho soporte sólido único plano;
- (b) hacer reaccionar dicha biblioteca de hidratos de carbono direccionable con una muestra derivada de un individuo sano para generar así un perfil de anticuerpos anti-glucano de dicho individuo sano;
- (c) hacer reaccionar dicha biblioteca de hidratos de carbono direccionable con una muestra derivada de un individuo enfermo para generar así un perfil de anticuerpos antiglucano de dicho individuo enfermo;
- (d) identificar anticuerpos que están presentes en dicho perfil de anticuerpos antiglucano de dicho individuo enfermo y no en dicho perfil de anticuerpos antiglucano de dicho individuo sano, identificándose así los glucomarcadores asociados con una enfermedad o estado.

33. Método según la reivindicación 32, en el que dicha biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable es la biblioteca combinatoria de hidratos de carbono direccionable según las reivindicaciones 1-26.

34. Método según la reivindicación 32, en la que dicha muestra es una muestra de suero o una muestra de orina.

35. Método según la reivindicación 32, en el que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en cáncer, enfermedades cardiovasculares y trasplantes.

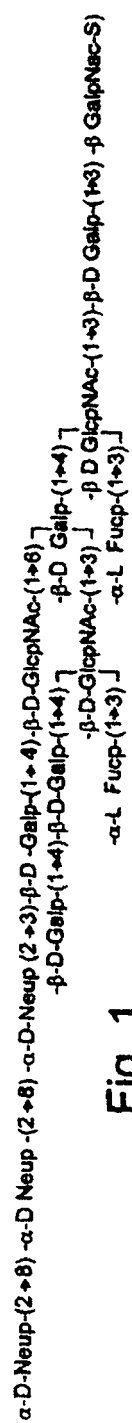


Fig. 1

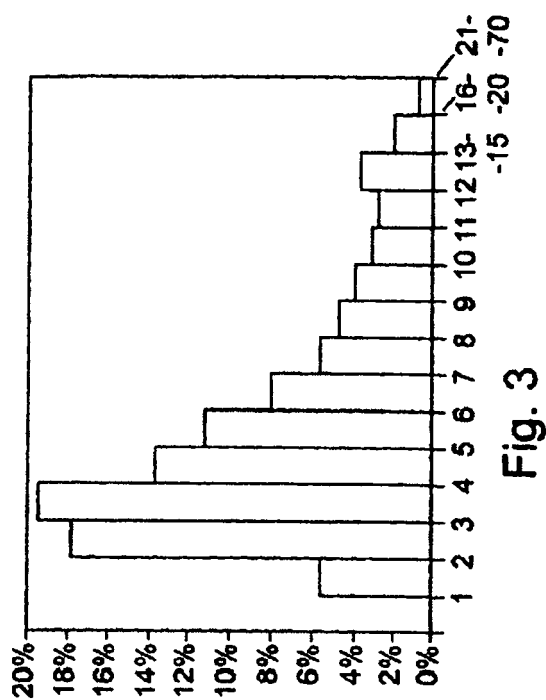


Fig. 3

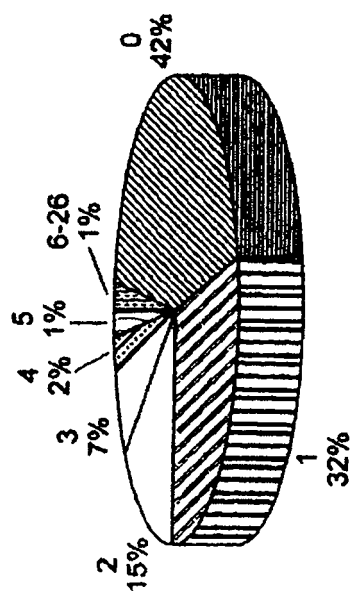


Fig. 2

RE	Formación de hidratos de carbono complejos	
Etapa 1		 S
Etapa 2		 3) - β GalpNac-S
D5		 3) - β -D Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- β GalpNac-S
Etapa 3		 3) - β -D Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- β GalpNac-S
H1		 3) - β -D Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- β GalpNac-S
Etapa 4		 3) - β -D Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- β GalpNac-S
D7		 3) - β -D Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- β GalpNac-S
Etapa 5		 3) - β -D Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- β GalpNac-S
H3		 3) - β -D Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- β GalpNac-S
Etapa 6		 3) - β -D Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- β GalpNac-S
D7		 3) - β -D Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- β GalpNac-S
Etapa 7		 3) - β -D Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- β GalpNac-S
D3		 3) - β -D Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- β GalpNac-S
Etapa 8		 3) - β -D Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- β GalpNac-S
H14		 3) - β -D Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- β GalpNac-S
Etapa 9		 3) - β -D Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- β GalpNac-S
B2		 3) - β -D Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- β GalpNac-S
Etapa 10		 3) - β -D Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- β GalpNac-S
D7		 3) - β -D Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- β GalpNac-S

Fig. 4

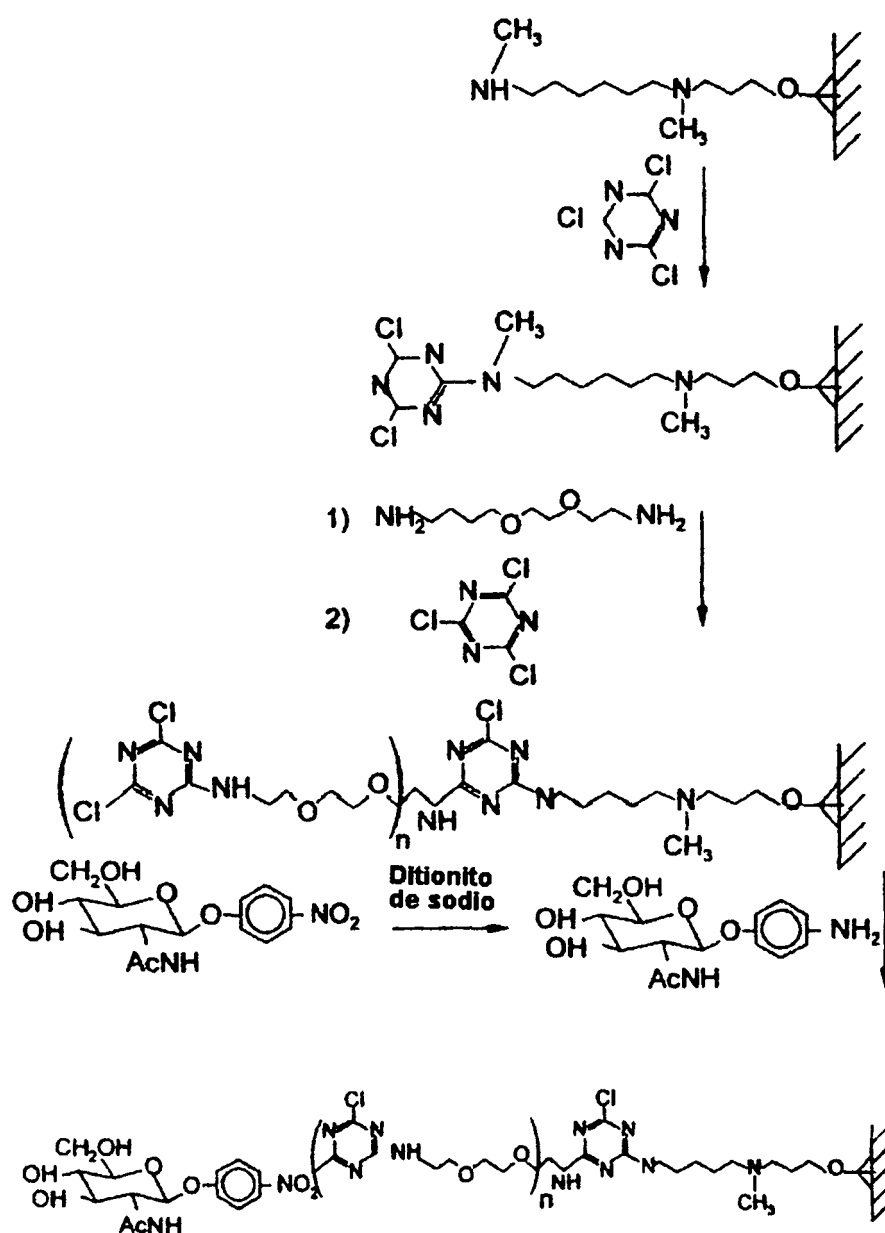


Fig. 5

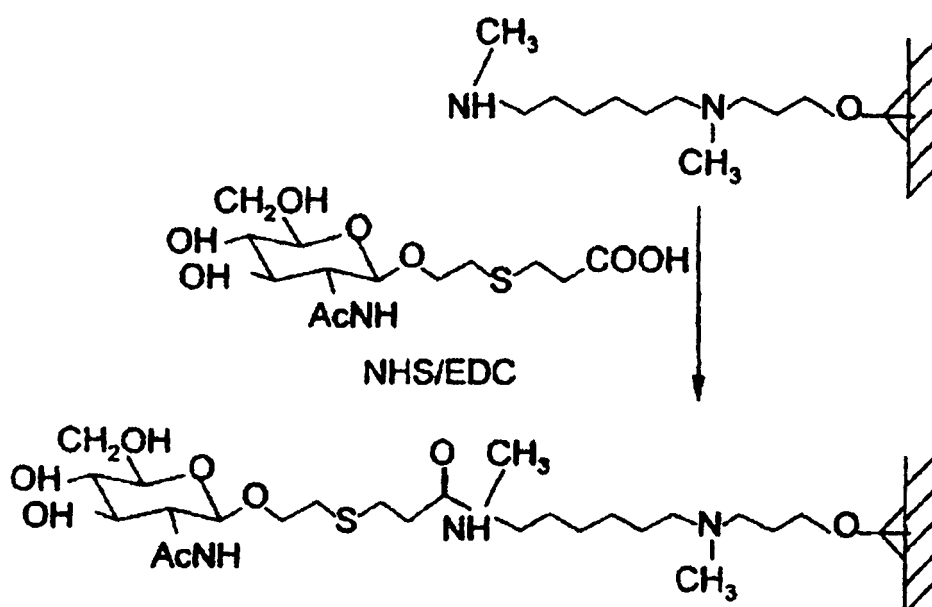


Fig. 6

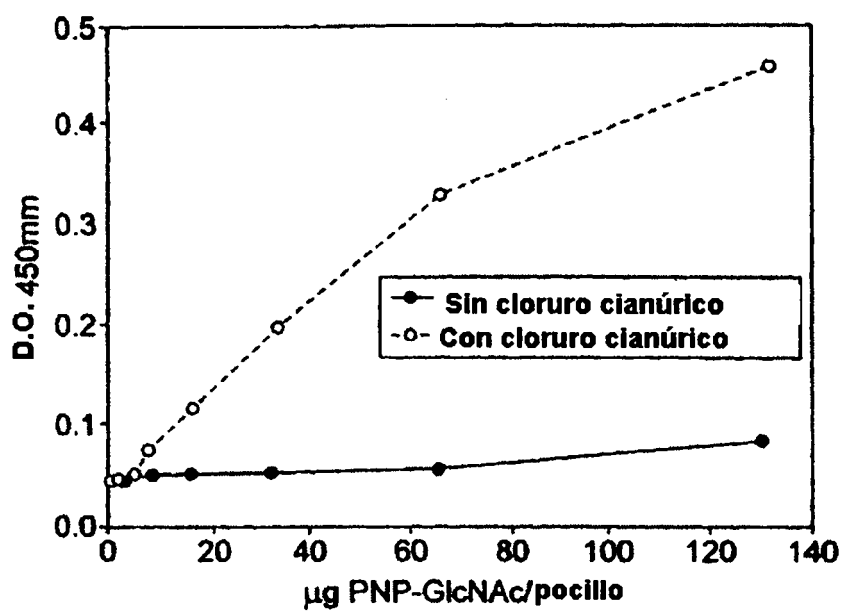


Fig. 7a

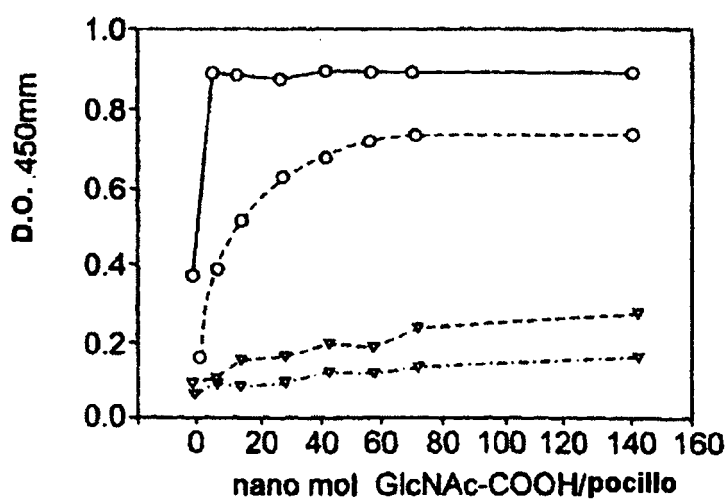


Fig. 7b

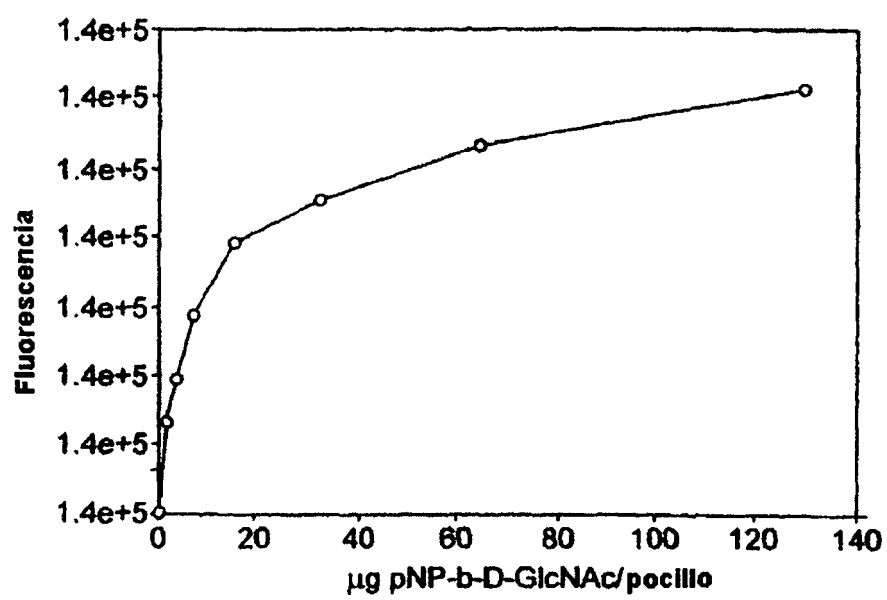


Fig. 7c

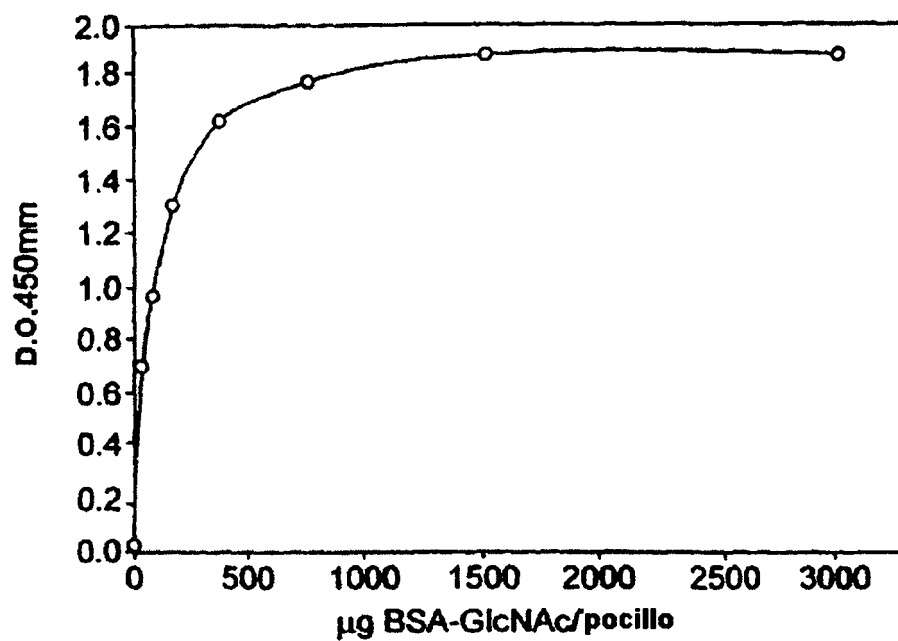


Fig. 8a

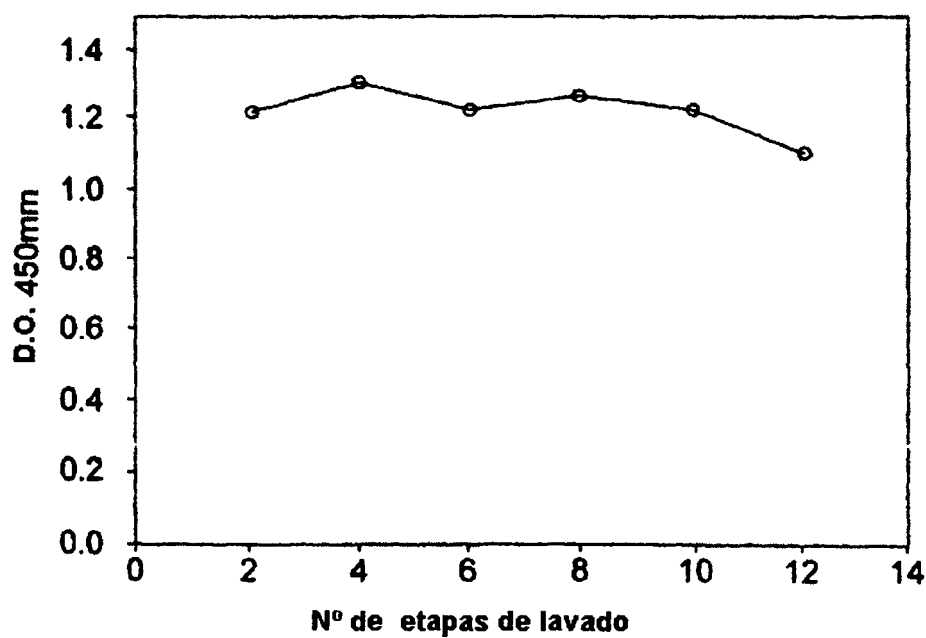


Fig. 8b

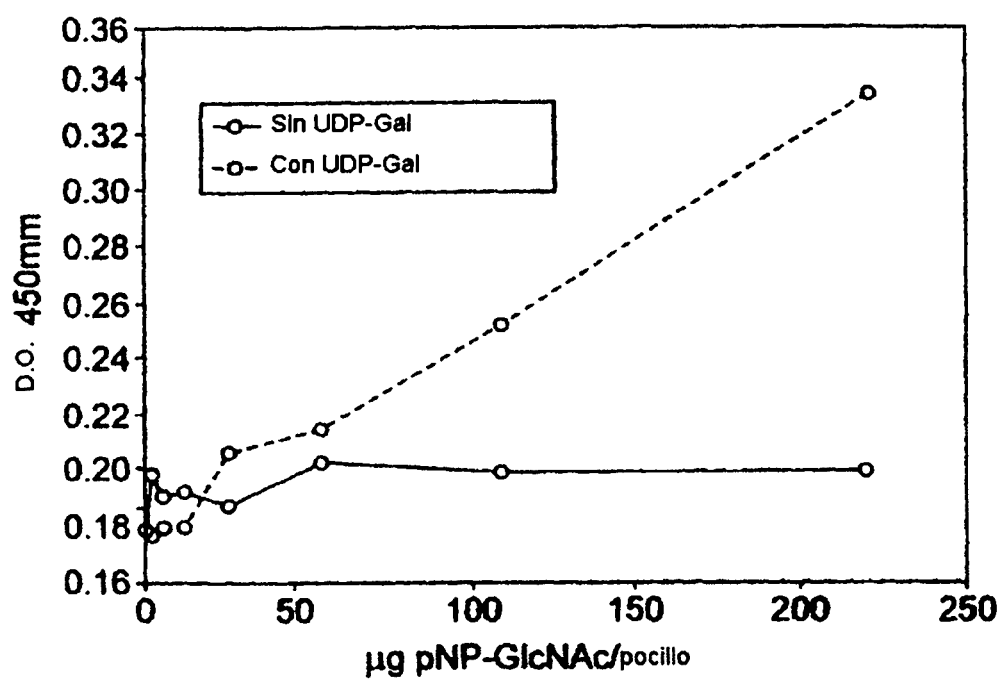


Fig. 8c

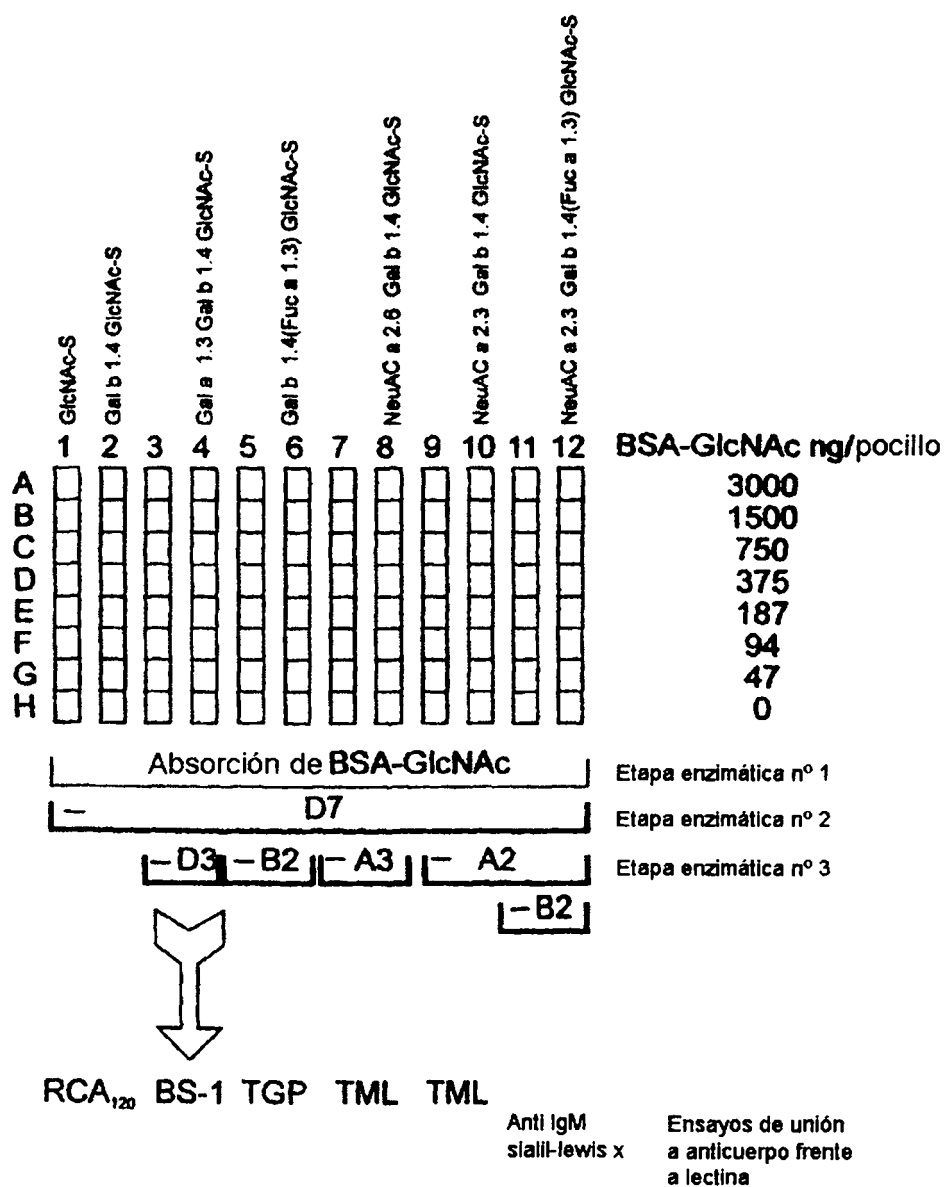


Fig. 9

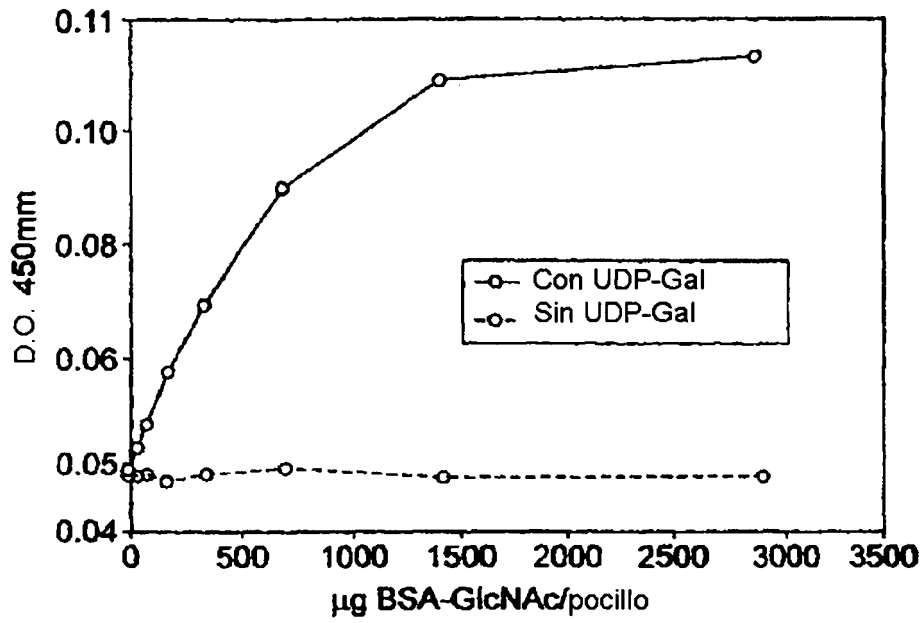


Fig. 10a

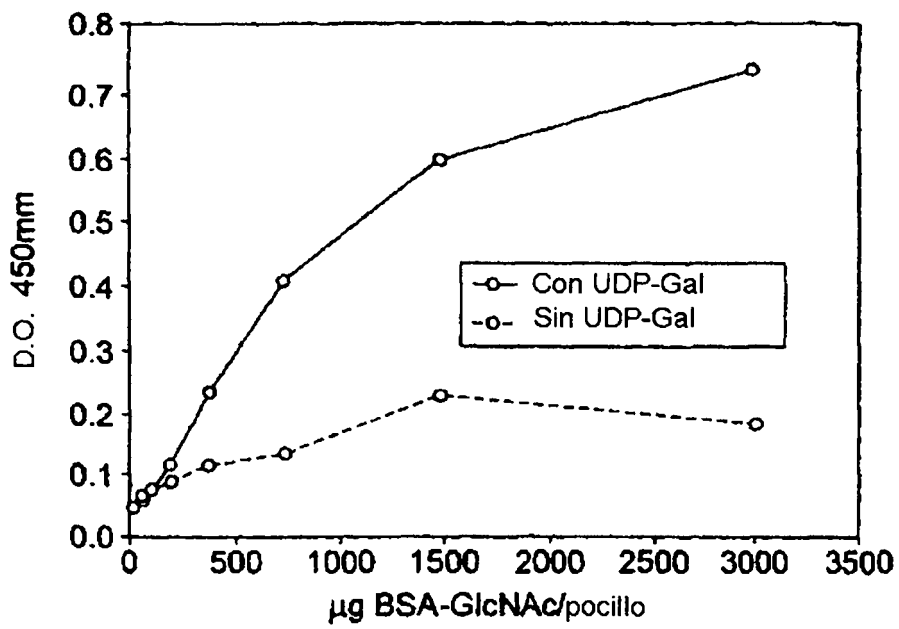


Fig. 10b

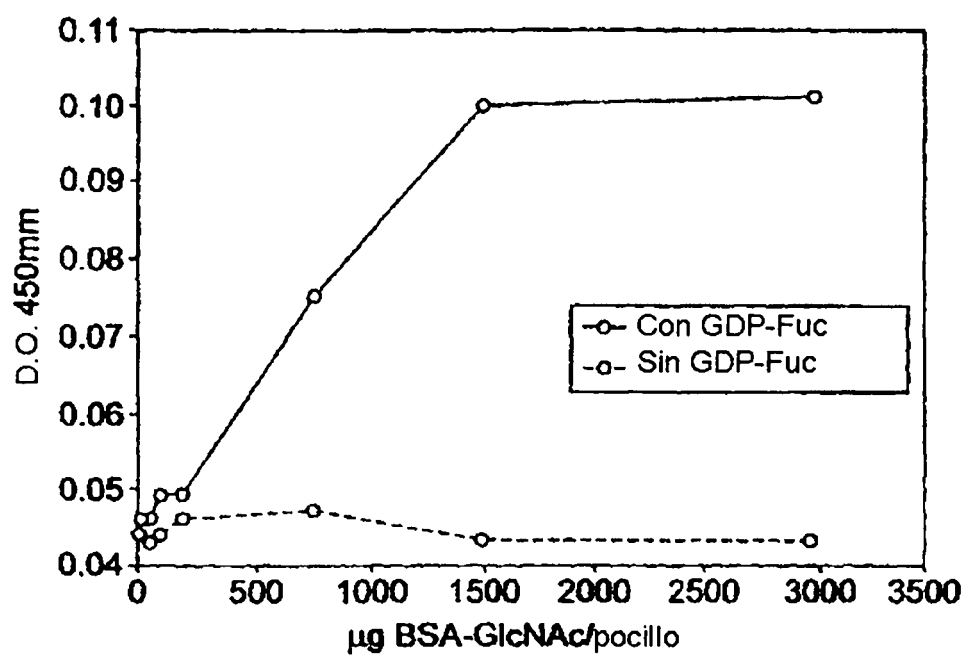


Fig. 10c

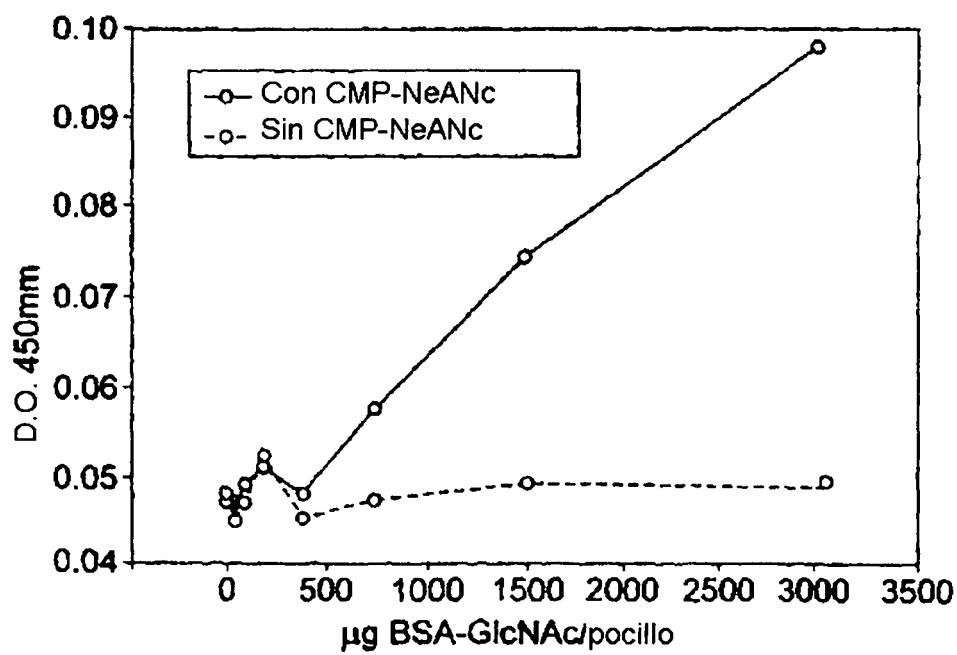


Fig. 10d

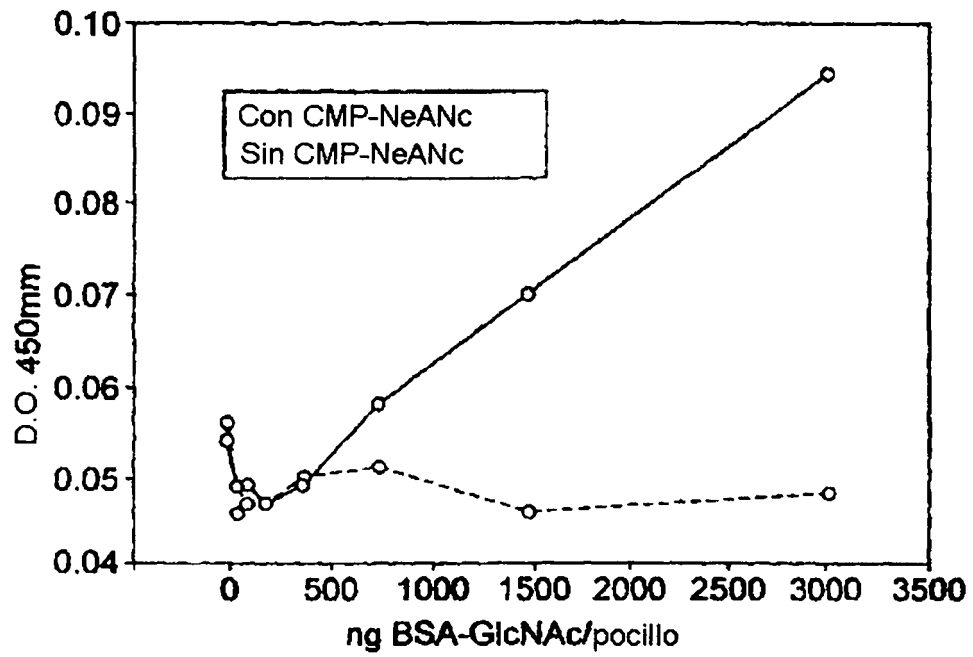


Fig. 10e

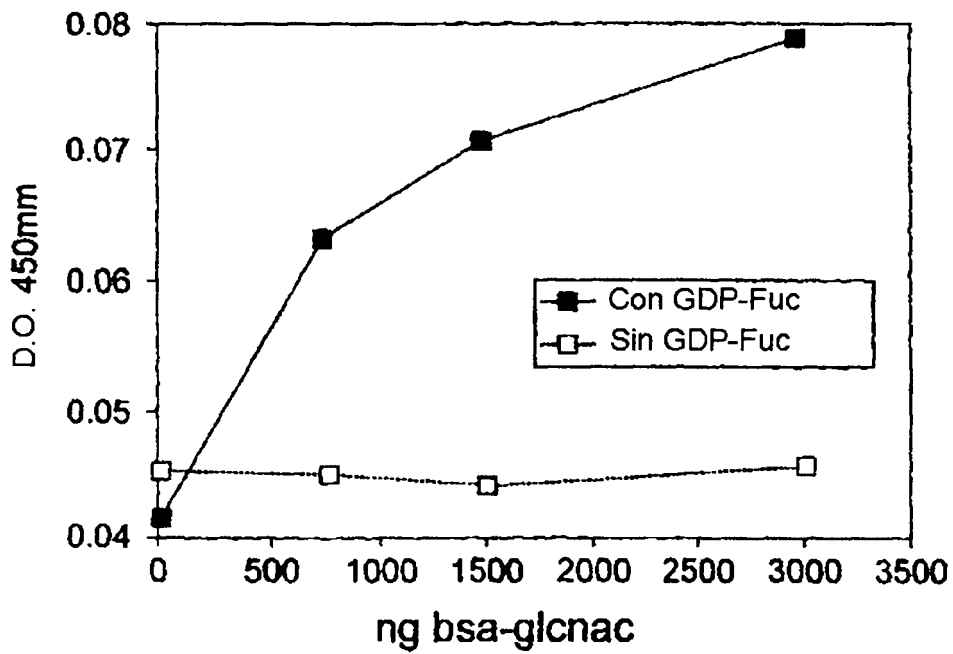


Fig. 10f

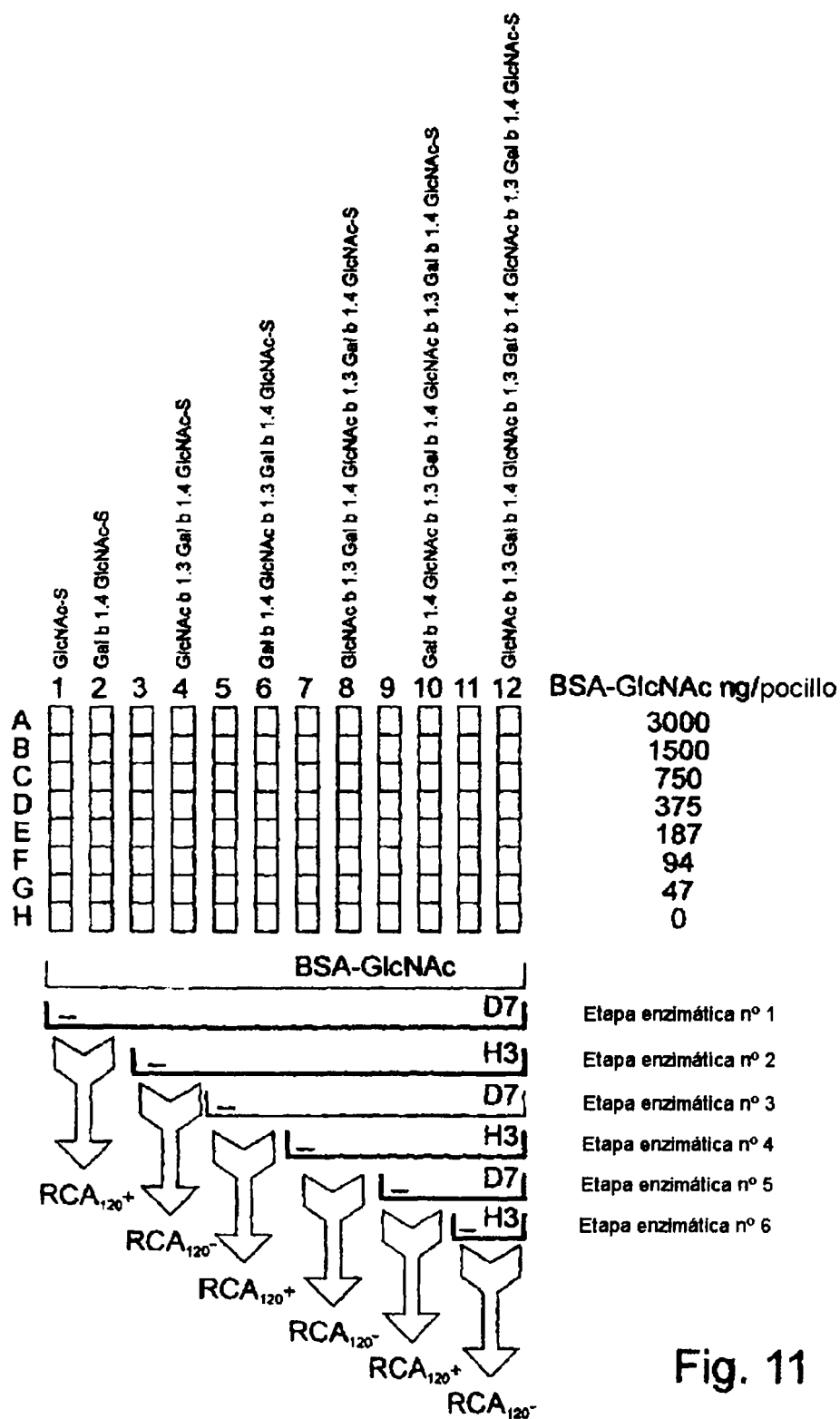


Fig. 11

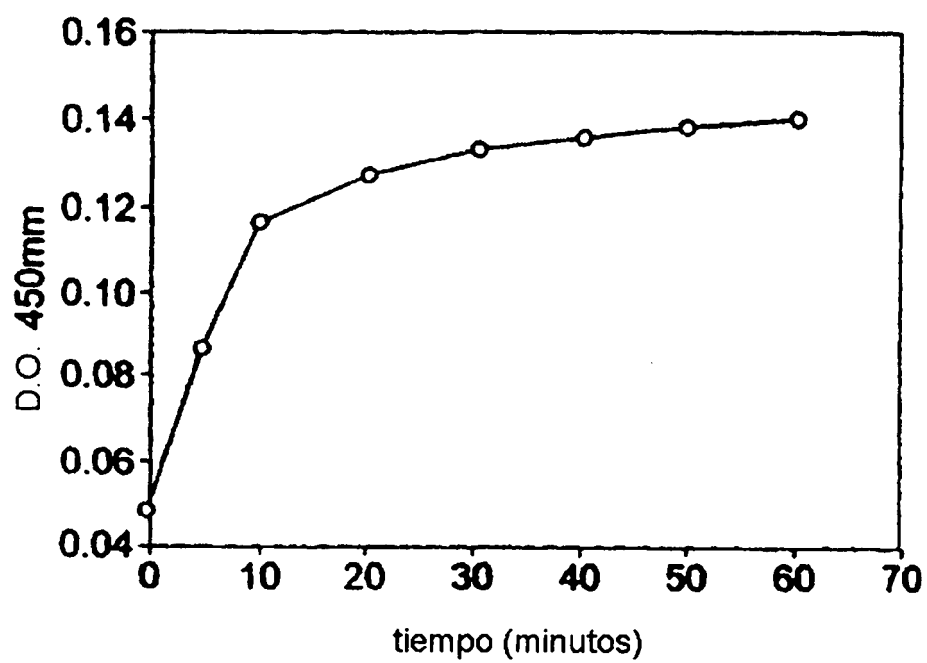


Fig. 12