



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 320 361**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/10 (2006.01)
C07B 61/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05800754 .3**
(96) Fecha de presentación : **08.11.2005**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1809743**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **25.07.2007**

(54) Título: **Síntesis química guiada por el ácido nucleico estructural.**

(30) Prioridad: **08.11.2004 EP 04105597**
07.06.2005 US 687849 P
11.10.2005 US 725347 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.05.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.05.2009

(73) Titular/es: **Vipergen A.p.S.**
Symbion Science Park, Fruebjergvej 3
2100 Copenhagen Ø, DK

(72) Inventor/es: **Hansen, Nils Jakob Vest;**
Blakskjær, Peter;
Hansen, Margit Haahr;
Petersen, Lars Kolster y
Heitner, Tara Renee

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 320 361 T3

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

DESCRIPCIÓN

Síntesis química guiada por el ácido nucleico estructural.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para la tecnología de presentación de ADN *in vitro*, que permite la presentación de una variedad de moléculas, tales como polímeros artificiales y moléculas pequeñas. Las ventajas de dichos procedimientos consisten en que pueden construirse bancos combinatorios y someterse a rondas de selecciones para las actividades, la ampliación y diversificación deseadas, permitiendo de este modo la evolución molecular.

Antecedentes

Se han desarrollado tecnologías de presentación para combinar el almacenamiento de la información y las capacidades de ampliación de ácidos nucleicos con las actividades funcionales de otro compuesto. Las tecnologías de presentación se basan en una asociación entre la entidad funcional y una secuencia informativa de ácido nucleico acerca de la estructura de la entidad funcional. Una ventaja de dichos procedimientos es que pueden construirse bancos muy grandes y sondarse para una actividad deseada de las entidades funcionales. Los miembros del banco que presentan la actividad deseada pueden dividirse entonces en miembros del banco que no presentan la actividad deseada, creando de este modo un banco enriquecido con una fracción mayor de miembros con la actividad deseada. Este proceso se denomina selección. Las estructuras de los miembros del banco en el banco enriquecido pueden a continuación identificarse por su secuencia de ácido nucleico afín, permitiendo de este modo la identificación incluso de cantidades diminutas de material.

Algunas tecnologías de presentación permiten asimismo ampliar el banco enriquecido sin conocer la identidad de sus miembros; no meramente las secuencias de ácido nucleico sino también las entidades funcionales. Dichas tecnologías de presentación se denominan “tecnologías de presentación ampliables”. Estas tecnologías son especialmente ventajosas cuando se trata de grandes bancos, porque las rondas iterativas de ampliación y selección pueden realizarse permitiendo el enriquecimiento aumentado de las actividades deseadas. Otra ventaja de las tecnologías de presentación ampliables es que pueden realizarse rondas de selección, ampliación y diversificación, utilizando de este modo el mismo principio que en la selección natural, para producir moléculas con la función deseada. Este proceso se denomina evolución molecular.

Se han desarrollado tecnologías de presentación que utilizan sistemas biológicos, la más destacable de las cuales es la presentación del fago (Smith, *Science*, 228, 1315-7, 1985). Sin embargo, dichos sistemas están limitados a la presentación de los productos naturales tales como proteínas y péptidos.

Se han descrito tecnologías de presentación *in vitro* que aprovechan la flexibilidad de la química orgánica. Un ejemplo se describe en la patente US nº 5.723.598. El procedimiento utiliza una molécula bifuncional; un grupo funcional capaz de aceptar un grupo químico y un grupo funcional capaz de aceptar una secuencia de ácido nucleico. El procedimiento para sintetizar dicho banco es conocido frecuentemente como “división y mezcla”, consistiendo en rondas de mezclado y división de las moléculas bifuncionales en compartimentos. Se añade un par específico del compartimento del grupo químico y de la secuencia de ácido nucleico. Las secuencias de ácido nucleico son de este modo las que codifican los grupos químicos. Todas las moléculas bifuncionales se mezclan a continuación y el proceso se itera para crear un gran banco combinatorio. El banco se somete a continuación a selección y las secuencias de ácido nucleico seleccionadas ampliadas por PCR, que pueden utilizarse para identificación por biológica molecular convencional; clonación y secuenciado del ADN.

Otro ejemplo se describe en el documento WO 04/039825A2, en el que se crea un banco combinatorio, mediante rondas de adición guiada por proximidad de pares afines del grupo químico y del código del ácido nucleico a una molécula bifuncional; un grupo funcional capaz de aceptar un grupo químico y un grupo funcional capaz de aceptar una secuencia de ácido nucleico. Además se utilizan repertorios de las denominadas unidades de transferencia, en las que un grupo químico está unido a un oligonucleótido, que contiene un segmento de codificación y un segmento capaz de hibridar a la molécula bifuncional. Un repertorio de unidades de transferencia se hibrida a las moléculas bifuncionales, lo que permite que el código sea transferido enzimáticamente a la molécula bifuncional, así como guiar el grupo químico para reaccionar con la propia molécula bifuncional. Este proceso puede repetirse para crear un gran banco combinatorio.

Los bancos descritos anteriormente pueden someterse a selecciones para formar un banco enriquecido. El historial de la síntesis de miembros de bancos enriquecidos puede ulteriormente deducirse mediante el ácido nucleico codificador. Una limitación de estos métodos es sin embargo que no puede ampliarse el banco enriquecido.

Se han descrito tecnologías de presentación *in vitro* que se aprovechan de la flexibilidad de la química orgánica y de las rondas de selección, ampliación y diversificación. Estos procedimientos se basan en la utilización de plantillas.

Un ejemplo se describe en el documento WO 00/23458, que utiliza un principio de “división y mezcla”. Se utiliza un banco de plantillas de ssADN, que cada una contiene un sitio de reacción química y varias posiciones de segmentos

de codón. Las plantillas se compartimentan con objeto de hibridar un repertorio de secuencias anticodón para una posición del codón dada. A continuación, se realiza una reacción química específica del compartimento modificando el sitio de reacción en las plantillas. Las plantillas se mezclan a continuación y se repite el proceso utilizando otras posiciones del codón para formar un banco combinatorio.

En el documento WO 02/074929A2 se describe otro ejemplo, utilizando un principio de un “solo recipiente”. Se utiliza un banco de plantillas de oligonucleótidos, que cada una contiene un sitio de reacción química y varias posiciones de segmentos del codón. Además, utilizando un repertorio de unidades de transferencia, el procedimiento consiste en una secuencia anticodón de oligonucleótidos y un grupo químico reactivo. El banco de plantillas se hibrida con un repertorio de unidades de transferencia para una posición del codón dada. Esto lleva el grupo químico en una unidad de transferencia hibridada a la proximidad del sitio de reacción en la plantilla hibridada, que por consiguiente guía la reacción química de pares afines. Este procedimiento se repite a continuación utilizando otras posiciones de codón para formar un banco combinatorio.

Una limitación de la guía de proximidad anterior de pares afines de código y grupo químico la proporciona la estructura lineal del oligonucleótido de la plantilla. Como consecuencia de la linealidad la distancia entre el codón y la zona de reacción química diferirá desde la posición de codón a la posición de codón. Para las posiciones de codón mayores alejadas del sitio de reacción la guía de proximidad estará comprometida, a medida que la concentración local disminuye hasta la potencia de tres en función de la distancia. Este inconveniente se vuelve más pronunciado para los bancos complejos, con más posiciones de codón y codones más complejos. Este problema se intenta resolver en el documento WO 04/016767A2, donde las unidades de transferencia además de un segmento anticodón contienen también un segmento constante, que es complementario a una secuencia constante en la plantilla próxima al sitio reactivo. De este modo, al hibridar una unidad de transferencia a una plantilla da como resultado que la secuencia de la plantilla entre la posición del codón en cuestión y el segmento constante sobresalga al exterior, para formar una estructura denominada omega. El concepto es que el segmento de codón es responsable de la especificidad y el segmento constante es responsable de la proximidad. En el documento WO 04/016767A2 se sugiere también, la estructura denominada en T de las plantillas, estando situado el sitio reactivo en la plantilla en medio de la plantilla, con las posiciones del codón extendidas en cada lado. Por consiguiente, el problema de la distancia se denominada “corte en la mitad”.

El documento WO 2004/056994A2 da a conocer un procedimiento similar al del WO 02/074929A2 o al del WO 04/016767A2 con la diferencia de que la plantilla se corta en secuencias menores, denominados polinucleótidos de conexión en la solicitud. Los polinucleótidos de conexión conectan unidades de transferencia para poner éstas en la proximidad de la reacción. En determinadas formas de realización los polinucleótidos de conexión pueden comprender un grupo químico reactivo. Para obtener una molécula codificada el procedimiento depende del reconocimiento codón/anticodón antes de la reacción.

Los bancos dirigidos a la plantilla descritos anteriormente se someten posteriormente a selecciones para formar bancos enriquecidos. Los antecedentes de la síntesis de los miembros de bancos enriquecidos pueden a continuación deducirse mediante el ácido nucleico codificador. Los bancos enriquecidos pueden ampliarse también y diversificarse mediante por ejemplo PCR propensa a error, permitiendo de este modo la evolución molecular.

Una limitación en estos métodos es que se ha creado un gran número de plantillas, lo que es engorroso, ya que las plantillas han de ser de considerable longitud para asegurar la hibridación codón/anticodón apropiada. En los procedimientos que utilizan una variedad de secuencias menores para preparar la síntesis dirigida final el número de secuencias que ha de sintetizarse es aún mayor que el tamaño del banco existente.

El documento WO 92/12164 describe una estructura tridimensional, covalente, cerrada, n-conectada (1) de oligonucleótidos en los que n es por lo menos 3. Los oligonucleótidos no llevan ningún reactivo con objeto de que se forme una molécula codificada. La formación de las estructuras plegadas de ácido nucleico parece servir un propósito estructural.

El documento WO 93/12244 describe asimismo unas estructuras de ácido nucleico tridimensionales sin la presencia de ningún reactivo.

El documento WO 00/61775 se refiere a un procedimiento de síntesis de sustancias biológicamente activas de determinada estructura directamente en las células de organismos vivos que contienen moléculas específicas de ARN o ADN de determinada secuencia. El procedimiento se basa en la hibridación de dos o más oligómeros unidos con precursores biológicamente inactivos de sustancias biológicamente activas para ARN o ADN específico *in vivo* en las células de organismos vivos. Después de la hibridación de los oligómeros al ARN o ADN en las células procede una reacción entre los precursores para formar la sustancia biológicamente activa.

Los procedimientos de la técnica anterior que utilizan plantillas adolecen del inconveniente de que la codificación depende de la hibridación de las secuencias codón y anticodón. A veces la hibridación entre los oligonucleótidos monocatenarios ocurrirá sin complementariedades perfectas. En el caso de la construcción del banco el resultado es la pérdida de la asociación entre los antecedentes codificadores y los de síntesis. Por consiguiente, en los códigos positivos a la selección se pueden deseleccionar y los códigos negativos se pueden seleccionar. Para los bancos más complejos este inconveniente llega a ser más significativo ya que la complejidad de los oligonucleótidos monocatenarios

rios también aumenta, tanto con respecto a las cifras, longitud como a las secuencias. Esto hace que los procesos sean más difíciles de controlar.

Como se describió anteriormente en las tecnologías de presentación *in vitro* que permiten la presentación de una variedad de clases de compuesto, se han desarrollado selecciones, ampliaciones y diversificaciones. Sin embargo, existe todavía una necesidad actual de mejora, especialmente con respecto a la calidad en la construcción del banco y de diversificación. La presente invención ofrece un procedimiento para producir una molécula codificada en la que el procedimiento no requiere la síntesis previa de un gran número de plantillas. Además, el presente procedimiento no depende del reconocimiento codón/anticodón para que se forme una molécula codificada.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una tecnología de presentación *in vitro* que aprovecha la flexibilidad de la química orgánica, y que permite rondas de selección, ampliación y diversificación.

En particular, la presente invención se refiere a una composición que comprende un ácido nucleico y un compuesto químico, formando dicha composición una estructura en estrella que define 3 o más tallos que se extienden a partir de un centro de reacción, en el que por lo menos un tallo se extiende radialmente desde el centro, cada tallo comprende un dúplex de ácido nucleico, y el compuesto químico está situado en el centro de la reacción, estando asociado el compuesto químico a por lo menos un ácido nucleico.

El ácido nucleico forma una superestructura, en la que los segmentos diferentes se hibridan entre sí con el fin de formar una estructura que se parece a una estrella. La estructura en estrella comprende un centro de reacción y varios tallos. En el centro de la reacción, el compuesto químico se ha preparado como producto de reacción de 3 o más grupos químicos. Los tallos son unos dúplex de ácidos nucleicos, es decir, un tallo comprende dos segmentos de hibridación que se complementan entre sí suficientemente para que se forme un dúplex en condiciones que favorecen la reacción de los grupos químicos para formar un compuesto químico.

Por lo menos uno de los tallos se extiende radialmente a partir del centro. De manera adecuada, los 3 o más tallos se extienden radialmente hacia fuera desde el centro de la reacción. El dúplex de ácido nucleico de los tallos se cree que lleva los grupos químicos unidos a fin de obtener una proximidad a la reacción. La proximidad establecida entre los grupos químicos aumenta la concentración local y mejora las probabilidades de que proceda una reacción. La presencia de 3 o más tallos en la estructura en estrella crea una superestructura fuerte, que es estable aún en condiciones en las que se separará un solo dúplex en dos ácidos nucleicos monocatenarios discretos. De este modo, la estructura en estrella permite que se utilicen condiciones de reacción versátiles con objeto de activar la reacción entre los grupos químicos. Los experimentos descritos en la presente memoria demuestran que la estructura en estrella de tres tallos es lo bastante estable para dirigir la sustitución orgánica en los medios que contienen exceso del 35% de acetonitrilo y tetrahidrofurano y en exceso de 40% de DMF. En determinadas formas de realización de la invención, la estructura en estrella comprende 4, 5, 6, 7 o más tallos conectados al centro de reacción mutuo. Cuando el número de tallos aumenta la estabilidad de la estructura en estrella también aumenta.

El ácido nucleico se segmenta en varias partes con determinadas funciones. En determinado aspecto de la invención, el ácido nucleico comprende uno o más codones que identifican uno o más grupos químicos, que han participado en la formación del compuesto químico formado. La presencia de un segmento de codón lo hace posible no solamente la utilización del ácido nucleico para favorecer la proximidad de reacción sino también utilizar el ácido nucleico para codificar uno o más grupos químicos que han participado en la formación del compuesto químico. La presencia de uno o más codones es especialmente útil con fines de descodificación. Cuando el compuesto químico formado está presente en una cantidad pequeña o está presente en una mezcla con otros compuestos, puede realizarse una identificación fácil mediante técnicas biológicas moleculares.

Un codón que identifica un grupo químico puede estar presente en cualquier parte en el ácido nucleico que forma la estructura en estrella, es decir, el codón puede estar presente en el centro de la reacción o en la proximidad del mismo, en los segmentos de hibridación o en otras partes de la estructura en estrella. En un determinado aspecto de la invención un codón está situado en el extremo de un tallo. Un codón situado en el extremo del tallo que apunta lejos del centro permite más libertad en el diseño de la estructura en estrella del ácido nucleico ya que el codón en el extremo no necesita necesariamente tomar parte en la formación de un dúplex o en la formación del entorno para el centro de la reacción.

Los tallos pueden tener los extremos truncados, los extremos pegajosos o puede estar presente un lazo. Un tallo con extremos truncados o con extremos pegajosos puede preferirse cuando se pretende ligar el tallo a otro ácido nucleico. En una determinada forma de realización, se forma un lazo en el extremo del tallo. El lazo forma un enlace físico entre las dos cadenas formando de este modo un enlace covalente entre varias partes de la superestructura del ácido nucleico. En una determinada forma de realización los lazos están presentes en todos los extremos de los tallos con el fin de formar un ácido nucleico circular. En otra forma de realización, está presente un lazo en todos los extremos de los tallos excepto uno, a fin de formar una secuencia contigua de ácido nucleico. De manera adecuada, la secuencia contigua comprende un sitio de cebado para extender enzimáticamente el ácido nucleico utilizando una polimerasa u otra enzima activa con ácido nucleico. En los casos apropiados el punto de cebado está presente en el tallo que no tiene un lazo. De manera adecuada, el ácido nucleico comprende un sitio de cebado para una ADN polimerasa, ARN

polimerasa o transcriptasa inversa. De este modo, el lazo hace posible preparar un producto de ampliación bicatenario que presenta el compuesto químico formado.

Significativamente, el producto de la ampliación comprende un dúplex generalmente lineal, es decir complementaria que se ha formado por reacción de ampliación. La reacción de ampliación destruye el centro de reacción de modo que el compuesto formado anteriormente por reacción en el centro de reacción se presenta en el medio. La presentación del compuesto químico permite la utilización de varias estrategias de selección en un banco de productos de ampliación, como se expone más adelante en esta descripción.

Después de la selección, la posibilidad de ampliar el ácido nucleico es de particular relevancia con fines de identificación, porque el compuesto químico puede identificarse incluso en casos en los que se produce solamente en concentraciones diminutas. La secuencia de ácido nucleico contiguo comprende de manera adecuada codones de todos los reactivos, que han participado en la formación del compuesto químico codificado.

En una forma de realización particularmente preferida de la invención se sitúa un codón en la parte del emparejamiento sin base de la estructura tallo-lazo. La presencia en el lazo del codón permite la utilización de cualquier combinación de nucleótidos en el diseño, ya que la secuencia específica de un codón no tiene influencia material sobre la hibridación y capacidades de reacción.

En algunos aspectos de la invención un sitio de restricción enzimática está presente en la estructura tallo-lazo. Dependiendo de la endonucleasa específica utilizada, pueden romperse una o ambas cadenas de la estructura tallo-lazo. En una determinada forma de realización solamente una de las cadenas próxima al lazo se corta, formando de este modo un segmento de ácido nucleico monocatenario. El segmento de ácido nucleico monocatenario contiene de manera adecuada el codón. Una enzima útil para este fin es N. Bbv IA. En otra forma de realización ambas cadenas se rompen y se forma un extremo pegajoso, es decir, una prolongación de ácido nucleico monocatenario. De manera adecuada, el codón está presente en la prolongación monocatenaria. En un aspecto de la invención es preferible añadir un oligonucleótido cooperador complementario a por lo menos una parte de la secuencia de ácido nucleico del lazo. En condiciones adecuadas, el oligonucleótido cooperador se hibrida con la secuencia del lazo y forma un sustrato para una enzima de restricción.

Los tallos de la estructura en estrella pueden tener cualquier longitud adecuada. Generalmente, un tallo comprende dos segmentos de hibridación que tienen por lo menos el 80% de complementariedad y cada segmento de hibridación consta de 12 o más nucleótidos. La complementariedad es generalmente del 90% o superior, tal como 95% o superior. Los segmentos de hibridación pueden contener menos de 12 nucleótidos para determinadas aplicaciones en las que la estabilidad de la estructura en estrella puede suministrarse con, tal como 11, 10, 9, 8, 7 ó 6 nucleótidos. Sin embargo, en general se desea una estabilidad elevada. Una estabilidad adecuada en la mayoría de las condiciones se obtiene generalmente cuando cada segmento de hibridación comprende 18 o más nucleótidos. Cuando se utilizan condiciones que desfavorecen la hibridación, es decir temperaturas muy por encima del ambiente, las concentraciones altas de sal o la presencia de disolventes orgánicos, segmentos de hibridación de 20 o más nucleótidos se utilizan habitualmente.

Después de la reacción de los grupos químicos individuales, el compuesto químico formado está preferentemente unido por enlace covalente al ácido nucleico. En determinadas aplicaciones puede desearse utilizar la hibridación para unir el compuesto químico formado al ácido nucleico de la estructura en estrella; sin embargo un enlace covalente asegura que el compuesto químico y la parte de ácido nucleico permanezcan unidos durante una selección posterior.

Un grupo químico que va a reaccionar en el centro de reacción puede asociarse con el ácido nucleico de cualquier manera apropiada. Como ejemplo, los grupos químicos antes de la reacción están unidos por enlace covalente al ácido nucleico. Habitualmente, uno o más de los enlaces covalentes se escinden simultáneamente a la reacción o después de la misma. El enlace covalente puede diseñarse para que sea escindible o durable. Además puede diseñarse un enlace escindible para que se escinda inmediatamente en el momento de la reacción o diseñarse para que se escinda en una etapa posterior a la reacción.

Habitualmente, el compuesto químico se forma por reacción de los grupos químicos acoplados al ácido nucleico y opcionalmente uno o más reactivos adicionales. Los reactivos pueden originarse a partir de cualquier fuente, incluyendo que sea un compuesto añadido al medio como un reactivo libre no asociado al ácido nucleico. El/los reactivo(s) adicional(es) pueden ser estructuras, agentes de reticulación, agentes activadores, agentes desprotectores, etc.

Las estructuras en estrella según la presente invención son útiles en la generación de bancos de diferentes compuestos químicos asociados a un código genético. Por consiguiente la presente invención se refiere también a un banco de estructuras en estrella. Cada una de las estructuras en estrella puede estar presente en varias copias en el medio y el medio comprende generalmente estructuras en estrella que contienen diferentes compuestos químicos. Como ejemplo, un banco de la presente invención puede comprender por lo menos 1.000 compuestos químicos diferentes, preferentemente 10^6 compuestos químicos diferentes y más preferido 10^9 compuestos químicos diferentes.

En otro aspecto, la presente invención puede describirse en relación con p. ej. un procedimiento para sintetizar grandes bancos asociados a ácidos nucleicos codificadores mediante una "estructura en estrella" formada por oligonucleótidos mutuamente complementarios. Esto se obtiene hibridando oligonucleótidos que contienen dos segmentos, donde un segmento hacia el extremo 3' de un oligonucleótido hibrida a un segmento hacia el 5' en el siguiente y así

sucesivamente. Por último, el segmento hacia el extremo 3' del último se hibrida con un segmento hacia el extremo 5' del primer oligonucleótido. Por consiguiente, la sección media entre los dos segmentos de hibridación en cada oligonucleótido está señalando apuntando hacia el centro del anillo formado, mientras que los terminales están apuntando hacia fuera, proporcionando la estructura en estrella. Por ese motivo, cuando tres tipos de oligonucleótido se utilizan se forman tres tallos, cuando se utilizan cuatro tipos de oligonucleótidos se forman cuatro tallos, etc. Un grupo químico reactivo está asociado a la sección media en cada oligonucleótido, permitiendo de este modo que se produzcan reacciones químicas guiadas por proximidad en el centro. Además, un codón está convenientemente situado externo al segmento hibridado en cada oligonucleótido, permitiendo de este modo la codificación de los grupos químicos que participan en la creación del producto de reacción. Los oligonucleótidos con grupos químicos asociados se denominan módulos transportadores en la presente memoria. Por consiguiente un módulo transportador tiene un grupo químico, dos segmentos específicos de posición y un codón. La formación de bancos combinatorios codificados se permite cuando se utilizan los repertorios de los módulos transportadores para cada posición. Según una determinada forma de realización, los oligonucleótidos ensamblados se hacen extensibles o ampliables cuando los terminales en cada tallo, excepto uno, están ligados mediante formaciones en lazo para formar un oligonucleótido continuo con terminales 5' y 3'. De este modo, estando constituida por un tallo y un número de tallo-lazos, la estructura en estrella puede ampliarse por PCR o extenderse con una enzima adecuada.

Por consiguiente, el banco de presentación combinatorio puede someterse a la selección y los miembros del banco enriquecidos identificarse mediante su oligonucleótido codificador.

Por consiguiente, un aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para crear una o más estructuras químicas que comprenden las etapas siguientes:

(i) proporcionar N ($N = 3-100$) módulos transportadores que comprenden:

(1) un módulo transportador de la primera posición que presenta

i) un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar a un segmento de ácido nucleico del módulo transportador de la posición N, y

ii) un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar a un segmento de un segundo módulo transportador de la segunda posición,

(2) módulo(s) transportador(es) de la posición n ($n = 2$ a $N-1$) con un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar dicho segmento de ácidos nucleicos de $n-1$ módulos transportadores y un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar a un segmento del $n+1$ módulo transportador, y

(3) un módulo transportador de la posición N con un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar dicho segmento de ácido nucleico de dicho módulo transportador de $N-1$, y un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar a un segmento de dicho primer módulo transportador,

en el que

por lo menos tres de dichos módulos transportadores comprenden un grupo químico asociado (CG) situado en la sección media entre los segmentos de hibridación o en la proximidad de los mismos y opcionalmente un segmento de codón situado externo a uno de los segmentos de hibridación;

(ii) poner en contacto dichos módulos transportadores en condiciones que permitan la hibridación de dichos segmentos de hibridación, poniendo de este modo dichos grupos químicos en proximidad, donde el compuesto químico formado está asociado con por lo menos uno de dichos módulos transportadores.

N indica el número total de módulos transportadores utilizados en la formación de la estructura. De este modo, cuando se utilizan tres módulos transportadores en la formación de la estructura química, N es 3, cuando se utilizan cuatro módulos transportadores en la formación de la estructura química, entonces N es 4, etc. n indica la posición especificada del módulo transportador.

De este modo, cuando N es 3, un módulo transportador de la primera posición (1) con un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar a un segmento de ácidos nucleicos del módulo transportador de la tercera posición, y un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar a un segmento de un módulo transportador de la segunda posición; (2) se utiliza el módulo transportador de la segunda posición ($n=2$) con un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar a dicho segmento de ácidos nucleicos del primer módulo transportador, y un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar a un segmento del tercer módulo transportador; y (3) un módulo transportador de la tercera posición se utiliza con un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar a dicho segmento de ácidos nucleicos de dicho segundo módulo transportador, y un segmento de ácido nucleico capaz de hibridarse con un segmento de dicho primer módulo transportador.

Cuando N es 4, se utiliza un transportador de la primera posición (1) con un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar un segmento de ácidos nucleicos del módulo transportador de la cuarta posición, y un segmento de ácido

nucleico capaz de hibridarse con un segmento de un módulo transportador de la segunda posición; (2) se utiliza el módulo transportador de la segunda posición ($n=2$) con un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar dicho segmento de ácidos nucleicos del primer módulo transportador, y un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar un segmento del tercer módulo transportador; y se utiliza un módulo transportador de la tercera posición ($n=3$) con un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar dicho segmento de ácido nucleico del segundo módulo transportador y un segmento de ácido nucleico capaz de hibridarse con un segmento del cuarto módulo transportador y (3) un módulo transportador de la cuarta posición se utiliza con un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar dicho segmento de ácidos nucleicos de dicho tercer módulo transportador y un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar un segmento de dicho primer módulo transportador.

Cuando N es 5, se utiliza un módulo transportador de la primera posición (1) con un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar un segmento de ácidos nucleicos del módulo transportador de la quinta posición, y un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar un segmento de un módulo transportador de la segunda posición; (2) se utiliza un módulo transportador de la segunda posición ($n=2$) con un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar a dicho segmento de ácidos nucleicos del primer módulo transportador, y un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar un segmento del tercer módulo transportador; y se utiliza un módulo transportador de la tercera posición ($n=3$) con un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar a dicho segmento de ácidos nucleicos del segundo módulo transportador y un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar a un segmento del cuarto módulo transportador y se utiliza un módulo transportador de la cuarta posición ($n=4$) con un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar a dicho segmento de ácidos nucleicos del tercer módulo transportador y un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar un segmento del quinto módulo transportador; y (3) se utiliza un módulo transportador de la quinta posición con un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar a dicho segmento de ácidos nucleicos de dicho cuarto módulo transportador, y un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar un segmento de dicho primer módulo transportador.

El procedimiento anterior puede ser seguido de la etapa que proporciona las condiciones que permiten la ligadura de los terminales del módulo $n-1$ al módulo N y del módulo $N-1$ al módulo N , formando de este modo una molécula continua de ácido nucleico, con estructuras tallo-lazo y un compuesto químico asociado. De este modo, cuando N es 3, se permite que un terminal del primer módulo se ligue a un terminal del segundo módulo y un terminal del segundo módulo se permite que se ligue al tercer módulo. Cuando N es 4, ($n=2$) se permite que un terminal del primer módulo se ligue a un terminal del segundo módulo, ($n=3$) un terminal del segundo módulo se permite que se ligue al tercer módulo y un terminal del tercer módulo se permite que se ligue al cuarto módulo. Cuando N es 5, ($n=2$) se permite que un terminal del primer módulo se ligue a un terminal del segundo módulo, ($n=3$) un terminal del segundo módulo se permite que se ligue al tercer módulo, ($n=4$) un terminal del tercer módulo se permite que se ligue al cuarto módulo y un terminal del cuarto módulo se permite que se ligue al quinto módulo.

Según un aspecto adicional de la presente invención, los módulos transportadores de la posición N pueden estar ligados al primer módulo transportador, a fin de formar un ácido nucleico circular.

Una composición que comprende una estructura de ácido nucleico y los compuestos químicos asociados preparados según el procedimiento indicado anteriormente es nueva ya que los módulos transportadores crean una nueva "estructura en estrella" que es diferente de las estructuras creadas en la técnica anterior. Véase por ejemplo la técnica anterior expuesta en el apartado Antecedentes anterior.

En un aspecto preferido de la invención se proporciona un procedimiento, que asegura una gran proximidad entre los grupos químicos de la reacción y la ampliación del código genético completo de los antecedentes de la síntesis del compuesto químico formado. De este modo, en un aspecto preferido, el presente procedimiento comprende poner en contacto los módulos transportadores en condiciones que permitan la hibridación de segmentos de hibridación, poniendo de este modo grupos reactivos en la proximidad del reactivo; y

proporcionando condiciones que permitan la reacción de grupos reactivos, donde el compuesto químico formado está asociado por lo menos a un módulo transportador; y condiciones que permitan la ligadura de los terminales del módulo $n-1$ al módulo n y del módulo $N-1$ al módulo N y formando de este modo la molécula continua de ácido nucleico con estructuras tallo-lazo y un compuesto químico asociado.

Según una forma de realización preferida, N es 3, 4, 5, 6 ó 7. Se prefiere asimismo que cada uno de los módulos transportadores comprenda un grupo químico asociado (CG) situado en la sección media entre los segmentos de hibridación o en la proximidad de los mismos y un segmento de codón externo situado en uno de los segmentos de hibridación.

El hecho de poner en contacto los módulos transportadores puede realizarse sucesivamente, es decir, los módulos transportadores pueden ponerse en contacto en cualquier orden entre los módulos transportadores individuales o la puesta en contacto puede realizarse simultáneamente, es decir todos los módulos transportadores, o por lo menos una cantidad sustancial de los módulos transportadores, se mezclan conjuntamente en las condiciones de hibridación con el fin de formar un complejo supermolecular. Cuando se realiza la reacción sucesiva de los grupos químicos y solamente se utiliza una fracción de la cantidad total de los módulos transportadores requeridos para ensamblar la estructura en estrella completa, puede utilizarse un oligonucleótido auxiliar para ensamblar una estructura en estrella, con lo que se forma el centro de la reacción. De este modo, cuando una etapa en la formación del compuesto químico implica el montaje de dos módulos transportadores por hibridación de los segmentos de hibridación respectivos, un

oligonucleótido auxiliar con segmentos complementarios inversos a los segmentos de hibridación no hibridados puede añadirse para formar la estructura en estrella.

Una vez los grupos químicos unidos a los módulos transportadores se han puesto en íntima proximidad en el centro de la reacción, se efectúa la reacción. Los grupos químicos pueden diseñarse de modo que se produzca una reacción inmediatamente cuando los grupos se ponen en la distancia de reacción entre sí o los grupos pueden diseñarse de modo que un componente externo es necesario para que se produzca la reacción. El componente externo puede ser un reactivo, un fotón, electromagnetismo o cualquier otro estímulo, que efectúe la reacción. En un determinado aspecto de la presente invención se utiliza la química ortogonal, es decir se diseñan grupos químicos de modo que el orden de la reacción está dirigido.

El centro de la reacción está definido por los tallos que rodean dicho centro. Se ha sugerido, que la distancia entre dos reactivos en el centro de la reacción es inferior a 10 nm. Suponiendo que el centro de la reacción sea esférico; la concentración de los reactivos puede calcularse en 1 mM. En un contexto biológico una concentración de esta magnitud es considerada como elevada y puede suponerse que una reacción proceda en un tiempo razonable. Además, la concentración de reactivo libre en el medio es muy baja, cuando los módulos transportadores han sido dosificados en cantidades molares ajustadas, de modo que la reacción en el centro de reacción está favorecida en gran medida sobre la reacción no dirigida.

La sección media del módulo transportador puede contener algunos grupos químicos adecuados. Para permitir la ampliación enzimática mediante p. ej. una polimerasa, la sección media del módulo transportador comprende convenientemente un enlace químico o 1 a 20 nucleótidos. Los nucleótidos pueden modificarse para obtener determinadas condiciones de reacción en el centro de reacción. Como ejemplo, los nucleótidos de la sección media pueden modificarse con grupos lipófilos para proporcionar una gran movilidad y reactividad de los grupos químicos asociados. El grupo químico puede estar asociado con la molécula transportadora en varias posiciones. En un aspecto, el grupo químico está asociado con una nucleobase de la sección media. En otro aspecto, el grupo químico está asociado con un enlace fosfodiéster de la sección media.

Cuando el grupo químico está unido al eje central el punto de acoplamiento está generalmente en el fósforo del enlace internucleósido. Cuando se utiliza la nucleobase para el acoplamiento del grupo químico, el punto de acoplamiento está habitualmente en la 7ª posición de las purinas o 7-deaza-purinas o en la 5ª posición de las pirimidinas. El nucleótido puede estar distanciado del grupo reactivo del grupo químico por un resto espaciador. El espaciador puede diseñarse de modo que el espacio de la configuración muestreada por el grupo reactivo está optimizado para una reacción con el grupo reactivo de otro grupo químico en el centro de reacción. En general, el grupo químico está asociado a la sección media mediante uno o más enlaces covalentes.

La ligadura puede efectuarse antes, simultáneamente o después de la reacción y la ligadura puede realizarse por vía enzimática o química y la selección del experimentador. Para reducir la cantidad de módulos no hibridadores libres en el medio, se desea generalmente ligar los módulos transportadores antes de la reacción.

El compuesto químico formado puede estar asociado al ácido nucleico mediante una variedad de interacciones químicas. Según un aspecto preferido el compuesto químico formado está asociado por enlace covalente a por lo menos una de dichas moléculas transportadoras o la molécula de ácido nucleico continua. La asociación relativamente fuerte entre el compuesto químico formado y el ácido nucleico, tal como un enlace covalente, es útil durante el cribado de un banco dado que puede desearse utilizar condiciones severas, que pueden alterar los enlaces más débiles, tal como los enlaces de hidrógeno.

En un aspecto preferido de la invención se proporcionan uno o más módulos transportadores con un sitio de cebado para la ADN polimerasa, la ARN polimerasa o la transcriptasa inversa. La presencia de un sitio de cebado ayuda a la ampliación del código genético del grupo químico, que ha reaccionado en la formación del compuesto químico. Cuando está ausente la ligadura, es decir el código genético para cada uno de los grupos químicos permanece las entidades independientes se mantienen juntas por hibridación, se prefiere que cada módulo transportador contenga un sitio de cebado. Una vez se ha realizado la selección de un banco, es posible obtener información en relación con los grupos químicos que han participado en la formación de compuestos químicos logrados, es decir compuestos químicos con una propiedad deseada. Una manera de obtener esta información consiste en cuantificar el producto de la ampliación, mediante procedimientos bien conocidos tales como QPCR o PCR convencional combinada con un chip. Puede utilizarse la información en la formación de un banco de segunda generación con una diversidad reducida, ya que solamente es necesario incluir módulos transportadores en el banco, que estén logrados. Un banco con diversidad reducida es también un banco localizado porque la abundancia de compuestos químicos con una propiedad deseada es mayor.

Cuando dos o más módulos transportadores están ligados, es posible obtener información de los reactivos, que han participado conjuntamente en la formación de compuestos químicos con una propiedad deseada. Preferentemente todas las moléculas transportadoras están ligadas con el fin de formar un ácido nucleico lineal o un ácido nucleico circular. De este modo, cuando dos o más módulos transportadores están ligados, es necesario un sitio de cebado único para ampliar el ácido nucleico contiguo que comprende los dos codones. Según una forma de realización preferida, el procedimiento de la invención comprende un sitio de cebado para una ADN polimerasa, una ARN polimerasa o un sitio de transcriptasa inverso y por lo menos el primer módulo transportador y/o por lo menos en el módulo transportador

N. Cuando todos los módulos transportadores están ligados, es decir el primer módulo transportador está ligado al módulo transportador n ($n=2$ a $N-1$), que está ligado al módulo transportador N, puede ampliarse un ácido nucleico cuando un sitio de cebado está situado en uno de los extremos. Para reducir el riesgo de que el compuesto químico formado permanezca oculto en el centro de reacción, se lleva a cabo preferentemente la ampliación antes del proceso de selección. La ampliación del nucleótido contiguo presenta efectivamente el compuesto químico formado al medio y cualquier diana, que puede estar presente en el mismo.

Preferentemente, un sitio de cebado para la hibridación de un cebador transcrito está situada en un extremo y un sitio de cebado para la hibridación de un cebador complementario está situada en el otro extremo, con el fin de que permita la ampliación según el protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La ampliación por PCR se realiza de forma adecuada después que se ha llevado a cabo la selección para generar más copias del material genético de las estructuras con las propiedades deseadas.

Por consiguiente, un segundo aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende una estructura de ácido nucleico y un compuesto químico asociado o un banco de más de una de dichas estructuras que puede obtenerse por el procedimiento indicado anteriormente, formando dicha composición una estructura en estrella definida por 3 o más tallos que se extienden desde un centro de reacción, en el que por lo menos un tallo se extiende radialmente desde el centro, cada tallo comprende un dúplex de ácido nucleico bicatenario, y el compuesto químico está situado en el centro de la reacción, estando asociado el compuesto químico con por lo menos un ácido nucleico.

Puede formarse un banco de compuestos químicos asociado al ácido nucleico que codifica los grupos químicos, que han participado en la formación del compuesto químico, utilizando un repertorio de módulos transportadores en una o más posiciones.

El banco tal como se describe en la presente memoria puede utilizarse para identificar un compuesto de interés. Se desea generalmente tener un banco tan grande como sea posible para aumentar la posibilidad de encontrar un compuesto con las propiedades deseadas. En un determinado aspecto de la invención la propiedad del compuesto de interés es la capacidad para unirse a una diana. Generalmente, se supone que la posibilidad de encontrar un compuesto con gran afinidad y especificidad hacia una diana aumenta al aumentar el tamaño del banco. De este modo, un banco según la presente invención de manera adecuada comprende más de 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} ó 10^{14} compuestos químicos diferentes asociados a un ácido nucleico que codifica los antecedentes de la síntesis.

Para obtener un banco puede utilizarse un repertorio de módulos transportadores en un número de posiciones. En un aspecto de la invención, el repertorio en por lo menos una posición comprende por lo menos 10 módulos transportadores diferentes. En un determinado aspecto, el repertorio en por lo menos dos posiciones comprende por lo menos 10 módulos transportadores diferentes. Para obtener un banco de un millón de compuestos químicos diferentes en el mismo recipiente, las estructuras múltiples de la invención pueden formarse con 100 módulos transportadores en 3 posiciones diferentes. En otras palabras, la síntesis de sólo 300 módulos transportadores permite la formación de un banco de un millón de compuestos. Asimismo, puede formarse un banco de 100 millones de compuestos con 100 módulos transportadores en 4 posiciones diferentes.

La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento para realizar la sustitución del módulo. El procedimiento comprende las etapas siguientes:

- a) proporcionar una secuencia de ácido nucleico contigua monocatenaria que comprende N segmentos de hibridación y segmentos de hibridación complementarios así como N-1 segmentos no hibridadores entre los segmentos de hibridación y los segmentos de hibridación complementarios,
- b) hibridar el ácido nucleico en condiciones que favorezcan la hibridación intramolecular, formando de este modo un ácido nucleico continuo, que contiene por lo menos N-1 tallo-lazos y un tallo;
- c) introducir una rotura en dicho tallo o lazo creando de este modo una prolongación que contiene por lo menos un segmento de codón;
- d) proporcionar un primer grupo de módulos transportadores que tiene por lo menos:
 - un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar a dicho tallo, un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar al tallo de un tallo-lazo adyacente, opcionalmente un grupo reactivo asociado y un segmento anticodón;
- d) proporcionar condiciones que permitan la hibridación de los segmentos de codón y anticodón; y
- e) proporcionar las condiciones que permitan la ligadura enzimática o química de dicho módulo transportador hibridado al terminal recesivo de dicha prolongación; y llevar a cabo las etapas siguientes:
 - i) digerir con una enzima de restricción el tallo o lazo del tallo-lazo adyacente a dicha secuencia del codón haciendo de este modo prolongaciones que contienen por lo menos un segmento de codón próximo; y

- ii) desnaturalizar los ácidos nucleicos; y
- iii) hibridar en condiciones que favorecen la hibridación intramolecular formando de este modo N-1 tallo-lazos y un tallo con prolongación por lo menos que contiene dicho segmento de codón próximo; y
- iv) proporcionar opcionalmente las condiciones que permitan la reacción de dichos grupos reactivos, donde el compuesto químico formado está asociado con por lo menos uno de dicho módulo transportador; y
- v) proporcionar un grupo siguiente de módulos transportadores que tienen por lo menos:
 - un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar dicho tallo, y un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar al tallo del tallo-lazo adyacente, y opcionalmente con un grupo reactivo asociado, y con un segmento anticodón; y
- vi) proporcionar condiciones que permitan la ligadura enzimática o química del módulo transportador hibridado a los terminales recesivos de dicha prolongación; y repetir las etapas i) a la vi) N-1 veces; y
- f) introducir una rotura en dicha estructura tallo-lazo que constituye parte de dicho primer grupo de módulos transportadores que tienen por lo menos dicho segmento anti-codón conectado a dicho primer módulo transportador; y
- g) desnaturalizar los ácidos nucleicos; e
- h) hibridar en condiciones que favorezcan la hibridación molecular formando de este modo N-1 tallo-lazos y un tallo; y
- i) opcionalmente, proporcionar las condiciones que permitan la reacción de dichos grupos reactivos, donde los compuestos químicos formados están asociados a por lo menos dicho módulo transportador.

La secuencia de ácidos nucleicos contigua utilizada en la etapa a) puede proporcionarse a partir de numerosas fuentes. Según un primer aspecto, el ácido nucleico es proporcionado por el procedimiento anterior, utilizando sin embargo módulos transportadores de ensayo que no llevan grupos químicos. Cuando estos ácidos nucleicos que representan los módulos transportadores se ligan, se forma un ácido nucleico lineal o circular. Según un segundo aspecto, la secuencia de ácido nucleico contigua de la etapa a) puede obtenerse llevando a cabo una reacción de ampliación enzimática que presenta el compuesto químico formado. De este modo, después de la formación de la estructura en estrella, el único producto con ampliación de cadena o una cadena que complementa el producto de ampliación puede utilizarse en la etapa a). Si se desea, el producto de la ampliación puede someterse a ampliación de polinucleótidos, tal como PCR, para ampliar el número de copias del ácido nucleico.

En un determinado aspecto, la secuencia de ácido nucleico contigua en la etapa a), b) o c) se obtiene inmovilizando la cadena transcrita del producto de PCR sobre un soporte sólido, aislando el soporte sólido, permitiendo a la cadena transcrita autohibridarse con el fin de formar la estructura en estrella, y, opcionalmente, rompiendo el tallo que une la estructura en estrella autohibridada con el soporte sólido, liberando de este modo la estructura en estrella del soporte sólido.

Un procedimiento adecuado de inmovilización de la cadena transcrita consiste en acoplar biotina al cebador que produce la cadena transcrita. La cadena transcrita puede acoplarse a continuación a soporte sólidos, tal como perlas, cubiertas con estreptavidina. Dependiendo de la propiedad del soporte sólido puede aislarse del resto del medio de numerosas maneras. Actualmente, se prefiere utilizar perlas magnéticas, que pueden aislarse fácilmente mediante con un imán. Una vez el soporte sólido se ha lavado numerosas veces, la cadena transcrita se deja que se autohibride para formar una nueva estructura en estrella. En un aspecto preferido, el replegamiento se lleva a cabo mediante enfriamiento instantáneo. La estructura en estrella puede mantenerse en el soporte sólido en todo el proceso de sustitución del módulo o la estructura en estrella puede separarse del soporte sólido. De manera apropiada una escisión del tallo que acopla el soporte sólido y la estructura en estrella replegada se lleva a cabo con una enzima de restricción. La capacidad de la enzima de restricción para realizar la escisión es realmente una prueba que confirma el plegamiento intramolecular.

En determinados aspectos de la invención puede ser conveniente escindir la estructura en estrella en el lazo. Ya que la mayoría de las enzimas de restricción reconocen ácidos nucleicos bicatenarios solamente como sustratos no es inmediatamente posible escindir en el lazo utilizando una enzima de restricción. Por consiguiente, la presente invención comprende una etapa más de añadir un oligonucleótido colaborador complementario a una secuencia de un lazo, antes de una etapa de digestión, para crear un sustrato bicatenario para la enzima de restricción en el lazo.

ES 2 320 361 T3

La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento para identificar un banco de más de un compuesto químico que comprende:

sondar el banco para los miembros del banco que tienen un compuesto químico de la propiedad deseada;

dividir los miembros del banco que tienen la propiedad deseada de los miembros del banco que no tienen la propiedad deseada; y

obtener de este modo un grupo enriquecido de miembros del banco con la propiedad deseada.

La mezcla enriquecida de miembros del banco que tienen la propiedad deseada puede aislarse y caracterizarse si se desea. Sin embargo, una de las ventajas de este procedimiento es que no es necesario aislar la mezcla enriquecida. En una forma de realización preferida, la mezcla se somete a un procedimiento de ampliación del ácido nucleico para aumentar el material genético indicativo del historial de la síntesis de los compuestos químicos que tienen la propiedad deseada. La mezcla de ácido nucleico ampliado que representa el banco enriquecido de compuestos con una propiedad deseada puede descodificarse para identificar los reactivos, que han estado implicados en la síntesis del compuesto químico con la propiedad deseada. Sin embargo, si la mezcla enriquecida es mayor que lo que es viable facilita el decodificar la cantidad completa de ácido nucleico, la presente invención ofrece la posibilidad de volver a ensamblar los compuestos químicos codificados por los miembros del banco enriquecido o el ácido nucleico que representa dicho banco enriquecido utilizando el procedimiento anterior de realización de la sustitución del módulo.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la ampliación de una mezcla enriquecida de los miembros del banco con la propiedad deseada. El procedimiento incluye que los oligonucleótidos ampliados por PCR se dejan hibridar en condiciones que favorecen la hibridación intramolecular, por lo que la estructura en estrella, consistente en un tallo y un número de tallo-lazos se vuelven a crear. El tallo sin un lazo contiene preferentemente un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, que corta en el exterior su secuencia de restricción y genera una prolongación en el digesto. La redundancia de la secuencia en la prolongación creada puede utilizarse convenientemente para que contenga un codón. La digestión de la enzima de restricción del tallo genera entonces prolongaciones específicas del codón para esta primera posición. Las estructuras en estrella digeridas por la enzima de restricción se hibridan posteriormente con un repertorio de módulos transportadores que contienen los dos segmentos constantes para la primera posición y un par afín del grupo químico y el anticodón. Por consiguiente, las hibridaciones codón/anticodón permiten pares apropiados de módulos transportadores y estructuras en estrella que estén ligadas por una ADN ligasa. El tallo-lazo cercano contiene también un sitio de reconocimiento para otra enzima de restricción capaz de dejar una prolongación específica para el codón para esta segunda posición. La digestión con esta segunda enzima de restricción elimina de este modo el enlace covalente del módulo primero ampliado por PCR al resto de la estructura. Las estructuras en estrella se desnaturalizan y posteriormente se dejan hibridar en condiciones que favorecen la hibridación intramolecular. Las estructuras en estrella se vuelven a crear de este modo, pero ahora con un nuevo módulo transportador en la posición uno (con un grupo químico asociado) y el tallo, sin un lazo, no está situado en la posición dos. Pueden realizarse rondas de este procedimiento para sustituir todas las posiciones, para permitir por proximidad reacciones químicas guiadas de las combinaciones apropiadas de los grupos químicos. Por consiguiente, pueden realizarse rondas de selección y ampliaciones hasta que se ha conseguido el enriquecimiento deseado.

Pueden introducirse roturas en los tallos por numerosos procedimientos, tales como mediante enzimas de restricción, por ejemplo RNasa, endonucleasa III, endonucleasa VIII, APE1, Fpg o por escisión química o fotoescisión.

La secuencia de ácido nucleico contiguo utilizada en la etapa a) del procedimiento de sustitución del módulo descrita anteriormente puede proporcionarse por "apareamiento". En una determinada forma de realización, un procedimiento de apareamiento incluye las etapas siguientes:

digerir las estructuras de ácido nucleico intramolecular hibridadas procedentes de un banco enriquecido con dos enzimas de restricción consecutivas, que eliminan los enlaces covalente entre el módulo en cuestión y la estructura restante,

desnaturalizar las estructuras digeridas,

permitir la rehibridación de los fragmentos de ácido nucleico de las estructuras digeridas, permitiendo de este modo el intercambio de una fracción de ácido nucleico especificando el módulo en cuestión para obtener apareamiento, y

ligar los terminales apropiados.

Según este procedimiento, los módulos transportadores o las partes de ácido nucleico que representan los módulos transportadores pueden mezclarse. El mezclado permite una diversificación de la mezcla de genes similar al apareamiento en un sistema biológico meiótico. El procedimiento puede modificarse cuando los fragmentos de ácido nucleico que representan módulos transportadores, no presentes en la formación del banco de primera generación se añaden antes de permitir la rehibridación. Alternativamente, el módulo transportador como tal puede añadirse antes de permitir la rehibridación. Cuando se añade nuevo material genético a la mezcla de genes, esto es similar a la muta-

ción en un sistema biológico. Las posibilidades de llevar a cabo las operaciones de emparejamiento y mutación entre las generaciones de bancos permiten una evolución sorprendentemente similar al proceso de evolución natural en la búsqueda de nuevos fármacos experimentales.

Por lo tanto, en una determinada forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la diversificación de un banco enriquecido, permitiendo de este modo la evolución molecular. En el procedimiento descrito anteriormente para la ampliación de un banco de presentación, una fracción del banco en cada ronda para la sustitución del módulo, se digiere con dos enzimas de restricción consecutivas, que eliminan los enlaces covalentes entre el módulo en cuestión y la estructura restante. Las estructuras en estrella se desnaturalizan y se hibridan con un repertorio de módulos transportadores para la posición en cuestión. Los segmentos constantes específicos para la posición son por lo tanto los que guían las hibridaciones, de manera equivalente a la creación del banco primario. Los terminales apropiados se ligan y el producto formado mezclado con la fracción del banco montada guiada por el codón, que conduce a una diversificación. Por consiguiente, las rondas de selección, ampliación y diversificación pueden realizarse, permitiendo de este modo la evolución molecular.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para mejora genética de un banco enriquecido, permitiendo de este modo la evolución molecular. En el procedimiento descrito anteriormente para la ampliación de un banco de presentación, una fracción del banco en cada ronda para la sustitución del módulo, se digiere con dos enzimas de restricción consecutivas, que eliminan los enlaces covalentes entre el módulo en cuestión y la estructura restante. Las estructuras en estrella se desnaturalizan y se hibridan. Los segmentos constantes específicos para la posición son de este modo los que guían las hibridaciones y permiten el intercambio del módulo en cuestión, es decir la mejora genética. Los terminales apropiados se ligan y el producto formado mezclado con la fracción del banco ensamblada guiada por el codón, que conduce a una diversificación.

Por consiguiente, pueden realizarse rondas de selección, ampliación y diversificación y mejora genética, permitiendo de este modo la evolución molecular.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para crear bancos de presentación combinatorios de polímeros o de moléculas pequeñas. Las reacciones químicas pueden realizarse simultánea o sucesivamente, mediante la utilización de p. ej. químicas ortogonales, grupos protectores/de enmascaramiento, mezclar sucesivamente los módulos transportadores o los módulos transportadores sin CRG.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para crear bancos de presentación combinatorios de actividad catalítica. A este respecto los módulos transportadores están asociados a grupos funcionales del sitio reactivo y la estructura en estrella proporciona un marco de trabajo para una disposición tridimensional de estos grupos funcionales.

Los aspectos y las formas de realización descritos anteriormente presentan claras ventajas sobre la técnica anterior. Por nombrar algunas, las diversas formas de realización posibles de la presente invención presentan una o más de las siguientes ventajas: 1) un único procedimiento para el montaje de un banco de presentación combinatorio, 2) una única estructura para la guía por proximidad de las reacciones químicas, 3) las reacciones químicas son muy independientes de las secuencias del codón porque éstas están separadas del sitio reactivo por segmentos constantes, 4) gran proximidad en la ampliación del banco de presentación ya que solamente los codones en una posición relevante son capaces de guiar moléculas transportadoras recientes ya que solamente éstos contienen un terminal para facilitar la ligadura, y 5) si accidentalmente ha ocurrido una guía incorrecta codón/anticodón, existirá todavía asociación entre la codificación y la presentación ya que los módulos transportadores recientes proporcionan tanto el CRG como el código.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1a da a conocer etapas en la formación de la estructura en estrella, en la que los grupos químicos han reaccionado simultáneamente.

La Fig. 1b da a conocer etapas en la formación de la estructura en estrella, en la que los grupos químicos han reaccionado sucesivamente.

La Fig. 1c da a conocer un procedimiento que utiliza síntesis convergente del compuesto químico.

La Fig. 1d presenta un procedimiento en 5 etapas para formar un banco en la que cada uno de los miembros presenta el compuesto químico formado de manera eficaz.

La Fig. 1e da a conocer un procedimiento en el que los lazos se añaden después de la reacción de los grupos químicos.

La Fig. 2a da a conocer un procedimiento para el automontaje del banco combinatorio por repertorios de oligonucleótidos biespecíficos.

La Fig. 3 presenta 5 etapas en una selección por afinidad.

ES 2 320 361 T3

La Fig. 4a da a conocer etapas en la formación de un banco.

La Fig. 4b da a conocer los principios de mejora genética y mutación de un banco enriquecido.

5 La Fig. 5 da a conocer etapas en el procedimiento que conducen a la formación de un banco enriquecido.

La Fig. 6 presenta el principio de evolución molecular.

La Fig. 7 presenta una forma de realización de la invención que implica un sustrato inmovilizado.

10

La Fig. 8 da a conocer los resultados experimentales del ejemplo 1.

La Fig. 9 representa los resultados de los experimentos descritos en el ejemplo 2.

15

La Fig. 10 presenta el resultado de los experimentos según el ejemplo 3.

La Fig. 11 da a conocer los resultados de los experimentos descritos en el ejemplo 4.

La Fig. 12 presenta los geles obtenidos en los experimentos descritos en el ejemplo 5.

20

La Fig. 13 representa un gel de PAGE natural del ejemplo 6.

La Fig. 14 presenta un gel de los experimentos descritos en el ejemplo 7.

25

La Fig. 15 da a conocer un gel de un experimento de replegamiento del ejemplo 8.

La Fig. 16 es un diagrama esquemático del diseño del ejemplo 9.

La Fig. 17 presenta el gel resultante de los experimentos descritos en el ejemplo 9.

30

La Fig. 18 da a conocer el gel resultante de los experimentos descritos en el ejemplo 9.

La Fig. 19 presenta varias construcciones del diseño de reacción descritas en el ejemplo 10.

35

La Fig. 20 presenta dos geles resultantes de los experimentos dados a conocer en el ejemplo 12.

La Fig. 21 da a conocer un gel de un experimento descrito en el ejemplo 13.

La Fig. 22 presenta un gel de un experimento descrito en el ejemplo 14.

40

La Fig. 23 presenta un gel de un experimento descrito en el ejemplo 15.

La Fig. 24 da a conocer un gel de un experimento descrito en el ejemplo 16.

45

La Fig. 25 presenta los resultados del experimento mostrado en el ejemplo 17.

La Fig. 26 da a conocer el resumen de la estrategia experimental utilizada en el ejemplo 18.

50

18. La Fig. 27 presenta un gel de PAGE artificial de las etapas individuales en el procedimiento utilizado en el ejemplo

La Fig. 28 presenta un gel de PAGE artificial del ensayo de fijación descrito en el ejemplo 18.

La Fig. 29 presenta un gel de ampliación por PCR descrito en el ejemplo 18.

55

La Fig. 30 presenta una fotografía de un gel que evidencia la aparición de una aminación reductora.

La Fig. 31 da a conocer una fotografía de un gel que evidencia la aparición del acoplamiento de urea.

60

La Fig. 32 presenta geles de un estudio sobre la electromovilidad de la estructura en estrella.

La Fig. 33 presenta una representación esquemática del proceso de traducción.

La Fig. 34 presenta los resultados de los experimentos descritos en el ejemplo 22.

65

La Fig. 35 presenta los resultados de los experimentos descritos en el ejemplo 22.

La Fig. 36 presenta los resultados de los experimentos descritos en el ejemplo 22.

Descripción detallada de la invención*Ácido nucleico*

5 La síntesis química codificada por ácido nucleico tal como se describe en la presente memoria permite la producción de bancos de presentación combinatorios y la ejecución de la selección, ampliación y evolución de una extensa variedad de compuestos químicos tales como pequeñas moléculas y polímeros artificiales. El ácido nucleico sirve para múltiples funciones, por ejemplo, pone en contacto a reactivos químicos, guía la disposición tridimensional de los reactivos químicos, almacena información con respecto a los antecedentes de la síntesis química, guía la compatibilidad apropiada de combinaciones seleccionadas de reactivos químicos y permite la diversificación y la mejora genética de compuestos químicos.

El procedimiento puede utilizarse para ensamblar una molécula, trillones de moléculas o incluso más de una vez.

15 El procedimiento permite el aislamiento de ligandos o fármacos con propiedades superiores a las aisladas mediante diseño racional tradicional y procedimientos combinatorios de descubrimiento de fármacos, ya que el espacio químico puede ser buscado sistemáticamente para los ligandos con las propiedades deseadas.

La síntesis química guiada por el ácido nucleico se ha demostrado que es un fenómeno de amplio intervalo, no solamente limitado a los compuestos de naturaleza de ácido nucleico, sino también aplicable a guiar un amplio intervalo de reacciones químicas bajo un amplio intervalo de condiciones (documentos WO 2004/016767 y WO 2002/074292A). Esto es de particular importancia, ya que la mayoría de las moléculas de interés no se parecen al ácido nucleico o a análogos de ácido nucleico. Los grupos químicos que participan en la formación del compuesto químico final pueden transferirse en una etapa a una entidad química receptora en una estructura o un grupo químico puede transferirse en dos etapas, en las que la primera etapa incluye una reticulación en entre el grupo químico y la entidad receptora y la segunda etapa incluye una escisión de grupo químico del módulo transportador para completar la transferencia. Un ejemplo del tipo de reacción anterior de una reacción es un módulo transportador que tiene acoplado un anillo de N-hidroxisuccinimida (NHS) sustituido de 5 elementos que sirve como activador, es decir un enlace lábil se forma entre el átomo de oxígeno conectado al anillo NHS y el grupo químico que ha de transferirse. Los grupos químicos pueden transferirse a un grupo nucleófilo receptor, por lo general un grupo amina, que puede estar presente en una estructura. El resto del fragmento se convierte en un grupo saliente de la reacción. Cuando el grupo químico está conectado al activador mediante un grupo carbonilo y el grupo receptor es una amina, el enlace formado en la estructura será un enlace amida.

Un ejemplo de una reacción en dos etapas es la denominada reacción de alilglicina. En una primera etapa un grupo químico que comprende un ácido carboxílico o un derivado del mismo se hace reaccionar con un grupo nucleófilo tal como una amina. El grupo químico está acoplado a un grupo alilglicina, que en una segunda etapa puede escindirse con yodo para liberar el grupo químico. El procedimiento de reacción en dos etapas se da a conocer con más detalle en el documento WO 2004/039825. Otro ejemplo de una estrategia de reacción en dos etapas se presenta con más detalle en el ejemplo 10.

De importancia fundamental para la síntesis guiada por ácido nucleico de los bancos de presentación combinatorios es la guía por proximidad de los reactivos, que asegura la eficacia de la reacción y la asociación apropiada de la codificación y presentación. La proximidad de los reactivos se obtiene asociando los reactivos, mediante alguna especie de enlazador. La proximidad puede también describirse como una concentración local, que depende de la longitud y flexibilidad del enlazador. Si se asume la flexibilidad libre del enlazador, la concentración local puede calcularse utilizando el volumen de una esfera con la longitud del enlazador como radio. La fórmula para calcular el volumen de una esfera es: $v = 4/3 \times \pi \times r^3$. Por consiguiente, la proximidad o la concentración local disminuye con la 3ª potencia en función de la longitud del enlazador. Por ejemplo una longitud del enlazador aproximadamente 10 nm, será equivalente a una concentración aproximadamente 1 milimolar, mientras que un enlazador de 100 nm será equivalente a una concentración aproximadamente 1 micromolar. Las químicas orgánicas eficaces se ejecutan por lo general en el intervalo de concentración milimolar a molar. Por consiguiente, para asegurar la eficacia en las reacciones químicas la longitud del enlazador no debería ser significativamente mayor de 10 nm.

Preferentemente, los grupos reactivos se llevan a la proximidad reactiva inferior a 100 nm, más preferentemente inferior a 50 nm, aún más preferentemente inferior a 25 nm, aún más preferentemente inferior a 10 nm y lo más preferentemente inferior a 5 nm.

En la técnica anterior para la síntesis en un solo recipiente de bancos de presentación codificados por ADN que permiten la ampliación, se utilizan plantillas de ADN monocatenario con codones dispersos a lo largo de la longitud de la plantilla (documentos WO 2004/016767 y WO 2002/074929A2). Las plantillas son responsables de la incorporación de unidades de transferencia con secuencias anticodón apropiadas procedentes de un repertorio de unidades de transferencia y de este modo de poner en contacto a los grupos químicos en la plantilla y la unidad de transferencia. Por consiguiente, la plantilla monocatenaria actúa también como enlazador entre el grupo químico en la plantilla y el grupo químico en la unidad de transferencia hibridada a la plantilla. Por consiguiente, la longitud del enlazador y de este modo la concentración local de reactivos dependerá de qué posición de codón se emplee. Un oligonucleótido no desplegado (extendido) que tiene por ejemplo 20 nucleósidos tendrá una longitud aproximadamente 10 nm (el espaciamiento del eje central de seis enlaces es aproximadamente 0,63 nm) y un oligonucleótido que tiene apro-

ximadamente 200 nucleósidos tendrá una longitud aproximadamente 100 nm. Por consiguiente, los oligonucleótidos desplegados considerablemente mayores de 20 nucleósidos (10 nm, equivalente a una concentración aproximadamente 1 milimolar) en general no serán adecuados para crear la guía de proximidad de las reacciones químicas.

5 En una forma de realización la presente invención elude la estructura alargada del ácido nucleico en uso al poner los reactivos en proximidad de la reacción. Esto se consigue seleccionando las secuencias apropiadas de oligonucleótidos capaces de plegarse en estructuras tridimensionales estables y por consiguiente permitir la guía por proximidad mediante las posiciones de la secuencia separadas por muchos nucleósidos. Como se muestra en la Fig. 1a esto se consigue utilizando oligonucleótidos biespecíficos (mutuamente complementarios), que pueden hibridarse en una “estructura en estrella”. Los oligonucleótidos biespecíficos contienen dos segmentos: un segmento hacia el extremo 3’ de un oligonucleótido se hibrida con un segmento hacia el 5’ en el siguiente y así sucesivamente. Por último, el segmento hacia el extremo 3’ del último se hibrida con un segmento hacia el extremo 5’ del primer oligonucleótido. Por consiguiente la sección media entre los segmentos en cada oligonucleótido está apuntando hacia el centro. Esta sección media puede ser un enlace o un segmento. En cambio, los terminales están apuntando hacia fuera, dando de este modo la estructura en estrella. Por eso, cuando se utilizan tres tipos de oligonucleótido se forman tres tallos, cuando se utilizan cuatro tipos de oligonucleótidos se forman cuatro tallos, etc. Un grupo reactivo químico (CRG), está convenientemente asociado a la proximidad de la media sección o en la proximidad de la misma en cada oligonucleótido. Los grupos reactivos químicos se ponen de este modo en proximidad de la reacción, ya que el diámetro de la doble hélice del ADN es aproximadamente 2 nm, permitiendo de este modo que las reacciones químicas guiadas por proximidad se produzcan en la proximidad del centro o en el centro.

La reacción química se realiza de modo que el producto formado está asociado a un oligonucleótido por lo menos. Además, un codón está convenientemente situado en la parte exterior de uno o ambos de los segmentos hibridados en cada oligonucleótido, permitiendo de este modo la codificación de los grupos químicos. Los oligonucleótidos con grupo químico asociado, dos segmentos de hibridación específica para la posición y un codón se denominan módulos transportadores.

Para preparar la combinación creada de oligonucleótidos ampliables p. ej. por PCR, los terminales en cada tallo, excepto uno, están ligados mediante formaciones en lazo para formar un oligonucleótido continuo con terminales 5’ y 3’. En un aspecto, la estructura consta de un tallo y un número de lazos en el tallo, que pueden ampliarse teniendo sitios de cebado para PCR en los terminales (figuras 1d y 1e). Alternativamente, todos los terminales están ligados formando un anillo cerrado, que puede ampliarse por ampliación del cebador por una ADN polimerasa sin actividad de desplazamiento de la cadena.

Un procedimiento que utiliza la reacción paso a paso de los grupos químicos se muestra en la Fig. 1b. Inicialmente, se ponen en contacto dos módulos transportadores en condiciones de hibridación. El módulo transportador A comprende un segmento de hibridación a, que se hibrida con el segmento de hibridación a’ del módulo transportador B. Después de la etapa de hibridación, se permite una reacción química entre el grupo químico C_A en el módulo transportador A y C_B en el módulo transportador B. En una tercera etapa, el módulo transportador C se añade en condiciones de hibridación. El módulo transportador C comprende un segmento de hibridación b’, que complementa el segmento de hibridación b del módulo transportador B. La proximidad de la reacción del producto C_A-C_B al grupo químico C_C permite que la reacción química proceda a fin de producir el producto C_A-C_B-C_C. Un cuarto módulo transportado D se añade en condiciones de hibridación. El módulo transportador D se deja hibridar a la estructura en estrella en desarrollo, a fin de poner el C_D reactivo en estrecha proximidad del producto de reacción de la reacción anterior, con lo cual se activa una reacción para producir el compuesto químico final C_A-C_B-C_C-C_D.

La Fig. 1c da a conocer un procedimiento de síntesis convergente, en el que a las etapas de la reacción inicial siguen dos series de reacciones independientes. En una primera serie de reacción los módulos transportadores A y B se ponen en contacto por separado en condiciones de hibridación en un primer recipiente. El segmento de hibridación a del módulo transportador A y el segmento de hibridación a’ del módulo transportador B se hibridarán entre sí y se efectúa una reacción entre los grupos químicos C_A y C_B. En un segundo recipiente, los módulos transportadores C y D se mezclan en condiciones de hibridación a fin de formar un producto de hibridación en el que el segmento de hibridación c del módulo transportador C se hibrida con el segmento c’ de hibridación del módulo transportador D. Posteriormente, la reacción se produce entre el grupo químico C_C y los grupos químicos C_D para producir el producto intermedio C_C-C_D. Los productos intermedios se dejan que se hibriden en las condiciones de hibridación entre sí, con lo que se forma la estructura en estrella. Posteriormente o simultáneamente con la formación de la estructura en estrella, la reacción de los dos productos intermedios C_A-C_B y C_C-C_D de la reacción permite producir el compuesto químico final C_A-C_B-C_C-C_D. Cuando se lleva a cabo la síntesis paso a paso o convergente puede ser útil antes de la reacción de los grupos químicos proporcionar un oligonucleótido auxiliar para formar el centro de la reacción.

En una forma de realización, la presente invención se refiere a la formación del lazo en las estructuras de tallo-lazo proporcionadas por los módulos transportadores como se muestra en la figura 1d. Alternativamente, los lazos se forman por ligadura de los tallo-lazos proporcionada por otros oligonucleótidos como se muestra en la figura 1e o cualquier combinación de los mismos de las formas de realización mostradas en las figuras 1d y 1e. Los módulos transportadores terminales pueden contener sitios de cebado para PCR o los sitios de cebado pueden ser proporcionadas ligando otros oligonucleótidos.

La forma de realización dada a conocer en la Figura 1d se presenta en cinco etapas. En la primera etapa, cuatro módulos transportadores, que lleva cada uno grupos reactivos R y oligonucleótidos biespecíficos se ponen en contacto en condiciones de hibridación. Los módulos transportadores están en equilibrio con la estructura en estrella. En la segunda etapa el complejo de hibridación se liga a los terminales de los módulos transportadores con el fin de formar un ácido nucleico continuo. La proximidad de los grupos químicos al centro de la estructura en estrella activa la reacción y en la etapa 3 se forma un producto, que está acoplado a una entidad de enlace al ácido nucleico que codifica los grupos terminales que han participado en la formación del compuesto químico. En la etapa 4 un sitio de cebado de una polimerasa se liga a la estructura en estrella para permitir la ampliación del ácido nucleico. La última etapa presenta el producto de ampliación en el que un ADN bicatenario se ha formado utilizando el ácido nucleico de la estructura en estrella como plantilla.

En la figura 1e, se presenta una variante de la forma de realización de la figura 1d, a medida que se añade el tallo-lazo por separado y se liga a la estructura en estrella. En una primera etapa, se mezclan cuatro módulos transportadores. Debido a la existencia de segmentos de hibridación, la estructura en estrella se forma en condiciones de hibridación. Después de la formación del complejo de hibridación, se efectúa la reacción para formar el compuesto químico. Tras la formación del compuesto por reacción de los cuatro grupos químicos, se añaden 3 tallo-lazos y un sitio de cebado de una polimerasa. Los tallo-lazos y el sitio de cebado comprenden una prolongación que complementa una prolongación de la estructura en estrella. Cuando se añade una ligasa, los tallo-lazos y el sitio de cebado se ligan a la estructura en estrella, a fin de formar un ácido nucleico continuo.

En determinadas formas de realización la presente invención se refiere a la ligadura de módulos transportadores, por ejemplo utilizando enzimas tales como T4 ADN ligasa, Taq ADN ligasa, T4 ARN ligasa o ADN de *E. coli* ligasa o por ligadura química (Shabarova *et al*, *Nucleic Acids Res.*, 19, 4247-51, 1991).

Módulos transportadores - Fracción de oligonucleótidos

Se utilizan oligonucleótidos para guiar las reacciones químicas en la presente invención. Los oligonucleótidos en este contexto se denominan módulos transportadores, que contienen por lo menos dos segmentos oligonucleotídicos de hibridación específica de la posición, opcionalmente un segmento con codón de oligonucleótido y un grupo químico reactivo.

En una forma de realización la presente invención se refiere a módulos transportadores, donde la fracción oligonucleotídica está constituida por ADN, ARN o análogos de los mismos y en cualquiera de las combinaciones de los mismos. La fracción oligonucleotídica es capaz, al menos después de la modificación, de ser una plantilla apropiada en los protocolos convencionales para replicación y/o ampliaciones del ácido nucleico.

Pueden sintetizarse módulos transportadores utilizando las metodologías conocidas en la técnica. Por ejemplo el oligonucleótido puede prepararse por cualquier procedimiento conocido en la técnica para sintetizar oligonucleótidos, p. ej. síntesis en fase sólida utilizando un sintetizador automático. Los oligonucleótidos después de la síntesis pueden estar asociados cuando se desee (p. ej. acoplados por enlace covalente o no covalente) con un CRG de interés utilizando químicas de acoplamiento convencionales conocidas en la técnica.

En una forma de realización la presente invención se refiere a módulos transportadores, en la que la asociación del CRG al oligonucleótido es la sección media entre los segmentos de hibridación o en la proximidad de los mismos. La sección media puede ser un enlace fosfodiéster, derivados de los mismos o un segmento de ácido nucleico. En la proximidad de la sección media se refiere a las posiciones del tallo de un dúplex de ácido nucleico, preferentemente a las posiciones próximas a la sección media. Preferentemente, la proximidad de la sección media se refiere a menos de 20 nucleótidos, más preferentemente menos de 10 nucleótidos, aún más preferentemente menos de 5 nucleótidos y con la máxima preferencia inferior a 2 nucleótidos.

En una forma de realización, la presente invención se refiere a módulos transportadores, en la que la asociación de un CRG a un oligonucleótido se produce mediante enlazadores y espaciadores, que son lo suficientemente largos y flexibles para permitir que los reactivos se pongan en la proximidad de la reacción. Los enlazadores preferentemente tienen una longitud y composición para permitir reacciones entre los reactivos apareados por oligonucleótidos, pero incluso las reacciones de minimización con entidades desemparejadas. Además, la asociación entre el oligonucleótido y el CRG puede ser mediante un enlace covalente. En determinadas formas de realización, el enlace covalente puede ser más de uno.

El enlace puede escindirse, por ejemplo, por la luz, la oxidación, la hidrólisis, exposición a ácidos, la exposición a bases o la reducción. En la técnica anterior se describen varios enlaces útiles en la práctica de la invención (Fruchtel y Jung, *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 35, 17, 1996). El enlazador ayuda a poner en contacto los reactivos y en determinadas formas de realización, dependiendo de la reacción deseada, las posiciones del ADN como grupo saliente, donde el enlazador está escindido como consecuencia natural de la reacción. En determinadas formas de realización dependiendo de la reacción de circunstancias deseadas de un grupo reactivo es seguida de la escisión del enlazador acoplado a un segundo grupo reactivo para proporcionar productos sin dejar atrás átomos adicionales capaces de proporcionar grupos funcionales químicos.

En una forma de realización, la presente invención se refiere a módulos transportadores, en la que la asociación del CRG al oligonucleótido se produce mediante el eje central del ácido nucleico.

En una forma de realización, la presente invención se refiere a módulos transportadores, en los que la asociación del CRG al oligonucleótido es mediante la base. En una forma de realización preferida el CRG está asociado a las piezas del enlace de hidrógeno distinto al de Watson-Crick.

En una forma de realización, la presente invención se refiere a módulos transportadores, en los que la asociación del CRG al oligonucleótido permite la lectura mediante una ADN polimerasa, por lo menos después de su eliminación.

En una forma de realización, la presente invención se refiere a módulos transportadores, en los que la asociación del CRG al oligonucleótido no es covalente. Por ejemplo, si la biotina está unida al oligonucleótido y la estreptavidina está unida al CRG, por lo tanto una interacción entre la biotina y la estreptavidina asocia el oligonucleótido y el CRG entre sí por enlace no covalente.

Módulos transportadores - Química

Una extensa gama de compuestos y/o bancos de compuestos puede prepararse utilizando los procedimientos descritos en la presente memoria. En determinadas formas de realización, los compuestos que no son, o no se parecen, los ácidos nucleicos o los análogos de los mismos, se sintetizan según el procedimiento de la invención. En determinadas otras formas de realización, los compuestos que no son o no se parecen, las proteínas o los análogos de las mismas, se sintetizan según el procedimiento de la invención.

En una forma de realización la presente invención se refiere a reacciones químicas sucesivas de reactivos guiados por proximidad. Por ejemplo, mediante la utilización de químicas ortogonales o la utilización de grupos protectores/de enmascaramiento ortogonales o por ensamblado sucesivo y reacción de las moléculas transportadoras.

El montaje de módulos transportadores sin formación de anillo, es decir, la formación de un ácido nucleico contiguo, puede poner por sí mismo llevar de manera apropiada los CRG situados en la proximidad, ya que el diámetro de una doble hélice es aproximadamente 2 nm permitiendo de este modo la colocación de varios CRG consecutivos en la proximidad de la reacción. Las condiciones de reacción, los enlazadores, los reactivos y los sitios de reacción se seleccionan para impedir reacciones guiadas no por oligonucleótidos y acelerar las reacciones guiadas por oligonucleótidos. La puesta en contacto sucesiva o simultánea de las moléculas transportadoras puede emplearse dependiendo del compuesto específico que debe sintetizarse. En una determinada forma de realización de especial interés, se contempla la síntesis en multietapa de los compuestos químicos en la que tres o más moléculas transportadoras se ponen en contacto sucesivamente para facilitar la síntesis en multietapa de compuestos químicos complejos.

En una forma de realización, la presente invención se refiere a la hibridación de moléculas transportadoras, que permite la utilización de módulos transportadores a concentraciones inferiores a las concentraciones utilizadas en muchas síntesis orgánicas tradicionales. De este modo los módulos transportadores pueden utilizarse en concentraciones submilimolares. Preferentemente, las concentraciones del módulo transportador pueden utilizarse en concentraciones submilimolares inferiores a 100 micromolar, más preferentemente inferiores a 10 micromolar, incluso más preferentemente inferiores a 1 micromolar, aún más preferentemente inferiores a 100 nanomolar y con la máxima preferencia inferiores a 10 nanomolar.

En una forma de realización la presente invención se refiere a moléculas pequeñas o polímeros formadores de CRG. En la práctica de la presente invención pueden utilizarse reacciones químicas conocidas para sintetizar polímeros o pequeñas moléculas. Las reacciones seleccionadas preferentemente son compatibles con ácidos nucleicos, tal como ADN y ARN o análogos de los mismos. Las reacciones útiles incluyen, por ejemplo, reacciones de sustitución, reacciones de formación del enlace carbono-carbono, reacciones de eliminación y reacciones de adición.

El CRG o los reactivos incluyen varios reactivos que pueden ser de cualquier grupo químico o resto reactivo (p. ej. electrófilos, nucleófilos) conocidos en la técnica química.

Al sintetizar pequeñas moléculas utilizando el procedimiento de la presente invención un módulo transportador puede tener una estructura asociada en la que debe montarse la pequeña molécula. La estructura puede ser cualquier compuesto químico con dos o más sitios para la funcionalización. Los sitios pueden protegerse por procedimientos y grupos protectores conocidos en la técnica. Los grupos protectores pueden ser ortogonales entre sí de modo que pueden separarse individualmente. Los reactivos para modificar una estructura pueden ser, por ejemplo, electrófilos (p. ej. acetilo, amidas, cloruros ácidos, ésteres o iminas), nucleófilos (p. ej., aminas, grupos hidroxilo, tioles) o cadenas laterales.

En determinadas formas de realización los polímeros, especialmente los polímeros sintéticos, se sintetizan según el procedimiento de la presente invención. Los polímeros sintéticos que pueden sintetizarse utilizando el procedimiento y sistema de la invención incluyen cualquier polímero sintético. Por ejemplo los polímeros sintéticos incluyen, pero no se limitan a, polímeros de ácido nucleico peptídico (ANP), policarbamatos, poliureas, poliésteres, poliacrilato (p. ej., polietileno o polipropileno), policarbonatos, polipéptidos con estereoquímica sintética, polipéptidos con aminoácidos sintéticos y combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización, los polímeros comprenden por lo

menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 25 unidades monoméricas o más. En determinadas formas de realización las unidades monoméricas pueden comprender dímeros, trímeros o tetrameros u oligómeros. Los polímeros sintetizados que utilizan el sistema de la invención pueden utilizarse, por ejemplo, como catalizadores, productos farmacéuticos o ligandos para afinidad de diagnóstico. Al preparar determinados polímeros sintéticos, las unidades de monómero se acoplan al módulo transportador. Las unidades de monómero pueden ser, por ejemplo, carbamatos, D-aminoácidos, aminoácidos sintéticos, los ANP, ureas, hidroxiaácidos, ésteres, carbonatos, acrilatos o éteres. En determinadas formas de realización, las unidades monoméricas tienen dos grupos reactivos utilizados para unir la unidad monomérica en la cadena de polímero en desarrollo. Preferentemente, los dos grupos reactivos no son iguales de modo que la unidad monomérica puede incorporarse en los polímeros de manera direccional, por ejemplo, en un extremo puede ser un electrófilo y en el otro extremo un nucleófilo. Los grupos reactivos pueden incluir, pero no se limitan a, ésteres, amidas, ácidos carboxílicos, grupos carbonilo activados, cloruros ácidos, aminas, grupos hidroxilo y tioles. En determinadas formas de realización, los CRG se enmascaran o se protegen (Green *et al.* (1999) *Protective Groups in Organic Synthesis* 3ª edición, Wiley) de modo que la polimerización puede que no ocurra hasta un tiempo deseado cuando se desprotegen los CRG. Una vez los monómeros se juntan mediante montaje del módulo transportador, se produce el comienzo de la polimerización en una cascada de etapas de polimerización y desprotección en la que la polimerización produce la desprotección de un grupo reactivo que debe utilizarse en la siguiente etapa de polimerización. Las unidades monoméricas que deben polimerizarse pueden incluir dos o más monómeros. Las unidades monoméricas pueden contener algunos grupos químicos conocidos en la materia. Los grupos químicos reactivos especialmente los que interferirían en la polimerización, hibridación, etc., se enmascaran preferentemente utilizando grupos protectores conocidos ((Green *et al.* (1999) *Protective Groups in Organic Synthesis* 3ª edición, Wiley). En general, los grupos protectores utilizados para enmascarar estos grupos reactivos son ortogonales a los utilizados en la protección de los grupos utilizados en las etapas de polimerización.

En una forma de realización la presente invención se refiere a módulos transportadores, en los que el sitio reactivo está asociado al mismo módulo transportador para todas las reacciones químicas. Por ejemplo una estructura de pequeña molécula está asociada a un módulo transportador y el módulo transportador restante proporciona entidades que modifican la estructura.

En una forma de realización la presente invención se refiere a módulos transportadores, en los que el sitio reactivo desplazará las posiciones durante las reacciones químicas.

En una forma de realización la presente invención se refiere a la asociación del compuesto químico formado con el oligonucleótido mientras se mantiene la lectura mediante una ADN polimerasa, por ejemplo, al menos después de su eliminación.

Preparación del banco combinatorio

Una diferencia práctica importante entre la síntesis del banco tradicional y guiado por ácido nucleico es la escala de cada manipulación. Debido a las cantidades de material necesarias para el cribado y la identificación del compuesto, la síntesis combinatoria tradicional por lo general procedía a escala nanomolar-micromolar para los miembros del banco. En cambio, la síntesis del banco guiada por ácido nucleico puede tener lugar a escala femtomolar-picomolar porque solamente cantidades diminutas (p. ej. aproximadamente 10^{-20} moles) de cada molécula sintética ligada al ácido nucleico se necesitan para la selección y ampliación por PCR. La amplia diferencia en la escala, combinada con el formato de solución única en la síntesis del banco guiada por ácido nucleico simplifica de manera significativa la preparación de los materiales requeridos.

En una forma de realización, la presente invención se refiere a la formación de un banco de presentación combinatorio. Los bancos pueden prepararse mediante la utilización de repertorios de módulos transportadores en alguna o en todas las posiciones (figura 2a). En una primera etapa se proporciona un repertorio de módulos transportadores para cada posición. Cuando los módulos transportadores se mezclan en condiciones de hibridación, se montarán en estructura de estrella, dirigida por la secuencia de los segmentos de hibridación. Tras el montaje de los módulos transportadores se efectúa la ligadura y la reacción en cualquier orden. En un aspecto de la invención, la ligadura se realiza antes de que la reacción aumente la estabilidad de la estructura en estrella. Después de la reacción guiada por proximidad, un sitio de cebado de polimerasa se liga a la estructura en estrella y se realiza la reacción de ampliación para presentar el compuesto químico formado al medio exterior.

Como apreciaría un experto en la materia, pueden sintetizarse bancos de pequeñas moléculas y polímeros utilizando los principios dados a conocer en la presente memoria. Por consiguiente, el banco de presentación combinatorio puede someterse a la selección y los miembros de los bancos enriquecidos identificarse mediante su oligonucleótido codificador.

Dependiendo de las circunstancias los repertorios de los módulos transportadores para dos o más posiciones se combinan inicialmente y se someten a reacciones químicas guiadas por un ácido nucleico entre los CRG acoplados. Dependiendo de las circunstancias el banco puede estar formado por múltiples reacciones químicas, en las que cada producto intermedio se purifica antes de la posterior ronda de reacciones. Preferentemente se requieren menos de 20 etapas de reacciones químicas para crear un banco. En otras formas de realización, se necesitan menos de 10 etapas de reacción química, y más preferentemente se necesitan entre 3 y 9 etapas para crear un banco.

Selección

La selección y/o identificación de los productos de reacción con actividades deseadas (tal como la actividad catalítica, la afinidad de enlace, la especificidad de enlace o un efecto específico en un ensayo de actividad) puede realizarse según cualquier protocolo convencional. Por ejemplo, las selecciones por afinidad (véase la figura 3) pueden realizarse según los principios en procedimientos basados en el banco tal como la presentación del fago (Smith, *Science*, 228, 1315-7, 1985), la presentación de ribosomas (Hanes *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 14130-5, 1998), la presentación de ARNm (Roberts y Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 12297-302, 1997) o los bancos químicos codificados por ADN (documentos WO 2004/016767 y WO 2002/074929A2). La selección de actividades catalíticas puede realizarse por ejemplo por selección de afinidad en columnas de afinidad análogas en estado de transición (Baca *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 10063-8, 1997) o por esquemas de selección basados en la función (Pedersen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 10523-8, 1998). Ya que cantidades diminutas de ADN (~100 moléculas) pueden ampliarse por PCR, estas selecciones pueden de este modo ser conducidas en una escala de esta magnitud permitiendo una búsqueda verdaderamente amplia de actividades deseadas, tanto económicas como eficaces.

El banco de presentación puede seleccionarse o dividirse para unirse a una molécula diana. En este contexto, la selección o división significa cualquier procedimiento mediante el cual un miembro del banco unido a una molécula diana se separa de los miembros del banco no unidos a moléculas diana. La selección puede realizarse por varios procedimientos conocidos en la materia. En la mayoría de las aplicaciones, la unión a una molécula diana preferible selectiva, de modo que la unión a la diana se favorece sobre otros episodios de unión. Por último, una molécula de unión identificada utilizando la presente invención puede ser útil como reactivo terapéutico y/o agente para diagnóstico.

La estrategia de selección puede realizarse para permitir la selección contra casi cualquier diana. Significativamente, la estrategia de selección no requiere ninguna información estructural detallada acerca de la molécula diana o acerca de los miembros del banco de presentación. El procedimiento completo es conducido por las afinidades de fijación y las especificidades implicadas en los miembros del banco que se unen a una molécula diana dada.

Los miembros del banco seleccionado pueden identificarse fácilmente por su ácido nucleico codificador utilizando la biología molecular convencional. La presente invención permite ampliamente identificar moléculas de unión para cualquier molécula diana conocida. Además, pueden descubrirse nuevas dianas desconocidas aislando moléculas de unión de miembros del banco seleccionados y la utilización de éstas para la identificación y validación de una molécula diana.

La selección de moléculas de unión a partir de un banco de presentación puede realizarse en cualquier formato para identificar miembros del banco de unión. La selección de la unión por lo general implica la inmovilización de la molécula diana deseada, la adición del banco de presentación, que permiten la unión y eliminan los que no son aglutinantes y/o los aglutinantes débiles mediante lavado. El banco enriquecido restante unido a la diana puede eluirse, por ejemplo, con ácido, sales caotrópas, calor, elución competitiva con ligando conocido, mucha sal, base, liberación proteolítica de la diana, liberación enzimática de ácidos nucleicos. En algunas formas de realización los miembros del banco eluidos se someten a más rondas de unión y elución, utilizando las mismas condiciones o más severas o utilizando un formato de unión diferente, que aumentará el enriquecimiento. En otras formas de realización los miembros del banco de fijación no se eluyen de la diana. Para seleccionar miembros del banco que se unen a una proteína expresada en una superficie celular, tal como un canal iónico o un receptor transmembranario, pueden utilizarse las propias células como agentes de selección. Un procedimiento de selección puede implicar también la selección para la unión a los receptores de la superficie celular que son interiorizados de modo que se introduce en el citoplasma el receptor junto con la molécula de unión, el núcleo u otro compartimento celular, tal como el aparato de Golgi o los lisosomas. El aislamiento del compartimento en cuestión conduce a la división de los miembros del banco que son interiorizados a partir de miembros del banco no interiorizados (Hart *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269, 12468-74, 1994). Un procedimiento de selección puede implicar también la selección *in vivo*. Por ejemplo, mediante la dirección del órgano *in vivo*, donde un banco se inyecta en un animal y el órgano de interés se aísla posteriormente y se obtiene de este modo una mezcla enriquecida de miembros del banco, dirigida a este órgano (Pasqualini y Ruoslahti, *Nature*, 380, 364-6, 1996). La porción de ácido nucleico del banco enriquecida puede ampliarse, por ejemplo por PCR, lo que conduce a muchas órdenes de ampliación, permitiendo la identificación p. ej., por clonación y secuenciado del ADN.

Según la forma de realización particular para la selección por afinidad mostrada en la figura 3, un banco de productos de reacción resultante de la forma de realización mostrada en la figura 2a, se pone en contacto con una diana en condiciones de unión. Si uno o más de los compuestos químicos formados tienen afinidad hacia la diana resultará una unión. En una etapa posterior, se dividen los miembros del banco de unión o un ácido nucleico derivado de éste. El ácido nucleico acoplado al compuesto químico formado se amplía posteriormente p. ej. por PCR para producir múltiples copias del ácido nucleico, que codifica los antecedentes de la síntesis del compuesto que presenta la afinidad deseada. El ácido nucleico ampliado puede secuenciarse por numerosas técnicas bien conocidas para descodificar los grupos químicos que han participado en la formación del compuesto logrado. Alternativamente, el ácido nucleico ampliado puede utilizarse para la formación de un banco de la siguiente generación.

Otras selecciones

Pueden realizarse también selecciones para otras propiedades, tal como las actividades catalíticas u otras funcionales. Generalmente, la selección se diseñaría de modo que los miembros del banco con una actividad deseada pueden separarse de otros miembros del banco. Por ejemplo, la selección de los miembros del banco con capacidad para catalizar la escisión del enlace puede realizarse teniendo la biotina acoplada a cada miembro del banco por el enlace en cuestión. La división utilizando estreptavidina puede separar a continuación los miembros del banco con actividad catalítica de los demás. Otro ejemplo es la selección de miembros del banco con capacidades de formación de enlace. Esto puede realizarse, acoplando un sustrato a cada miembro del banco y posteriormente añadiendo un sustrato al cual está unida la biotina. Una reacción entre los dos sustratos que forman un enlace acoplará la biotina a los miembros del banco catalítico. La división que utiliza estreptavidina puede separar entonces los miembros del banco con actividad catalítica de los demás. Puede también realizarse la selección de otras propiedades, tales como la dimerización y/o polimerización. En este caso los miembros del banco pueden dividirse por tamaño del complejo formado, utilizando por ejemplo, HPLC, geles de acrilamida o de agarosa o columnas de exclusión por tamaño.

Ampliación del ácido nucleico

La ampliación del fragmento de ácido nucleico de los miembros del banco enriquecidos puede realizarse por los protocolos convencionales para la ampliación del ácido nucleico. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, *Science*, 230, 1350-4, 1985), la ampliación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) (Compton, *Nature*, 350, 91-2, 1991), la ampliación por desplazamiento de la cadena (Nycz *et al.*, *Anal. Biochem.*, 259, 226-34, 1998), la replicación de la secuencia automantenida (Mueller *et al.*, *Histochem. Cell Biol.*, 108, 431-7, 1997), la ampliación del cebador y la ampliación del plásmido (véase por ejemplo Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) en: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory).

Montaje del banco de presentación por sustitución del módulo

En una forma de realización, la presente invención se refiere al remontaje/ampliación de un miembro del banco enriquecido o a un banco de segunda generación de miembros del banco enriquecidos para volver a crear la presentación. En el caso de un banco enriquecido, se forma un banco de presentación enriquecido, permitiendo de este modo rondas de selección y ampliación y el remontaje. Por ejemplo, como se muestra en la figura 4a, los oligonucleótidos ampliados por PCR descritos anteriormente de los miembros del banco enriquecido se dejan hibridar en condiciones que favorecen la hibridación intramolecular, por lo que la estructura en estrella, constituida por un tallo y un número de tallos-lazo se vuelve a crear. El tallo sin lazo puede contener un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, que genera un saliente con base(s) ambigua(s). La(s) base(s) ambigua(s) de la secuencia en el saliente creado se utiliza(n) convenientemente para que contenga(n) un codón. La digestión por la enzima de restricción del tallo genera de este modo salientes específicos del codón para esta primera posición. Las estructuras en estrella digeridas por la enzima de restricción se hibridan a continuación con un repertorio de moléculas transportadoras que contienen los dos segmentos constantes para la primera posición y un par afín del CRG y anticodón. Por consiguiente, la hibridación codón/anticodón permite que sean ligados pares apropiados de módulos transportadores y estructuras en estrella. El tallo/lazo próximo puede contener también un sitio de reconocimiento para otra enzima de restricción capaz de dejar un saliente específico para el codón para esta segunda posición. La digestión con esta segunda enzima de restricción elimina de este modo el enlace covalente del primer módulo ampliado por PCR al resto de la estructura. La estructura en estrella se desnaturaliza y posteriormente se deja hibridar en condiciones que favorecen la hibridación intramolecular. Se vuelven a crear de este modo estructuras en estrella, pero ahora con un nuevo módulo transportador en la posición uno (con un CRG) y el tallo, sin el lazo, se sitúa ahora en la posición dos. Se realizan rondas de este proceso para sustituir todas las posiciones, para permitir por proximidad reacciones químicas guiadas de las combinaciones apropiadas de los CRG; el banco de presentación se amplía de este modo y se vuelve a montar. Por último los sitios de cebado de PCR pueden ligarse a la estructura en estrella. Por consiguiente, pueden realizarse rondas de selección y ampliaciones y remontaje hasta que se ha conseguido el enriquecimiento deseado (véase la figura 5).

En una forma de realización, la presente invención se refiere a la formación de prolongaciones específicas del codón creadas por enzimas de restricción. Las enzimas de restricción adecuadas son capaces de formar prolongaciones con más de una secuencia específica. Dichas enzimas incluyen i) enzimas de restricción con bases ambiguas en su secuencia de reconocimiento, ii) enzimas de restricción que cortan en el exterior su secuencia de reconocimiento y iii) enzimas de restricción que realizan cortes (endonucleasas de corte). Ejemplos de dichas enzimas de restricción: AlwNI, ApaBI, AsuI, BbvI, BbvII, BccI, Bce83I, BceII, BciVI, BglI, BinI, BseMII, BseRI, BsgI, BsiYI, Bsmal, BspMI, BsrDI, BstEII, BstXI, BtgZI, DdeI, DarII, DraIII, DrdI, EamI105I, EciI, Eco3II, Eco57I, Eco57MI, EcoNI, EspI, Esp3I, Fnu4HI, FokI, GsuI, HinfI, Hpy178III, Hpy188I, Ksp632I, MaeIII, MboII, MmeI, MwoI, PflMI, PfoI, PleI, SapI, SauI, ScrFI, SecI, SfaNI, SfiI, Sth132I, Tsp4CI, TspDTI, TspGWI, TspRI, Tth111I, Tth111II, XcmI, N.AlwI, N.BstNBI, N.BbvCIA y N.BbvCIB.

La capacidad de codificación (número de diferentes codones posibles) de una prolongación viene dada por el número de bases ambiguas en la prologación creada por la enzima de restricción. Por lo tanto, para cada N (N = A, T, G o C) pueden seleccionarse cuatro residuos diferentes, para cada H (H = A, C o T), V (V = A, C o G), B (B = C,

ES 2 320 361 T3

G o T) y D (D = A, G o T) pueden seleccionarse tres restos diferentes y para cada R (R = A o G), K (K = G o T), Y (Y = C o T), S (S = C o G) y M (M = A o C) y W (W = A o T) pueden seleccionarse dos restos diferentes. Por consiguiente, la capacidad de codificación se calcula multiplicando el número de restos diferentes en cada posición entre sí. Por ejemplo Sfi I;

5 5' - ...GGCCNNNN/NGGCC... - 3'

3' - ...CCGGN/NNNNCCGG... - 5'

10 está creando la prolongación 5' -NNN - 3', que está constituida de este modo por tres N, que tiene de este modo una capacidad de codificación de 64 ($= 4 \times 4 \times 4$).

Otro ejemplo, Ava II;

15 5' - ...G/GWCC... - 3'

3' - ...CCWG/G... - 5'

20 está creando la prolongación 5' - GWC - 3', que tiene de este modo una capacidad de codificación de 2.

Otro ejemplo es Bbs I;

25 5' - ...GAAGACNN/NNNN... - 3'

3' - ...CTTCTGNNNNNN/... - 5'

30 está creando una prolongación que está constituida por cuatro N, que tiene de este modo una capacidad de codificación de 256 ($= 4 \times 4 \times 4 \times 4$).

Un grupo especial de enzimas de restricción son aquellas enzimas de restricción que cortan solamente una cadena (endonucleasa de corte). Estas enzimas pueden en principio tener capacidad de codificación indefinida; por ejemplo, cuando i) la secuencia de reconocimiento está situada en el tallo de una estructura tallo-lazo, o ii) se utiliza para crear una prolongación terminal, o iii) en la combinación con otra enzima de restricción. Esto es debido a que la longitud de la prolongación creada puede en principio ser de longitud indefinida.

40 Por ejemplo, N. BbvC IA situada en el tallo-lazo de una estructura;

5' - ...CC/TCAGCNNN

3' - ...GGAGTCGNNN

45 un digesto da como resultado;

5' - ...CC - 3'

50 3' - ...GGAGTCGNNNNNNCGACT - 5'

en este ejemplo están presentes seis N en la prolongación formada, proporcionando de este modo una capacidad de codificación de 1024 ($= 4 \times 4 \times 4 \times 4 \times 4 \times 4$). Sin embargo, es evidente que el número de N puede seleccionarse arbitrariamente proporcionando de este modo una capacidad de codificación indefinida. No puede utilizarse una pequeña fracción del número total de secuencias posibles en este ejemplo. A saber aquellas secuencias que forman una secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción en uso.

60 Además una endonucleasa de corte puede crear una prolongación terminal de longitud arbitraria, por ejemplo

N. BbvC IA

5' - ...CC/TCAGCNNNNNNNN - 3'

65 3' - ...GGAGTCGNNNNNNNN - 5'

ES 2 320 361 T3

se produce un digesto;

5' - ...CC - 3'

5 3' - ...GGAGTCGNNNNNNNN - 5'

y

5' - TCAGCNNNNNNNN - 3'

10

En este ejemplo, se presentan ocho N en la prolongación formada, proporcionando de este modo una capacidad de codificación de 65.536 (= 4 a la 8ª potencia). Sin embargo, es evidente que el número de N puede seleccionarse arbitrariamente proporcionando de este modo una capacidad de codificación indefinida. En este ejemplo puede utilizarse una pequeña fracción del número total de posibles secuencias. A saber aquellas secuencias que forman una secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción en uso.

15

Además puede utilizarse una endonucleasa de corte en combinación con una enzima de restricción para crear prolongaciones de longitud arbitraria sin requerimientos de una estructura tallo-lazo. Por ejemplo

20

N. BbvC IA combinada con Eco RI;

5' - ...CC/TCAGCNNNNNNNNNG/AATTC... - 3'

25 3' - ...GGAGTCGNNNNNNNNCTTAA/G... - 5'

un digesto produce;

30 5' - ...CC - 3'

3' - ...GGAGTCGNNNNNNNNCTTAA - 5'

y;

35

5' - TCAGCNNNNNNNNNG - 3'

y

40 5' - AATTC - 3'

3' - G - 5'

en este ejemplo se presentan ocho N en la prolongación formada, proporcionando de este modo una capacidad de codificación de 65.536 (= 4 a la 8ª potencia). Sin embargo, es evidente que el número de N puede seleccionarse arbitrariamente proporcionando de este modo una capacidad de codificación indefinida. En este ejemplo puede utilizarse una pequeña fracción del número total de posibles secuencias. A saber aquellas secuencias que forman una secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción en uso.

50

Aunque la longitud de los segmentos del codón puede variar, los segmentos del codón pueden oscilar entre 1 y 50 nucleótidos, entre 1 y 40, entre 1 y 30, entre 1 y 15, entre 1 y 10 segmentos de codón, sin embargo, preferentemente tienen una longitud de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 nucleótidos.

55

Aunque la longitud de los segmentos que forman el tallo puede variar, los segmentos del tallo pueden preferentemente oscilar entre 5 y 50 nucleótidos, entre 5 y 40, entre 5 y 30, entre 5 y 15, entre 5 y 10. Los segmentos del tallo, son preferentemente sin embargo de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 nucleótidos de longitud.

60

La longitud de la sección media entre los segmentos que forman el tallo puede variar. La sección media puede oscilar preferentemente desde un solo enlace fosfodiéster (o enlace análogo) a una prolongación de 20 nucleótidos. Sin embargo la sección media es preferentemente un solo enlace fosfodiéster o tiene 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 nucleótidos de longitud.

65

En una forma de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para remontaje/ampliación de un banco de presentación donde las estructuras en estrella después del digesto de la enzima de restricción además se tratan con fosfatasa, que elimina el 5' fosfato y de este modo evita la ligadura de dos estructuras de estrella. Se conocen varias fosfatasas adecuadas, por ejemplo la fosfatasa antártica y la fosfatasa alcalina intestinal de ternero.

En una forma de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para el remontaje/ampliación de un banco de presentación, en el que los módulos transportadores contienen un 5' fosfato para facilitar la ligadura a la estructura en estrella.

- 5 En una forma de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para el remontaje/ampliación de un banco de presentación, en el que los módulos transportadores están fosforilados tras la ligadura a una estructura en estrella. Esto evita la ligadura entre módulos transportadores libres.

- 10 En determinadas formas de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para remontaje/ampliación de un banco de presentación, en el que el terminal 5' de la estructura en estrella ampliado por PCR puede ser creado por otros medios distintos de enzimas de restricción por ejemplo; RNasa, endonucleasa III, endonucleasa VIII, APE1, Fpg, escisión química o fotoescisión. Un producto de PCR consta de un cebador en el extremo 5' y la secuencia restante formada por una ADN polimerasa. El cebador puede contener restos no encontrados en el segmento formado por la ADN polimerasa, tal como dUTP o ARN. Dichos restos pueden ser específicamente reconocidos y
15 escindidos por medios apropiados, que crearán un terminal definido (Smith *et al.*, *PCR Methods Appl.* 2, 328-32, 1993).

- 20 En una forma de realización la presente invención se refiere a un procedimiento para el remontaje/ampliación de un banco de presentación. Los terminales del banco enriquecidos y ampliados por PCR pueden modificarse antes de la formación de una estructura en estrella, por cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente.

Diversificación

- 25 En una forma de realización, la presente invención contempla un procedimiento para la diversificación de un compuesto presentado o un banco de compuestos presentados, permitiendo de este modo la evolución molecular. Esto puede conseguirse de numerosas maneras sin ir más allá del alcance de la presente invención. Por ejemplo (véase la figura 4b), una fracción de las moléculas en una ronda para la sustitución del módulo se digiere con dos enzimas de restricción consecutivas, que eliminan los enlaces covalentes entre el módulo en cuestión y la estructura restante.
30 Las estructuras en estrella se desnaturalizan e hibridan con un repertorio de módulos transportadores para la posición en cuestión. Los segmentos constantes específicos de la posición guían de este modo las hibridaciones, en la misma manera que se creó el banco primario. Los terminales apropiados se ligan y el producto formado se mezcla con la fracción montada guiada por el codón, lo que conduce a la diversificación. Esto puede realizarse en una, algunas o todas las rondas de sustitución del módulo. En otro ejemplo, una fracción de las moléculas en una ronda para la sustitución del módulo se somete a la eliminación de prolongaciones específicas del codón para la posición en
35 cuestión, p. ej. por una exonucleasa. Posteriormente un repertorio de módulos transportadores para la posición en cuestión se hibrida y se liga. Los productos guiados sin codón formados a continuación se mezclan con la fracción montada y guiada por el codón, lo que conduce a la diversificación. Esto puede realizarse en una, algunas o todas las rondas de sustitución del módulo.

- 40 La diversificación puede realizarse asimismo por mezclado/recombinación (mejora genética) de los módulos entre los miembros del banco antes del proceso de sustitución del módulo. Por ejemplo, la porción de ácido nucleico de los miembros del banco enriquecidos se amplía y se digiere con una enzima de restricción que corta en el/los segmento(s) constante(s), creando de este modo dos o más fragmentos. Los fragmentos pueden ligarse con fragmentos que se originan de otros miembros del banco para formar un producto completo, con lo que se ha producido el
45 mezclado/recombinaciones. Otro ejemplo de procedimientos para mezclado/recombinaciones consiste en utilizar las estructuras en estrella (véase la figura 4b). Las estructuras en estrella son digeridas por dos enzimas de restricción consecutivas, se desnaturalizan y se deja que se hibriden lo que conduce a un intercambio del módulo en cuestión. Por consiguiente, pueden realizarse rondas de selección, ampliación y diversificación, lo que permite la evolución
50 molecular (véase la figura 6).

Selección de la actividad catalítica

- 55 El principio descrito puede ampliarse también para seleccionar la actividad catalítica. En este caso los módulos transportadores incluyen funcionalidades del sitio reactivo y la estructura en estrella proporciona un marco para la disposición tridimensional de estos grupos funcionales, simulando de este modo enzimas proteicas.

- 60 Se contemplan esquemas de selección para varias actividades catalíticas. Por ejemplo, i) selección para la unión a un análogo del estado de transición, ii) selección para la formación del enlace asociando un sustrato a estructuras en estrella mientras que el otro sustrato está inmovilizado en p. ej. perlas. (En consecuencia los miembros del banco asociados a las perlas son capaces de la formación del enlace) o iii) selección para la escisión del enlace teniendo la estructura asociada a ambos la estructura en estrella y una perla. (Por consiguiente los miembros del banco no asociados a la perla son capaces de la escisión del enlace). (Véase la figura 7).

65

Compartimentación específica del codón

La estructura en estrella permite que cualquier posición del codón sea terminal y monocatenaria mediante la utilización, por ejemplo, de una enzima de restricción adecuada, permitiendo de este modo la compartimentación muy específica por hibridación y opcionalmente la ligadura a una posición del codón específica. Se conocen en la técnica varios procedimientos para la compartimentación, por ejemplo, microchips de secuencias anticodón (Lockhart *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 14, 1675-80, 1996), columnas de secuencias anticodón (Halpin y Harbury, *PLoS Biol.*, 2, E173, 2004) o utilizando perlas, donde las perlas individuales contienen una secuencia anticodón y una etiqueta de fluorescencia, que posteriormente permite la clasificación p. ej. por células clasificadas activadas por fluorescencia (Iannone *et al.*, *Cytometry*, 39, 131-40, 2000).

Dicha compartimentación puede ser útil en la práctica de la presente invención, por ejemplo; i) durante la síntesis del banco para después de las modificaciones de la reacción química, ii) análisis de clones individuales, iii) análisis de la evolución en las selecciones, o iv) análisis de la diversidad. Por consiguiente, la compartimentación en la situación ii)-iv) puede ser una alternativa rápida y económica al secuenciado del ADN para la descirconvolución de una sola secuencia o de un banco de secuencias.

En toda la descripción, donde se describen composiciones que tienen, incluyen o comprenden componentes específicos, o donde se describen procedimientos que tienen, incluyen o comprenden etapas del procedimiento específico, se contempla que las composiciones de la presente invención también constan esencialmente de los componentes citados o están constituidas por los mismos, y que los procedimientos de la presente invención consisten también esencialmente en las etapas de tratamiento citadas o están constituidos por las mismas. Además, debe sobreentenderse que el orden de las etapas o el orden para realizar determinadas acciones son inmateriales siempre que permanezca operable la invención. Además, pueden realizarse simultáneamente dos o más etapas o acciones.

El procedimiento y las composiciones de la presente invención representan nuevas formas de generar moléculas con las propiedades deseadas. Este método combina la biológica molecular sumamente sensible y potente, con la flexibilidad de la química orgánica. La capacidad para preparar, ampliar, y producir polímeros artificiales y pequeñas moléculas por evolución molecular puede conducir a nuevas clases de catalizadores, nuevos ligandos o fármacos con propiedades superiores a las aisladas con los procedimientos del descubrimiento tradicional más lentos.

La presente invención proporciona también kits y una composición para la utilización en los procedimientos de la invención.

Definiciones

Las expresiones, “ácido nucleico” u “oligonucleótido” tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a un polímero de nucleótidos. El polímero puede incluir, sin limitación, nucleósidos naturales (es decir, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicitidina), análogos de nucleósidos, (p. ej., 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metil adenosina, 5-metilcitidina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-urouridina, C5-propinil-uridina, C5-propinil-citidina, C5-metilcitidina, 7-deazadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina y 2-tiocitidina), bases modificadas químicamente, bases modificadas biológicamente (p. ej., bases metiladas), bases intercaladas, azúcares modificados (p. ej., 2'-fluororribosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa y hexosa) o grupos fosfato modificados (p. ej., enlaces de fosforotioatos y 5',-N-fosforoamidita). Ácidos nucleicos y oligonucleótidos pueden incluir también otros polímeros de bases que tienen un eje central modificado, tal como un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido nucleico peptídico (ANP), y un ácido nucleico con treosa (ANT) y algunos otros polímeros capaces de servir como plantilla para una reacción de ampliación, utilizando una técnica de ampliación, p. ej., una reacción en cadena de la polimerasa o una reacción en cadena de la ligasa.

El término “segmento” tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una sección continua de una secuencia de oligonucleótidos.

Los términos, “codón” y “anticodón” tal como se utilizan en la presente memoria, se refieren a una secuencia de oligonucleótidos que codifica un determinado grupo químico asociado a dicho codón o anticodón. Una serie de códigos de codones para la combinación de reactivos químicos específicos, que han participado en la formación de la molécula codificada.

El término de la estructura “tallo-lazo” tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier estructura secundaria que implica por lo menos una porción de nucleótido dentro de la cual una cadena de una secuencia de ácido nucleico, a través de enlaces de hidrógeno e intramoleculares, con otro fragmento de la misma molécula de ácido nucleico para constituir una zona “autoemparejada” denominada “tallo” de naturaleza en su mayor parte bicatenaria y una zona “lazo” no emparejada situada al final de dicho tallo. Cuando la longitud del lazo es cero, produce el caso especial de tallo-lazo denominado “horquilla” o palíndromo.

La expresión “molécula pequeña” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un compuesto orgánico sintetizado en el laboratorio o encontrado en la naturaleza con un peso molecular inferior a 10.000 gramos por mol,

opcionalmente inferior a 5.000 gramos por mol y opcionalmente inferior a 2.000 gramos por mol, tal como inferior a 1.000 gramos por mol. Las moléculas pequeñas preferidas son adecuadas para administración oral.

Las expresiones, “estructura de pequeña molécula” o “estructura molecular” tal como se utiliza en la presente memoria se refieren a un compuesto químico que tiene por lo menos un sitio o resto químico adecuada para la funcionalización. La estructura de molécula pequeña o la estructura molecular pueden tener dos, tres, cuatro, cinco o más sitios o restos químicos adecuadas para la funcionalización. Estos sitios de funcionalización pueden protegerse o enmascararse como apreciaría un experto en la materia. Los sitios pueden también encontrarse en una estructura de anillo subyacente o en el eje central.

Las expresiones “grupo reactivo químico”, “grupos reactivos” o “unidad reactiva” tal como se utilizan en la presente memoria, se refieren a cualquier resto químico capaz de modificar, añadir o quitar otro resto químico. Incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse a, un bloque de construcción, monómero, unidad monomérica, estructura molecular u otro reactivo útil en la síntesis química mediada por proximidad. En algunos casos el grupo químico no es un nucleótido o un derivado del mismo. En otro aspecto al menos uno de los grupos químicos que han participado en la síntesis del compuesto químico formado no es un aminoácido natural.

La expresión, “asociado a” tal como se utiliza en la presente memoria describe la interacción entre uno o entre dos o más grupos, restos, compuestos, monómeros, etc. Cuando dos o más entidades están “asociadas a” otra tal como se describe en la presente memoria, se unen mediante una interacción covalente o no covalente directa o indirecta. Preferentemente, la asociación es covalente. La asociación covalente puede ser, por ejemplo, pero sin limitación, mediante un enlace amida, éster, carbono-carbono, disulfuro, carbamato, éter, tioéter, urea, amina o enlace carbonato. La asociación covalente puede incluir también un resto enlazador, por ejemplo, un enlazador fotoescindible. Las interacciones no covalentes deseables incluyen el enlace de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones dipolo-dipolo, interacciones por apilamiento pi, interacciones hidrófobas, interacciones magnéticas, interacciones electrostáticas, etc. Asimismo, pueden “asociarse” dos o más entidades o agentes con otro estando presentes juntos en la misma composición.

La expresión, “módulo transportador” tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un grupo químico asociado a un oligonucleótido y a un segmento hacia el extremo 3' que puede hibridarse con unos segmentos hacia el 5' en un segundo oligonucleótido y un segmento hacia el extremo 5' que puede hibridarse con un segmento hacia el extremo 3' del tercer oligonucleótido. El módulo transportador contiene opcionalmente un codón o un segmento anticodón. La expresión “segmento de hibridación” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a dicho segmento de oligonucleótido.

La expresión “estructura en estrella” tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier estructura secundaria que implica por lo menos tres tallos de naturaleza en su mayor parte bicatenaria. 0, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 o más restos nucleotídicos pueden separar los tallos. En el caso especial en el que no se separa ningún resto nucleotídico de cuatro tallos la unión se denomina unión Holliday. Una estructura en estrella puede estar constituida por una molécula de ácido nucleico o puede estar constituida por muchas moléculas de ácido nucleico.

La expresión “proximidad de la reacción” tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una distancia entre los reactivos por la cual la reacción de dichos reactivos puede ocurrir de manera controlada, eficaz y oportunamente.

La expresión “reacción química guiada por la proximidad” tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a las reacciones químicas entre reactivos, que se ponen en proximidad de reacción por hibridación del ácido nucleico al que se asocian los reactivos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se demuestra la formación de estructuras en estrella de ADN triméricas y tetraméricas por oligonucleótidos biespecíficos complementarios mutuos.

Los oligonucleótidos del ADN (preparados por DNA Technology Århus, Dinamarca) se mezclan tal como se indica en la tabla mostrada en la Fig. 8 a concentraciones de 2 μ M cada una en un 1 $\times$ tampón de ligasa (New England Biolabs), NaCl 50 mM. Se incuban las mezclas a 80 grados C durante 2 minutos y se enfrían lentamente a la temperatura ambiente en un baño de agua. Los productos se analizaron por PAGE natural (poliacrilamida al 7,5%), seguida de tinción con bromuro de etidio, utilizando los protocolos habituales (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) en “Molecular Cloning: a Laboratory Manual”, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

Los oligo6 y oligo7 (correspondientes a vip006 y vip007, respectivamente), oligo6 y oligo8 (correspondientes a vip006 y vip008) y oligo7 y oligo8 (correspondientes a vip007 y vip008, respectivamente) tiene cada uno un segmento complementario mutuo, por lo tanto capaz de formar un dímero hibridado. Por consiguiente, se observó una banda

ES 2 320 361 T3

correspondiente a los dímeros en la banda 1-3. Cada vip006, vip007 y vip008 tiene un segmento complementario común a dos oligos próximos, por lo tanto capaz de formar una estructura trimérica hibridada cerrada (véase la figura 8). Por consiguiente, se observó en la banda 4 una banda correspondiente a un trímero. Cada oligo6, oligo7 y oligo9 (correspondiente a vip006, vip007 y vip009, respectivamente) tiene un segmento complementario común a un oligo próximo, por lo tanto capaz de formar una estructura trimérica hibridada. Sin embargo, la estructura es abierta porque vip008 y vip006 no tienen segmentos complementarios (véase la figura 8). Por consiguiente en la banda 5 se observó una banda correspondiente a un trimérico. El trímero abierto es de esperar que tenga una movilidad ligeramente inferior en el gel que la forma de trímero cerrada más compacta. La diferencia de movilidad está en el hecho observado cuando se comparan las bandas 4 y 5.

Una observación equivalente de una banda trimérica que migra lentamente se observó utilizando oligo6, oligo7 y oligo10 (correspondientes a vip006, vip007 y vip010, respectivamente), donde vip006 y vip010 no se hibridan directamente entre sí (compárense la banda 4 y la 6). Para evaluar la eficacia de formación de las formas triméricas cerradas oligo6, oligo7 y oligo8 (correspondientes a vip006, vip007 y vip008, respectivamente) se hibridaron en presencia de un exceso de dos veces de oligo9 u oligo10 (correspondiente a vip009 o vip010, respectivamente). Significativamente, la banda mayor en ambas bandas 7 y 8 corresponde a la especie trimérica cerrada que migra rápido constituida por vip006, vip007 y vip008. La formación lograda de un tetramero cerrado se llevó a cabo hibridando oligo6, oligo7, oligo9 y oligo10 (correspondiente a vip006, vip007, vip009 y vip010, respectivamente) y se observó como una banda mayor en la banda 9. Obsérvese que la valencia deseada en todos los casos se obtuvo con gran eficacia; observada como una única banda mayor.

Ejemplo 2

Conversión de la estructura en estrella del ADN trímero en una sola cadena contigua de ADN por T4 ADN ligasa.

La creación lograda de una estructura en estrella de ADN con tres tallos constituida por una sola cadena ininterrumpida de ADN se demostró en este ejemplo. Se hibridaron oligonucleótidos biespecíficos complementarios comunes y se ligaron posteriormente para formar una cadena continua de ADN.

Se mezclaron oligos de ADN (preparados por la tecnología Århus de ADN, Dinamarca) tal como se indica en la Fig. 9 en concentraciones $2\text{ }\mu\text{M}$ cada uno en $1\times$ tampón de ligasa (New England Biolabs), NaCl 50 mM. Se incubaron las mezclas a 80 grados C durante 2 minutos y se enfriaron lentamente a temperatura ambiente en un baño de agua.

La polinucleótido T4 ADN cinasa fosforiló los terminales 5' de los oligonucleótidos. Una mezcla constituida por $1,67\text{ }\mu\text{M}$ de estructura en estrella, $1\times$ tampón de ADN ligasa (New England Biolabs), NaCl 50 mM y $0,2\text{ }\mu\text{l}$ de T4 ADN polinucleótido cinasa (New England Biolabs, nº de catalizador M0201), se preparó y se incubó durante 30 minutos a 37°C .

T4 ADN ligasa (New England Biolabs, nº de cat. M0202) formó un enlace fosfodiéster entre los extremos yuxtapuestos de oligonucleótidos hibridados. $1/3$ x volumen de mezcla de ligasa, $1\times$ tampón de ADN ligasa (New England Biolabs, NaCl 50 mM y $100\text{ }\mu\text{l}$ de T4 ADN ligasa (New England Biolabs, nº de cat. M0202), se añadieron a la mezcla tratada con cinasa descrita anteriormente y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Se analizaron los productos por PAGE artificial (poliacrilamida al 7,5%, SM urea), seguido de tinción con bromuro de etidio, utilizando protocolos convencionales (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) en "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, Harbor, Nueva York).

Vip076 (25 nt) y vip017 (42 nt) tiene cada uno un segmento complementario común que en la hibridación tiene lugar en el extremo 3' de vip076 adyacente al extremo 5' de vip017, preparando de este modo un sustrato para T4 ADN ligasa. Por consiguiente se observó una banda destacada correspondiente a vip076-vip017 (67 nt) en la banda 1 (PAGE artificial). Asimismo, en la banda 3 se observó la formación de una banda destacada correspondiente a vip017-vip078 (100 nt). En cambio, vip076 y vip078 (58 nt) tiene cada uno un segmento complementario común pero no forma extremos adyacentes hibridados y no es de esperar que se ligue. Por consiguiente, en la banda 2 solamente se observaron las bandas correspondientes a los monómeros de vip076 y vip078. Obsérvese que la banda correspondiente a vip076 es más débil, que lo que es de esperar ya que vip076 es más pequeño y los oligonucleótidos están en concentraciones equimolares. Además, vip078 (58 nt) migra más lento que vip076-vip017 (67 nt) en el gel, lo que no es de esperar ya que vip076-vip017 contiene secuencias para la creación de una estructura tallo-lazo que da un pliegue más compacto, por lo tanto mayor movilidad en el gel.

Vip076, vip017 y vip078 tiene cada uno un segmento complementario mutuo, que en las plazas de hibridación el extremo 3' del vip076 adyacente al extremo 5' de vip017 y el extremo 3' del vip017 adyacente al extremo 5' de vip078, preparando de este modo dos sustratos para T4 ADN ligasa. Por consiguiente, en la banda 4 se observó una banda destacada correspondiente a vip076-vip017-vip078.

Por consiguiente, la presente memoria demostró la creación de una estructura en estrella de ADN trimérico constituida por una cadena contigua de ADN.

Ejemplo 3

Ampliación de la estructura en estrella de ADN con tres tallos

5 En este ejemplo se demostró la ampliación lograda de la estructura en estrella de ADN trimérico que está constituida por una cadena contigua de ADN. Se hibridaron oligonucleótidos biespecíficos complementarios mutuos, se ligaron y se utilizaron posteriormente como plantilla en una reacción de ampliación del cebador.

10 Se mezclaron oligos de ADN (preparados por la tecnología Århus de ADN, Dinamarca) tal como se indica a continuación en concentraciones $2\ \mu\text{M}$ cada uno en $1\times$ tampón de ligasa (New England Biolabs), NaCl 50 mM. Se incubaron las mezclas a 80 grados C durante 2 minutos y se enfriaron lentamente a temperatura ambiente en un baño de agua.

15 La polinucleótido T4 ADN cinasa fosforiló los terminales 5' de los oligonucleótidos. Una mezcla constituida por $1,67\ \mu\text{M}$ de la estructura en estrella, $1\times$ tampón de ADN ligasa (New England Biolabs), NaCl 50 mM y $0,2\ \mu/\mu\text{l}$ de T4 ADN polinucleótido cinasa (New England Biolabs, n° de cat. M0201) se preparó y se incubó durante 30 minutos a 37°C .

20 La T4 ADN ligasa (New England Biolabs, n° de cat. M0202) formo un enlace fosfodiéster entre los extremos yuxtapuestos de oligonucleótidos hibridados. Se añadieron a la mezcla de cinasa tratada $1/3 \times$ volumen de mezcla de ligasa, $1\times$ tampón de ADN ligasa (New England Biolabs), NaCl 50 mM y $100\ \mu/\mu\text{l}$ de T4 ADN ligasa (New England Biolabs, n° de cat. M0202) y se incubó toda la noche a temperatura ambiente.

25 Una reacción de ampliación del cebador se realizó añadiendo 3 volúmenes de mezcla de expansión, $1,33 \times$ tampón Vent (New England Biolabs), vip038 $1,33\ \mu\text{M}$, dNTP $2,67\ \text{mM}$ y con o sin $1,33\ \text{u}/\mu\text{l}$ de Vent(exo-) ADN polimerasa (New England Biolabs, n° de cat. M0257) hasta un volumen de reacción de ligadura. Se incubó la solución durante 1 minuto a 92°C , 1 minuto a 50°C y 10 minutos a 74°C y se colocó en hielo.

30 Se analizaron las reacciones por PAGE natural (7,5% de poliacrilamida) seguido de tinción con bromuro de etidio, utilizando protocolos normalizados (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) en "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, Harbor, Nueva York).

35 Los resultados de los experimentos se presentan en la Figura 10. Vip038 es complementario inverso a la mayoría de las 20 bases con terminal 5' en vip078 y puede sondear por consiguiente una reacción de ampliación utilizando vip078 o las fusiones de vip078 como plantilla. Por consiguiente, en la reacción de ampliación se obtuvo una sola banda destacada correspondiente a vip078 bicatenario que contiene vip038, vip076 y vip078 (banda 2). Obsérvese que esta banda no está presente en la banda 6, lo cual es equivalente pero sin la ADN polimerasa incluida. En cambio, la banda 6 contiene dos bandas, que supuestamente están constituidas por vip076/vip078/vip038 hibridadas y vip078/vip038 hibridadas.

40 La especificidad de la reacción fue demostrada por vip038, vip076 y vip017, donde no se observó ninguna diferencia visible entre con o sin ADN polimerasa, compárense la banda 1 y 5.

45 Se observó también una ampliación con éxito del cebador utilizando el vip017-vip078 de la reacción de ligadura ilustrado por la banda destacada en la banda 3. Obsérvese una banda más débil correspondiente al vip078 bicatenario también se observa la ilustración que no todo el vip078 se ligó al vip017. En la correspondiente banda 7 sin ADN polimerasa se observa una banda más débil con casi la misma movilidad que el vip017-vip078 bicatenario. La banda supuestamente está constituida por vip038/vip017/vip078 hibridado.

50 Se observó también una ampliación del cebador con éxito utilizando la reacción de ligadura de vip076-vip017-vip078 como plantilla. Se observaron dos bandas con movilidad inferior en el gel que el vip017-vip078 bicatenario. La banda inferior corresponde al vip038/vip076-vip017-vip078 hibridado tal como se observa cuando se compara con la banda 8 equivalente sin ADN polimerasa. Sin embargo la banda superior en la banda 4 es única y por consiguiente está constituida por vip076-vip017-vip078 bicatenario. Por consiguiente, este ejemplo demuestra que la estructura del
55 ADN puede convertirse en ADN bicatenario y por consiguiente ampliable.

60

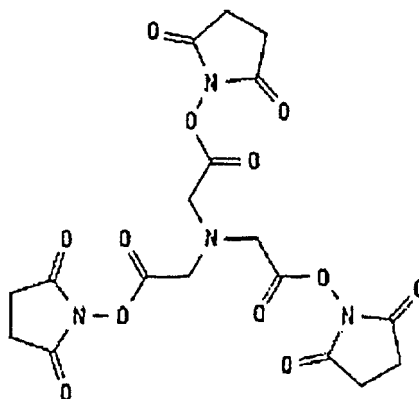
65

ES 2 320 361 T3

Ejemplo 4

Reactividad química en el centro de las estructuras en estrella

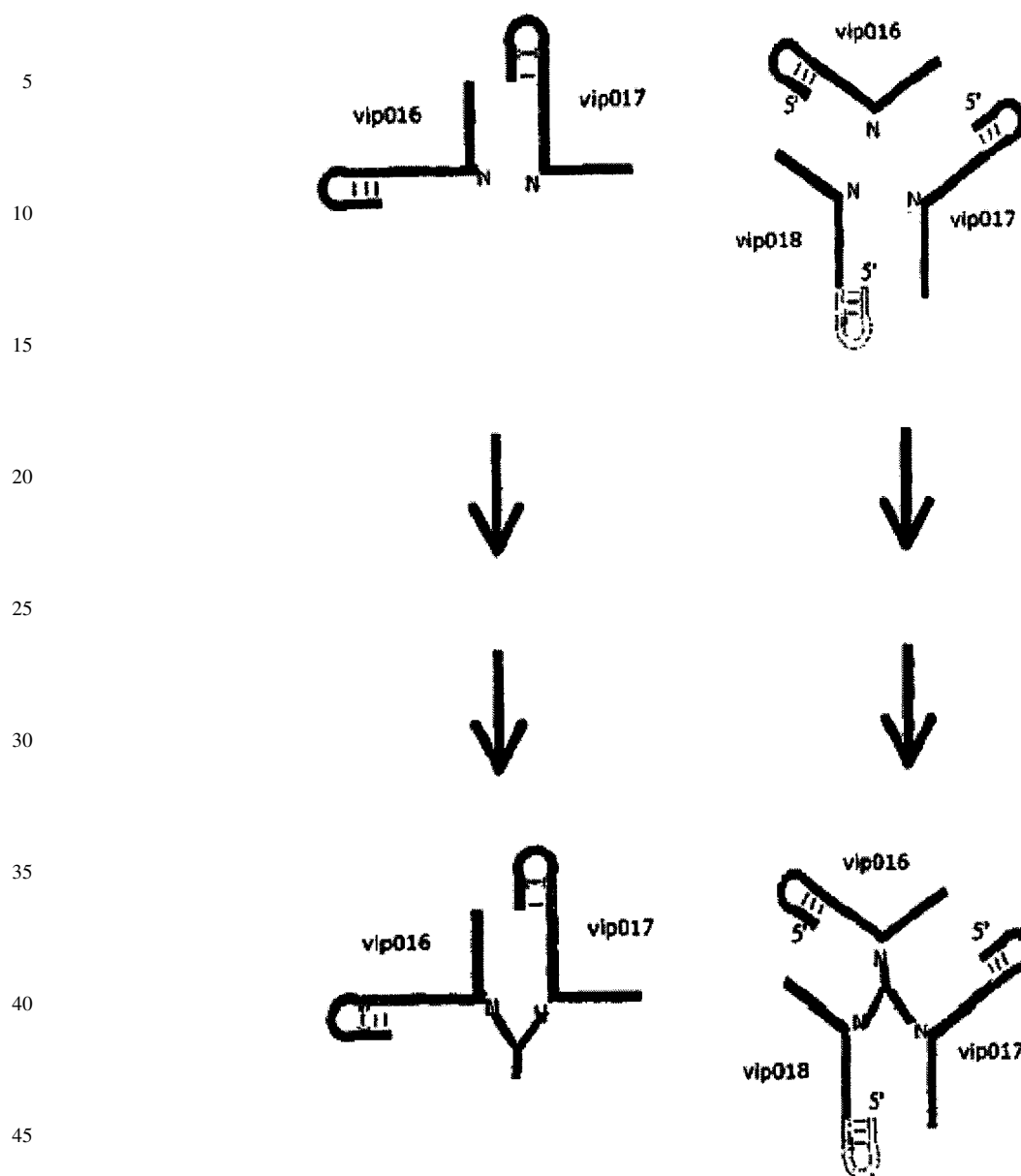
- 5 La reactividad química en el centro de las estructuras en estrella se llevó a cabo utilizando el siguiente reticulador trifuncional (TSAT, aminotriacetato de tris-succinimidilo, Pierce n° de cat. 33063):



TSAT
p.m. 432,36
brazo espaciador 4,2 Å

- 30 Los oligo de ADN: vip016/vip017 o vip016/vip017/vip018 (preparados por la tecnología Århus de ADN, Dina-marca), que tienen todos un dT interno modificado con amino (GlenResearch, n° de cat.: 10-1038-xx) se mezclaron en NaCl 150 mM, fosfato sódico 100 mM, pH 7,2 dando una concentración de oligo total de 20 μ M. Se incubaron las mezclas a 80 grados C durante 2 minutos y se enfriaron lentamente a temperatura ambiente en un baño de agua. Se disolvió TSAT en DMF. Se preparó una dilución en serie de 10 veces en DMF. Se mezcló un volumen de DMF o dilución de TSAT con 9 volúmenes de tampón dando una concentración en tampón final del NaCl 150 mM, fosfato sódico 100 mM, pH 7,2, un volumen de DMF tamponado o dilución de TSAT tamponada se mezcló con un volu-
35 men de mezcla de ADN oligo hibridada proporcionando relaciones de oligo final: TSAT; 1:0, 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 y se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Se analizaron las reacciones por PAGE; tanto (poliacrilamida al 7,5%) como por PAGE artificial (poliacrilamida al 7,5%, urea 8 M), seguido de tinción con bromuro de etidio, utilizando protocolos normalizados (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) en "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, Harbor, Nueva York).

45 (Esquema pasa a página siguiente)



Cada vip016 y vip017 tienen un segmento complementario mutuo, por lo tanto capaz de formar una estructura dimérica hibridada. Vip016, vip017 y vip018 tienen cada uno un segmento complementario común con el oligo próximo, capaz de este modo de formar una estructura trimétrica hibridada cerrada (véase la figura 12).

Como era de esperar en las bandas 1 a 5, gel natural, la banda mayor corresponde a una estructura dimérica, mientras que la banda mayor en las bandas 6 a 10 en el gel natural corresponde a una estructura trimétrica. En un gel artificial la hibridación se interrumpe. Como es de esperar se observó una banda en las bandas 1 a 6 en el gel artificial correspondiente a un monómero. Sin embargo, cuando se incluía TSAT se observaban estructuras de orden superior (bandas 2-5, 7-10, gel artificial) indicando que TSAT no reticulaba los oligos. Significativamente, cuando solamente estaban presentes vip016 y vip017, la estructura reticulada de orden superior era dimérica (gel artificial, bandas 2 a 5), mientras que cuando vip016, vip017, vip018 estaban presentes se observaba una estructura trimétrica adicional (gel artificial, bandas 7 a 10), indicando de este modo que la reticulación depende de la hibridación de los oligonucleótidos de ADN. Es destacable también que como era de esperar se observó una respuesta a la dosis en forma de campana; a baja concentración de TSAT la reacción será lenta conduciendo a rendimientos bajos, a medida que la concentración de TSAT aumenta la reacción procederá más rápida produciendo un producto más reticulado, sin embargo a concentraciones mayores de TSAT la reticulación competirá por las moléculas de TSAT que reaccionan solamente con un oligo de ADN lo que conduce a un producto menos reticulado. Por consiguiente, el rendimiento mayor del producto reticulado se observó utilizando 1.000 equivalentes de TSAT (bandas 4 y 9, gel artificial). Además,

lo ventajoso en una estructura hibridada cerrada para la reticulación fue ilustrado por los rendimientos generales mucho mayores obtenidos en las bandas 7 a 10 cuando se compara en sus contrapartidas en las bandas 2 a 5 con la misma concentración de TSAT.

5 Ejemplo 5

Reacciones químicas dirigidas por la estructura en estrella de ADN

10 El oligonucleótido, vip017, fue funcionalizado reticulando un aminoácido (L-Leu o Gly, nº 61820 y nº 50052 de Fluka) mediante la alfa-amina a la amina primaria en un dT interno modificado en vip017, por el enlazador homobifuncional BSOCOES ((Bis[2-(succinimido-oxicarbonilo)etil]sulfona), nº de cat. 21600 de Pierce) por tratamiento del oligonucleótido (5 nmoles) en solución 200 mM de fosfato sódico (200 μ l) pH 7,4 con 0,1 volúmenes de una solución de BSOCOES 100 mM en DMF durante 10 min. a 25°C, seguido de 0,3 volúmenes de una solución 300 mM de aminoácidos (Leu o Gly) en NaOH 300 mM durante 2 h a 25°C. El volumen total de las reacciones fue de 200 μ l. Se aislaron reactivos de aminoácidos unidos en bruto por precipitación en EtOH y se utilizaron sin purificación adicional. Se precipitó el ADN por NaOAc/EtOH según (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) en "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, Harbor, Nueva York). Se volvió a poner en suspensión el sedimento en agua.

20 Se hibridaron los oligonucleótidos preparando: 3,125 μ M de cada oligonucleótido, MES 125 mM pH 6,0, NaCl 187,5 mM. Se incubaron las mezclas a 80 grados C durante 2 minutos seguido de enfriamiento lento a temperatura ambiente en un baño de agua. Se realizó la reacción dirigida por ADN (formación del enlace amida) añadiendo EDC y sNHS a los oligonucleótidos prehibridados; estructuras en estrella preformadas 2,5 μ M, MES 100 mM, pH 6,0, NaCl 150 mM, EDC 20 mM y sNHS 15 mM (concentraciones finales). Se incubó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente y el EtOH precipitó como se describió anteriormente.

30 Se analizaron las reacciones por PAGE; tanto natural (poliacrilamida al 7,5%) como por PAGE artificial (poliacrilamida al 7,5%, urea 8 M), seguido de tinción con bromuro de etidio, utilizando protocolos normalizados (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) en "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, Harbor, Nueva York).

35 El oligonucleótido, vip017, se funcionalizó reticulando un aminoácido, Leu o Gly, desde la alfa-amina hasta la amina primaria en un dT interno modificado en vip017, por el enlazador homobifuncional BSOCOES. El dT modificado se colocó entre los dos segmentos de hibridación en vip017. Vip076 tiene un dT modificado que contiene una amina primaria seguida de un segmento de hibridación en 3' complementario con el segmento de hibridación en 5' en vip017. Por consiguiente, hibridando vip017 y vip076 se crea proximidad entre el aminoácido conjugado con vip017 y la amina primaria en vip076. Por consiguiente, se observó una banda correspondiente a un dímero en las bandas 4 a 6 en el gel natural. Vip008 tiene segmentos complementarios tanto a vip076 como a vip017 capaces de este modo de formar una estructura en estrella de trímero cerrado y ordenar las funcionalidades químicas de vip017 y vip076 en la cámara de reacción en el centro de la estructura en estrella. Por consiguiente, se observó una banda correspondiente a un trímero en las bandas 1-3 en el gel natural.

45 En la activación por EDC/NHSs puede formarse un enlace amida entre el aminoácido conjugado con vip017 y la amina primaria en vip076, y de este modo la reticulación vip017 y vip076. Como era de esperar cuando se formaron estructuras en estrella (vip008 presente), apareció una única banda correspondiente a vip076/vip017 reticulado tanto con vip017-Gly como con vip017-Leu (nada de PAGE natural, bandas 2 y 3 respectivamente), que no estaba presente sin activación de EDC/NHSs (nada de PAGE natural, bandas 8 y 9) o con vip017 no acetilado (nada de PAGE natural, banda 1). Significativamente, la única banda no era detectable cuando vip008 no estaba presente (PAGE artificial, bandas 5 y 6). Esto ilustra que una reacción química puede estar dirigida por una estructura en estrella y que la estructura en estrella parece más eficaz en el guiado de reacciones químicas que dos oligos hibridados.

55 Ejemplo 6

Montaje y ligadura de una estructura en estrella

60 En este ejemplo se demostró la ampliación lograda de la estructura en estrella del ADN trimérico que está constituida por ADNds. Los oligonucleótidos biespecíficos complementarios comunes se hibridaron, se ligaron y posteriormente se utilizaron como plantilla en una reacción por PCR. Se utilizaron los oligonucleótidos siguientes: vip029-vip031-vip0132-vip0133-vip030. La Fig. 13 presenta esquemáticamente la hibridación de los oligonucleótidos.

65 Se mezclaron oligonucleótidos de ADN (preparados por tecnología de ADN de Århus, Dinamarca) en concentraciones de 2 μ M cada uno en 1 $\times$ tampón ligasa (New England Biolabs), NaCl 50 mM. Se incubaron las mezclas de la manera siguiente: 94°C durante 5 minutos, 80°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos, 35°C durante 30 segundos, 20°C durante 30 segundos, 10°C hasta la etapa siguiente. Se realizó el procedimiento de hibridación en una máquina AB2720 para PCR de Applied Biosystems.

ES 2 320 361 T3

Los terminales 5' de los oligonucleótidos fueron fosforilados por polinucleótido T4 ADN cinasa. Una mezcla constituida por estructura en estrella 1,5 μ M, 1 $\times$ tampón de ADN ligasa (New England Biolabs), NaCl 50 mM y 0,17 U/ μ l de polinucleótido T4 ADN cinasa (New England Biolabs, n° de cat. M0201) se preparó y se incubó durante 30 minutos a 37°C.

Un enlace fosfodiéster entre los extremos yuxtapuestos de los oligonucleótidos hibridados fue formado por T4 ADN ligasa (New England Biolabs, n° de cat. M0202), en 1 $\times$ tampón de ADN ligasa (New England Biolabs), NaCl 50 mM y 200 U de T4 ADN ligasa (New England Biolabs, n° de cat. M0202) en un volumen de 10 μ l y se incubó durante la noche a 16°C.

La ampliación por PCR se realizó utilizando las condiciones siguientes:

Se realizaron las reacciones en 1 $\times$ tampón ThermoPol (New England Biolabs B9004S), con dNTP 0,2 mM (New England Biolabs O447S), MgSO₄ 8 mM, cebador transcrito 0,2 μ M y cebador complementario 0,2 μ M, betaína 1 M (Sigma B0300), 1 U/100 μ l de Vent (exo-) (New England Biolabs M0257L). Los cebadores utilizados fueron vip027 y vip028. Las versiones biotiniladas de estos dos cebadores son vip034 y vip038, respectivamente. La ampliación por PCR se realizó utilizando las siguientes condiciones de ciclado: 2 minutos a 95°C y 20 ciclos de 95°C/30 s., 60°C/30 s., 74°C/30 s. El producto de la PCR que debe utilizarse para el replegamiento y la purificación de los ADNss descrita en el ejemplo 7 a continuación se realizó con los cebadores vip034 y vip028. El producto de la PCR fue analizado por PAGE natural. Se observa una banda de 201 bp en el gel representada en la Fig. 13.

Ejemplo 7

Replegamiento del producto de la PCR

El plegamiento de los productos por PCR se realizó de la manera siguiente. Se llevó a cabo un procedimiento de limpieza por PCR utilizando PerfectPrep (Eppendorf, n° de cat. 0032 007.740) según las instrucciones del kit. El replegamiento se realizó en NaCl 0,1 M, Triton X-100 al 0,1%, vip027 0,1 μ M, vip028 0,1 μ M, en un volumen de 10 μ l (5 μ l de producto de PCR mezclado con 5 μ l de 2 $\times$ mezcla de tampón/cebador). El producto de PCR se utilizó en 4 concentraciones diferentes (que oscilan entre una dilución 1:2 a dilución 1:20). En una serie, la mezcla se incubó durante 2 minutos en agua hirviendo, y posteriormente se enfrió en un baño de agua con hielo. En la segunda serie, la mezcla se calentó y se enfrió utilizando el programa siguiente en una máquina ABI2720 para PCR: 94°C durante 5 minutos, 80°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos, 35°C durante 30 segundos, 20°C durante 30 segundos y 10°C hasta la etapa siguiente. En la tercera serie, no se realizó calentamiento ni enfriamiento.

Se analizaron los productos en gel de urea TBE al 20% (Invitrogen). Se tiñó el gel con SYBR verde (Molecular Probes S7563, dilución 1:10.000 en 1 $\times$ tampón TBE, según las instrucciones).

En la Fig. 14 las bandas del gel comprenden el contenido siguiente:

Banda 1: producto de PCR diluido 1:2, enfriamiento rápido

Banda 2: producto de PCR diluido 1:4, enfriamiento rápido

Banda 3: producto de PCR diluido 1:10, enfriamiento rápido

Banda 4: producto de PCR diluido 1:20, enfriamiento rápido

Banda 5: producto de PCR diluido 1:2, enfriamiento gradual

Banda 6: producto de PCR diluido 1:4, enfriamiento gradual

Banda 7: producto de PCR diluido 1:10, enfriamiento gradual

Banda 8: producto de PCR diluido 1:20, enfriamiento gradual

Banda 9: producto de PCR diluido 1:2, sin tratamiento

Banda 10: producto de PCR diluido 1:4, sin tratamiento

Banda 11: producto de PCR diluido 1:10, sin tratamiento

Banda 12: producto de PCR diluido 1:20, sin tratamiento

Banda 13: producto de PCR solamente

ES 2 320 361 T3

El experimento demuestra que el ADN monocatenario con estructura estrella está migrando a aprox. 1.000 bp, en contraste con el producto de ADNds de 201 bp. Parece que la condición óptima para la formación de la estructura en estrella es el calentamiento seguido de enfriamiento rápido de las reacciones.

Ejemplo 8

Purificación de la estructura en estrella replegada

La estructura en estrella del ADNss se purificó utilizando perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina (Dyna, nº de cat. 650.02). Se lavaron dos veces 10 µl de perlas con 2× BWT (NaCl 2 M, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 0,2%). Tras el lavado final, las perlas se pusieron en suspensión en un volumen de 2× BWT y se añadió un volumen de producto replegado de PCR. Se incubó la suspensión durante 15 minutos a temperatura ambiente, mezclando mientras tanto cada vez. Se colocó el tubo en un imán, y una vez recogidas las perlas se eliminó el sobrenadante. Se pusieron en suspensión las perlas en tampón de lavado caliente a 50°C (urea 2 M, Triton X-100 al 0,1%) y se incubaron durante 2 minutos a 50°C. Se colocó el tubo en el imán, y se realizó el procedimiento de lavado tres veces en total. Se realizó un lavado final en 1× BWT (NaCl 1 M, Tris-HCl 5 mM, pH 8,0, EDTA 0,5 mM, Triton X-100 al 0,1%). Después de la eliminación del tampón de lavado final, las perlas se volvieron a poner en suspensión en 1,5 ml de NT (NaCl 10 mM, Triton X-100 al 0,1%) y se incubaron a 50°C durante 5 minutos. El tubo se transfirió a un baño de agua con hielo para enfriamiento rápido y este procedimiento dio como resultado la formación de la estructura en estrella inmovilizada en las perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. El tubo se colocó después del enfriamiento rápido en el imán y se eliminó el sobrenadante. Las perlas se pusieron en suspensión en 50 µl de NT, listas para la digestión con BsaI para la liberación del ADNss de las perlas.

A 17 µl de perlas se añadieron 2 µl de 10× tampón NBE3 y 1 µl de BsaI (10 U/µl; NEB R05351). La reacción se incubó 1 ½ h a 50°C. Se analizó el digesto por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (10% de TBE-gel de urea, Invitrogen), añadiendo tampón de carga desnaturalizante a las muestras y cargando la mezcla completa incluyendo las perlas completas en los pocillos del gel. Se tiñó el gel con SYBR verde (Molecular Probes S7563, dilución 1:10.000 en 1× tampón TBE, según las instrucciones).

En la Fig. 15 se observa una banda en la franja (+BsaI) de la franja 1 y no se observa ninguna banda en la franja BsaI de la franja 2. De este modo, el ADNss se plegó sobre las perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina formando de este modo el sustrato para BsaI demostrado por la capacidad de la enzima para escindir el producto monocatenario.

Ejemplo 9

Formato de lazo del digesto

Se diseñaron dos genomas, permitiendo ambos el digesto en los lazos de las estructuras en estrella. Las enzimas de restricción no son en general capaces de digerir el ADNss. Sin embargo, la hibridación de oligonucleótidos decámeros con los bucles genera sustratos para las enzimas, y de este modo las secuencias de reconocimiento para las enzimas serán bicatenarias. El diseño del experimento se presenta esquemáticamente en la Fig. 16.

Se montaron dos estructuras, s129 y s149. s129 estaba compuesta de los siguientes oligonucleótidos: vip029-vip161-vip162-vip163-vip070. La s149 estaba compuesta de los siguientes oligonucleótidos: vip029-vip161-vip192-vip193-vip070. Vip162, vip163, vip192 y vip193 contienen todas las secuencias de reconocimiento para dos enzimas de restricción (vip162: ApaI y BamHI, vip163: EcoRI y KpnI, vip192: PvuII y SacI, vip193: SmaI y VspI).

Se mezclaron oligos de ADN (preparados por TAGC, Copenhagen, Dinamarca) en concentraciones 2 µM cada uno en 1× tampón de ligasa (New England Biolabs), NaCl 50 mM. Las mezclas se incubaron de la manera siguiente: 94°C durante 5 minutos, 80°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos, 35°C durante 30 segundos, 20°C durante 30 segundos, 10°C hasta la etapa siguiente. El procedimiento de hibridación se realizó en una máquina para PCR AB2720 de Applied Biosystems.

La polinucleótido T4 ADN cinasa fosforiló los terminales 5' de los oligonucleótidos. Se preparó una mezcla constituida por estructura en estrella 1,5 µM, 1× tampón de ADN ligasa (New England Biolabs), NaCl 50 mM y 0,17 U/µl de polinucleótido T4 ADN cinasa (New England Biolabs, nº de cat. M0201) y se incubó durante 30 minutos a 37°C.

La T4 ADN ligasa (New England Biolabs, nº de cat. M0202) formó un enlace fosfodiéster entre los terminales yuxtapuestos de oligonucleótidos hibridados en 1× tampón de ADN ligasa (New England Biolabs), NaCl 50 mM y 200 U de T4 ADN ligasa (New England Biolabs, nº de cat. M0202) en un volumen de 10 µl y se incubó durante la noche a 16°C.

La ampliación por PCR se realizó utilizando las condiciones siguientes:

ES 2 320 361 T3

Se realizaron las reacciones en 1 × tampón ThermoPol (NEB B9004S), con dNTPs 0,2 mM (NEB O447S), MgSO₄ 8 mM, cebador transcrito 0,2 μM y cebador complementario 0,2 μM, betaína 1 M (Sigma B0300), 1 U/100 μl de Vent (exo-) (NEB M0257L). Los cebadores utilizados fueron vip027 y vip028. Las versiones biotiniladas de los cebadores son vip034 y vip038, respectivamente. La ampliación por PCR se realizó utilizando las siguientes condiciones de ciclación: 2 minutos a 95°C y 20 ciclos de 95°C/30 s., 60°C/30 s. y 74°C/30 s.

En la Fig. 17 se presenta el resultado del experimento.

En las bandas 1 y 3 se observa que ambos genomas se lograron ampliar. Las bandas 2 y 4 son referencias negativas sin ligasa añadida para los dos genomas.

Purificación de las estructuras de ssADN de s129 y s149

Se purificaron 80 μl de producto de PCR (preparado utilizando cebadores vip034 y vip028) de cada genoma utilizando PerfectPrep (Eppendorf, n° de cat. 0032/007.740) según las instrucciones del kit. Se realizó la elución en 40 μl de tampón de elución. Para el replegamiento de los productos de la PCR, se llevó a cabo lo siguiente: a 40 μl de producto de PCR se añaden 750 μl de NaCl 0,2 M, 0,2% de Triton X-100, 7,5 μl de vip027 y 7,5 μl de vip028 y 695 μl de H₂O. Se incubó la mezcla en agua hirviendo durante 5 minutos y se enfrió rápidamente en un baño con hielo.

Se lavaron dos veces 20 μl de perlas de estreptavidina (Dynal, 650.02) con 2× BWT (NaCl 2 M, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 0,2%). Después del lavado final, se pusieron en suspensión las perlas en un volumen de 2× BWT y se añadió un volumen de producto replegado de PCR. Se incubó la suspensión durante 15 minutos a temperatura ambiente, mezclando cada vez mientras tanto. Se colocó el tubo en el imán, y una vez se habían recogido las perlas se eliminó el sobrenadante. Se pusieron en suspensión las perlas en tampón de lavado caliente a 50°C (urea 2 M, Triton X-100 al 0,1%) y se incubaron durante 2 minutos a 50°C. Se colocó el tubo sobre el imán y se llevó a cabo el procedimiento de lavado tres veces en total. Se realizó un lavado final en 1× BWT (NaCl 1 M, Tris-HCl 5 mM, pH 8,0, EDTA 0,5 mM, Triton X-100 al 0,1%). Después de la separación sobre el imán, se pusieron en suspensión las perlas en 50 μl de NaCl 10 mM, Triton X-100 al 0,1%.

Se separaron sobre el imán 20 μl de las perlas de cada preparación y se pusieron en suspensión en 10 μl de NaCl 100 mM, Triton X-100 al 0,1%. Cada preparación se dividió en dos tubos de 5 μl cada uno y se añadieron los oligos del digesto de la forma siguiente:

1: s129 - vip164 - ApaI

2: s129 - vip165 - KpnI

3: s149 - vip194 - PvuII

4: s149 - vip195 - VspI

Se añadieron 0,25 μl de oligo (solución madre 20 μM), dando como resultado una concentración final de 1 μM. Se llevó a cabo la hibridación en un máquina AB2720 de PCR utilizando el programa: 50°C - 2 minutos; 40°C - 2 minutos; 35°C - 2 minutos; 30°C - 2 minutos; 30°C - 2 minutos; 25°C - 2 minutos; 20°C - 2 minutos.

Se lavaron las perlas en 100 μl de NaCl 100 mM, Triton X-100 al 0,1%. Se pusieron en suspensión posteriormente las perlas en 18 μl de 1,1 × tampón del digesto. Las reacciones se dividieron en dos tubos, 9 μl en cada uno, y se añadió 1 μl de enzima (10 unidades) a cada tubo, produciendo 1 × de tampón de digesto para el digesto. Se incubaron una serie de digestos a 30°C y la otra serie se incubó a 37°C. La incubación se realizó durante 5 h, mezclando cada vez un rato para poner en suspensión las perlas del fondo de los tubos.

Después de la digestión, los productos se analizaron en gel de TBE al 10%-urea (Invitrogen). Se añadió tampón de carga a los digestos, y la mezcla de la reacción completa incluyendo las perlas se cargó en el gel. Se tiñó el gel con SYBR verde (Molecular Probes S7563, dilución 1:10.000 en 1 × tampón TBE, según las instrucciones).

El resultado del experimento se presenta en la Fig. 18.

La banda 1 presenta el digesto ApaI de s129 a 37°C

La banda 2 presenta el digesto KpnI de s129 a 37°C

La banda 3 presenta el digesto PvuII de s149 a 37°C

La banda 4 presenta el digesto VspI de s149 a 37°C

La banda 5 presenta el digesto ApaI de s129 a 30°C

La banda 6 presenta el digesto KpnI de s129 a 30°C

ES 2 320 361 T3

La banda 7 presenta el digesto PvuII de s149 a 30°C

La banda 8 presenta el digesto VspI de s149 a 37°C

5 Las dimensiones de la banda esperadas son las siguientes:

ApalI: 163 nt, KpnI: 80 nt, PvuII: 165 nt, VspI: 83 nt.

10 En el gel, las bandas de las dimensiones esperadas aparecen para las cuatro enzimas. Obsérvese que los fragmentos que contienen biotina no introducirán en el gel ya que están unidos a las perlas. Ambas temperaturas dan un producto, que muestra la robustez del procedimiento.

Ejemplo 10

15 *Formación de los enlaces amida dirigida por el ADN en varias configuraciones*

Se funcionalizó el oligonucleótido vip017 reticulando un aminoácido (glicina, cat. de Fluka n° 50052) mediante la alfa-amina a la amina primaria en un dT modificado internamente en vip017, por el enlazador homobifuncional BSOCES ((Bis[2-succinimidooxicarboniloxi]etil)sulfona), cat. de Pierce n° 21600) por tratamiento del oligonucleótido (5 nmoles) en una solución de fosfato sódico 200 mM (200 µl) pH 7,4 con 0,1 volúmenes de una solución de BSOCES 100 mM en DMF durante 10 minutos a 25°C, seguido de 0,3 volúmenes de una solución 300 mM de aminoácido (glicina) en NaOH 300 mM durante 2 h. a 25°C. El volumen total de la reacción fue de 200 µl. Los reactivos de aminoácidos unidos en bruto se aislaron por precipitación en EtOH y se utilizaron sin purificación adicional.

25 Se precipitó el ADN con NaOAc/EtOH según (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) en "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, Harbor, Nueva York). Se volvió a poner en suspensión el sedimento en agua.

30 Los oligonucleótidos se hibridaron preparando: 0,556 µM de cada oligonucleótido, MOPS 111 mM pH 6,5 (69947 de Fluka), NaCl 1,11 M (71376 de Fluka) y posteriormente se incubaron de la manera siguiente: 94°C durante 5 minutos, 80°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos, 35°C durante 30 segundos, 20°C durante 30 segundos, 10°C hasta la etapa siguiente. El procedimiento de hibridación se realizó en una máquina AB2720 para PCR de Applied Biosystems.

35 La reacción química (formación del enlace amida) dirigida por ADN se realizó añadiendo DMTMM 100 mM (Acros, n° de cat. A017657001) a los oligonucleótidos prehibridados. Se disolvió DMTMM en agua a una concentración de 1 M. Antes de añadir DMTMM, se precalentaron las mezclas de reacción a 50°C. La concentración final de cada oligonucleótido fue 0,5 µM. Las reacciones se realizaron en MOPS 100 mM pH 6,5, NaCl 1 M, DMTMM 100 mM (concentraciones finales), en un volumen de 20 µl, a 50°C durante 3 h.

40 Se analizaron las reacciones por PAGE; tanto PAGE natural (poliacrilamida al 20%, Invitrogen), como desnaturante (poliacrilamida al 10%, urea 7 M, Invitrogen), seguido de tinción con SYBR verde (S7563 de Molecular Probes, dilución 1:10.000 en 1 × tampón TBE, según las instrucciones). Todos los resultados se presentan en la Fig. 19.

45 Se funcionalizó el oligonucleótido, vip017, reticulando un aminoácido (glicina) mediante la alfa-amina hasta la amina primaria en una dT interna modificada en vip017, por el enlazador homobifuncional BSOCES. El dT modificado se colocó entre los dos segmentos de hibridación en vip017. Vip008 no contiene una amina receptora en una dT modificada, contiene un segmento de hibridación con el que se hibridará a vip017, y de este modo no estará reticulado por enlace covalente a vip017-Gly en la adición de DMTMM. Por consiguiente, no se observó ninguna banda visible en la banda 1.

55 Vip018-NH₂ tiene una dT modificada que contiene una amina primaria seguida por un segmento de hibridación 3' complementario con el segmento de hibridación 5' en vip017. Por consiguiente, hibridando vip017-gli y vip018-NH₂ se crea proximidad entre el aminoácido conjugado a vip017 y la amina primaria en vip018. Por consiguiente, en la banda 2 se observó una banda correspondiente al dímero compuesto por vip017-Gly/vip018-NH₂ reticulado.

60 Vip006 tiene segmentos complementarios tanto con vip017-Gly como con vip018-NH₂ y de este modo es capaz de formar una estructura en estrella trimérica cerrada y disponer las funcionalidades químicas de vip017-Gly y vip018-NH₂ en la cámara de reacción en el centro de la estructura en estrella. Por consiguiente, se observó una banda correspondiente a un dímero compuesto de vip017-Gly/vip018-NH₂ reticulado en la banda 3. Además, la banda 3 contenía más tinte que la banda 2, lo que indica que la estructura en estrella del trímero cerrado crea mejores condiciones de reacción que lo hace una estructura con dímero abierto.

65 Vip020-NH₂ tiene una dT modificada que contiene una amina primaria, pero no contiene segmentos de hibridación con vip017-Gly. Por consiguiente, no aparecen bandas en la franja 4 porque los reactivos de vip020-NH₂ y vip017-Gly no se ponen en proximidad por emparejamiento de bases.

ES 2 320 361 T3

Vip006 tiene un segmento de hibridación capaz de hibridar un segmento de vip017-Gly, y otro segmento de hibridación capaz de hibridar vip020-NH₂, que tiene una dT modificada que contiene una amina primaria entre sus dos segmentos de hibridación. De este modo, vip006 pone los grupos funcionales en proximidad, y una banda es visible en la franja 5, constituyendo vip017-Gly y vip020-NH₂ reticulados.

Vip009 tiene un segmento de hibridación capaz de hibridar un segmento de vip017-Gly y otro segmento de hibridación capaz de hibridar a vip020-NH₂, que tiene una dT modificada que contiene una amina primaria entre sus dos segmentos de hibridación. Por lo tanto, vip009 pone los grupos funcionales en proximidad. Por consiguiente, se observó una banda en la banda 6, que constituye vip017-Gly y vip020-NH₂ reticulados.

Vip006 tiene un segmento de hibridación capaz de hibridar un segmento de vip017-Gly y otro segmento de hibridación capaz de hibridar vip010-NH₂, que tiene una dT modificada que contiene una amina primaria entre sus dos segmentos de hibridación.

Vip009 tiene un segmento de hibridación capaz de hibridar un segmento de vip017-Gly y otro segmento de hibridación capaz de hibridar a vip020-NH₂, que tiene una dT modificada que contiene una amina primaria entre sus dos segmentos de hibridación.

Hibridando estos cuatro oligonucleótidos se produce la formación de una estructura en estrella tetramérica. En la banda 7 se observó una banda, que demuestra que los grupos funcionales en vip017-Gly y vip020 se ponen en proximidad entre sí mediante la hibridación de los cuatro oligonucleótidos. Además, la banda 7 contenía más tinte que ambas bandas 5 y 6, lo que indica que la estructura en estrella tetramérica cerrada crea mejores condiciones de reacción que lo hacen las estructuras triméricas abiertas.

Vip048-NH₂ tiene una dT modificada que contiene una amina primaria y un segmento de hibridación capaz de unirse a vip017-Gly. Entre la dT modificada con la amina primaria y el segmento de hibridación capaz de hibridarse a vip017-Gly, se insertan 6 nucleótidos no implicados en la hibridación (nucleótidos oscilantes). Se observó una banda en la franja 8, lo que indica reticulación de los dos oligonucleótidos. Sin embargo, los 6 nucleótidos adicionales introducidos redujeron la cantidad obtenida de producto reticulado como se aprecia comparando la banda 8 y la banda 2.

Vip006 tiene un segmento de hibridación capaz de hibridarse con un segmento de vip017-Gly, y otro segmento de hibridación capaz de hibridarse con vip048. Vip048-NH₂ tiene una dT modificada que contiene una amina primaria y un segmento de hibridación capaz de unirse a vip017-Gly. Entre la dT modificada con la amina primaria y el segmento de hibridación capaz de hibridarse con vip017-Gly se insertan 6 nucleótidos no implicados en la hibridación (nucleótidos oscilantes).

La presencia de vip006 pone a los dos grupos reactivos en proximidad y se forma un producto como se observa en la banda 9. La intensidad de la banda fue más fuerte que la observada en la banda 8, lo que indica que vip006 estabiliza la estructura (estructura en estrella trimérica) y la reacción procede mejor que la encontrada en el formato dímérico de la reacción.

Vip048-NH₂ tiene una dT modificada que contiene una amina primaria y un segmento de hibridación capaz de unirse a vip017-Gly. Entre la dT modificada con la amina primaria y el segmento de hibridación capaz de hibridarse con vip017-Gly se insertan 6 nucleótidos no implicados en la hibridación (nucleótidos oscilantes). Vip056 contiene un segmento de hibridación capaz de hibridarse a vip017-Gly y otro segmento de hibridación capaz de hibridarse al segmento de vip048-NH₂ que contiene los 6 nucleótidos oscilantes. De este modo, en la hibridación de estos tres oligonucleótidos, la amina primaria en la dT modificada en vip048 se desplaza 6 nucleótidos fuera de la cámara de reacción y se sitúan ahora en el brazo bicatenario. El ADN bicatenario está en contraste con el ADN monocatenario muy rígido impidiendo de este modo al grupo conjugado desplazarse libremente y disminuyendo de este modo su reactividad. Por consiguiente, solamente una tinción muy débil se observó en la banda 10.

Vip018-NH₂ tiene una dT modificada que contiene una amina primaria seguida de un segmento de hibridación 3' complementario con el segmento de hibridación 5' en vip017-Gly.

Vip056 contiene un segmento de hibridación capaz de hibridarse con vip017-Gly, y otro segmento de hibridación capaz de hibridarse con el segmento de vip018-NH₂. Entre los dos segmentos de hibridación, vip056 contiene 6 nucleótidos más (nucleótidos oscilantes). Se observa una banda de dímero en la banda 11, lo que indica que los grupos reactivos se ponen en proximidad entre sí para que se produzca una reacción química, y los 6 nucleótidos oscilantes en vip056 no alteran la proximidad con la estructura actual en este experimento.

Ejemplo 11

Preparación química de varios oligonucleótidos

Ejemplo 11.1

*Acetilación de un oligonucleótido que tiene dT interna modificada (amina-C6-dT) (posición n = 1)**Acetilación con Fmoc-AA-OH activada por DMT-MM*

El oligonucleótido vip068 que tiene una amina interna-C6-dT, se aciló con Fmoc-Leu-OH activada por DMT-MM cloruro de (4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio, n° de Fluka 74104) por tratamiento del oligonucleótido (500 pmoles) disuelto en una mezcla 1:1 de DMF y NaCl 300 mM junto con uno de los siguientes tampones: fosfato sódico 400 mM, pH 7,0, MOPS 400 mM, pH 7,5, HEPES 400 mM pH 8,0, fosfato sódico 400 mM, pH 8,8, con DMT-MM 50 mM. El volumen de reacción total fue de 20 µl. Se incubaron las reacciones 16 h. a 25°C. Se diluyó la mezcla de reacción hasta 50 µl y se purificó en una columna rotativa (n° 27-5325-01 de Amersham Biosciences) según el protocolo de los fabricantes seguido de purificación por HPLC y análisis de espectrometría de masas.

Procedimiento general de purificación:

Se purificaron oligonucleótidos con grupos funcionales con un instrumento HPLC Agilent de Hewlett Packard con un muestreador automático y un recogedor de fracciones en la columna XTerra C18 (n° 186000602 de Waters) utilizando mezclas de acetonitrilo/TEAA 100 mM pH 7,0 como eluyente. Se liofilizaron las fracciones apropiadas y se diluyeron hasta 20 mM con agua.

Análisis general por espectrometría de masas:

Se analizaron los oligonucleótidos con grupos funcionales por espectrometría de masas MALDI-TOF en un instrumento AutoFlex de Bruker en una matriz de HPA/citrato amónico utilizando el modo reflector de ión negativo.

ADN	Masa calculada	Masa obtenida
vip068-LeuFmoc	6843,340	6844,5

Ejemplo 11.2

*Acetilación de un oligonucleótido con dT modificado interno (amina-C6-dT) (posición n = 1)**Acetilación con Fmoc-AA-OSu*

Se acetiló el oligonucleótido vip046 con Fmoc-AA-OSu (AA = Gly o Leu) por tratamiento del oligonucleótido (125 pmoles) disuelto en una mezcla 1:1 de DMF y tampón de fosfato sódico 100 mM, pH 7,4 con Fmoc-Gly-OSu 25 mM (n° 02420 de ChemImpex) o Fmoc-Leu-OSu (n° 02429 de ChemImpex) durante 2 h. a 25°C. Se precipitó el oligonucleótido con grupo funcional con NH₄OAc/EtOH según (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) en "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York). Se volvió a poner en suspensión el sedimento en agua y se analizó por espectrometría de masas MALDI-TOF.

ADN	Masa calculada	Masa obtenida
Vip046-LeuFmoc	6932,3642	6932,1
Vip046-GlyFmoc	6876,3016	6876,1

Ejemplo 11.3

Acetilación de oligonucleótidos con dT interna modificada (amina-C6-dT) (posición n = 1)

Síntesis de conjugados de péptido-oligonucleótido (abreviatura de una sola letra utilizada para aminoácidos): YGGFL-vip068, GLFYG-vip068, YGGFL-PEG-vip068, GLFYG-PEG-vip068, GFL-vip016 y GFL-PEG-vip016: Acetilación con Fmoc-AA-OSu con desprotección sucesiva en Sefarosa.

Se sintetizaron los péptidos de la amina primaria en una dT interna modificada en los oligonucleótidos absorbidos en DEAE Sefarosa (n° DFF100 de Sigma). Los aminoácidos se acoplaron mediante rondas de acilación con Fmoc-AA-OSu (AA = Gly, Leu, Phe, Tyr, C6, PEG) (éster de Fmoc-L-glicina N-hidroxisuccinimida, n° 02420 de ChemImpex; éster de Fmoc-L-leucina N-hidroxisuccinimida, n° 02429 de ChemImpex; éster de Fmoc-L-fenilalanina N-hidroxisuccinimida, n° 02446 de ChemImpex; éster de Fmoc-L-tirosina N-hidroxisuccinimida, n° 11972 de ChemImpex; N-hidroxisuccinimida éster de ácido Fmoc-6-aminoheptanoico, n° 7296 de ChemImpex; hidroxisuccinimida éster

ES 2 320 361 T3

de ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico, sintetizado a partir del ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico (n° 7310 de ChemImpex) por acoplamiento de EDC con N-hidroxisuccinimida) seguido de la desprotección de Fmoc según el procedimiento de Halpin y Harbury (Plos Biology 2004, 2, 1-8). Tras la elución del ADN de la Sefarosa la mezcla se desalinizó en una columna rotativa (n° 27-5325-01 de Amersham Biosciences) según el protocolo de los fabricantes seguido de purificación por HPLC. Los rendimientos se determinaron por HPLC.

ADN	Rendimiento aislado
YGGFL-vip068	19%
YGGFL-PEG-vip068	32%
GLFYG-vip068	11%
GLFYG-PEG-vip068	18%
GFL-vip016	30%
GFL-PEG-vip016	36%

Ejemplo 11.4

Acetilación de oligonucleótidos con dT interna modificada (amina-C6-dT) (posición n = 1)

Síntesis de oligonucleótido receptor con un enlazador C₆-NH₂, PEG-NH₂ y Gly-NH₂.

El oligonucleótido, vip016, absorbido sobre DEAE Sefarosa (n° DFF100 de Sigma) se aciló en la amina primaria sobre una dT interna modificada en vip016 con FmocNH-C₆-CO₂Su (N-hidroxisuccinimida éster de ácido Fmoc-6-aminohexanoico, n° 7296 de ChemImpex; hidroxisuccinimida éster de ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico, sintetizado a partir del ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico (n° 7310 de ChemImpex) por acoplamiento de EDC con N-hidroxisuccinimida) o Fmoc-Gly-OSu (éster de Fmoc-L-glicina N-hidroxisuccinimida, n° 02420 de ChemImpex) seguido de la escisión del grupo protector Fmoc según el procedimiento de Halpin y Harbury (Plos Biology 2004, 2, 1-8). Las reacciones se realizaron en 1 mmol de ADN. Tras la elución del ADN de la sefarosa la mezcla se desaló en una columna rotativa (n° 27-5325-01 de Amersham Biosciences) según el protocolo de los fabricantes seguido de purificación por HPLC. Los rendimientos se determinaron por HPLC.

ADN	Rendimiento aislado
H ₂ N-PEG-vip016	39%
H ₂ N-C ₆ -vip016	39%
H-G-vip016	45%

Ejemplo 11.5

Conjugación de aminoácidos con oligonucleótidos que tienen dT interna modificada (amina-C6-dT) mediante BSOCOES o DSS en la posición n ≠ 1

Se funcionalizaron los oligonucleótidos vip046, vip017, vip047 y vip048 reticulando un aminoácido (Gly, L-Leu, L-Phe, L-Tyr, n° 50052, n° 61820, n° 78020 y n° 93829 de Fluka) mediante la alfa-amino hasta la amina primaria en una dT interna modificada en el oligonucleótido, mediante los enlazadores homobifuncionales BSOCOES ((Bis [2-(succinimidooxycarbonilo)etil]sulfona), n° de cat. 21600 de Pierce) y DSS (suberato de disuccinimidilo, n° 21655 de Pierce) mediante tratamiento del oligonucleótido (0,5 nmoles) y el aminoácido (15 mM) en una mezcla 1:1 de DMF y 400 mM tampón de fosfato sódico 400 mM pH 8,4 con el enlazador (10 mM). El volumen total de las reacciones fue de 20 µl. Se incubaron las reacciones 4 h. a 25°C. La mezcla de reacción se diluyó hasta 50 µl y se purificó en una columna rotativa (n° 27-5325-01 de Amersham Biosciences) según el protocolo de los fabricantes seguido por purificación por HPLC. Se determinaron los rendimientos por HPLC. Se determinó la identidad por espectrometría de masas MALDI-TOF.

ADN	Rendimiento aislado	Masa calculada	Masa obtenida
vip046-BSOCOES-Gly	32%	6878,2325	6879,3
vip046-BSOCOES-Leu	48%	6934,2951	6936,1
vip046-BSOCOES-Phe	49%	6968,2795	6969,0
vip046-BSOCOES-Tyr	51%	6984,2744	6985,5

ES 2 320 361 T3

Ejemplo 12

Estabilidad de la reacción de acilación en el centro de la reacción a diferentes temperaturas

5 En este ejemplo se demuestra cómo la transferencia de un aminoácido puede efectuarse a temperaturas elevadas en una estructura trimérica en estrella. Los resultados se muestran en la Fig. 20.

10 Los oligos vip006, vip018 y vip017-Leu (tecnología de ADN Århus, Dinamarca, vip017 se modificó tal como se describe en el ejemplo 11) en forma de soluciones madre 20 mM se mezclaron en solución de tampón que contenía una composición final de ácido morfolinopropansulfónico (MOPS, 100 mM, pH 7,0) y NaCl (1 M). Se sometieron las soluciones a un programa de hibridación (máquina de PCR: 5 min @ 94°C, 30 s. @ 80°C, 30 s. @ 65°C, 30 s. @ 50°C, 30 s. @ 35°C, 30 s. @ 20°C, 30 s. @ 10°C). Se añadió a cada reacción activador químico (DMTMM, n° 74104 de Fluka, solución acuosa 100 mM, concentración final de 5 mM) y se incubó durante el tiempo indicado a 25°C o 70°C.

15 Se analizaron las mezclas de reacción desnaturizando PAGE (10%) y se observaron las bandas por tinción con SYBR verde (fijación del gel en EtOH al 50% durante 5 min., lavado en baño de agua 5 min., a continuación se incubó durante 10 min. en solución madre de DMSO diluida 10.000 veces de SYBR verde en 1× tampón TBE).

20 Para el control de las reacciones a 25°C, se observó una cantidad indetectable de producto tras las primeras 2 h. (reacciones 1 a 5). En las 4 h. de reacción (reacción 6), se observó una cantidad pequeña. Se observaron cantidades significativas después de toda la noche de incubación con una intensidad mayor observada cuando se añadió más activador.

25 Para el control de las reacciones a 70°C, el primer vestigio de producto se observó después de 5 min. (reacción 2). Se observaron cantidades crecientes hasta 240 min., a continuación cantidades decrecientes durante las reacciones de toda la noche.

30 El producto reticulado deseado de vip017-Leu y vip018 se formó claramente tanto a 25°C como a 70°C, demostrando de este modo que las estructuras en estrella son capaces de mediar el control de las reacciones a elevadas temperaturas. La velocidad de reacción es claramente diferente a las dos temperaturas utilizadas en este experimento. Sin embargo, cabría de esperar esto ya que la activación inicial del ácido aminoácido carboxílico por DMTMM se controla solamente por colisiones intermoleculares, sin dirigación por ADN.

35 Ejemplo 13

Estabilidad de la reacción de acilación en el centro de la reacción a diferentes pH

40 En este ejemplo se demuestra cómo un aminoácido puede transferirse en una estructura trimérica en estrella en un intervalo de pH de 5,2 a 8,0. A pH bajo, el grupo amino receptor puede estar parcialmente protonado, inactivándolo de este modo como nucleófilo potente. A pH mayor, los productos intermedios reactivos producidos por activación del ácido aminoácido carboxílico pueden hidrolizarse, desactivándolo de este modo y destruyendo el activador químico. Ambos pueden obstaculizar la formación del enlace amida deseado. En la Fig. 21 se presentan los resultados.

45 Los oligos vip016, vip008 y vip017-Tyr (tecnología de ADN Århus, Dinamarca, vip017 modificado como se describe en el ejemplo 11) en forma de soluciones madre 20 mM se mezclaron en NaCl 2 M y se sometieron a un programa de hibridación (máquina de PCR: 5 min @ 94°C, 30 s. @ 80°C, 30 s. @ 65°C, 30 s. @ 50°C, 30 s. @ 35°C, 30 s. @ 20°C, 30 s. @ 10°C). Se diluyó esta mezcla de hibridación en soluciones tampón hasta una composición final de ácido morfolinopropansulfónico (MOPS, 100 mM, pH 5,2, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ó 8,0), NaCl (1 M) y el activador químico (DMTMM, n° 74104 de Fluka, solución acuosa 1,0 M, concentración final de 75 mM) y se incubó durante 1 h a 50°C. La concentración final del ADN fue de 0,5 mM. Se analizaron las mezclas de reacción mediante PAGE desnaturizante (gel al 10%), que se tiñó con SYBR verde (dilución 10.000 veces en TBE-EtOH (96%) 1:1 en solución madre de DMSO) durante 10 min.

55 Las siete bandas que abarcan el pH entre 5,2 y 8,0 presentaban una banda fuerte para los oligos reticulados vip016-vip017-Tyr indicando un intervalo de pH amplio en el que operar.

60 De este modo, la protonación de la amina receptora o la hidrólisis de los productos intermedios reactivos no es problema significativo utilizando las condiciones anteriores.

Ejemplo 14

Estabilidad de la reacción de acilación en el centro de la reacción a diferentes concentraciones de disolvente orgánico

65 Para demostrar la estabilidad de las estructuras en estrella de ADN, se realizó la transferencia de un aminoácido en una mezcla de H₂O y un disolvente orgánico, pareciendo de este modo las condiciones utilizadas en la síntesis

química orgánica. Si el apareamiento de bases y la estructura en estrella se destruyeron en estas condiciones, no se puede formar ningún producto reticulado. Se seleccionaron los disolventes dioxanos, acetonitrilo y tetrahidrofurano con respecto a la miscibilidad en agua y a la aplicación general en síntesis orgánica.

Los oligos vip016, vip008 y vip017-Phe (tecnología de ADN Århus, Dinamarca, vip017 modificado como se describe en el ejemplo 11) en forma de soluciones madre 20 μ M se mezclaron en un tampón de MOPS (200 mM, pH 6,5; n° 69947 de Fluka) y NaCl (2 M; n° 71376 de Fluka) y se sometieron a un programa de hibridación (máquina de PCR: 5 min @ 94°C, 30 s. @ 80°C, 30 s. @ 65°C, 30 s. @ 50°C, 30 s. @ 35°C, 30 s. @ 20°C, 30 s. @ 10°C). Se diluyó esta mezcla de hibridación en mezclas de disolvente y agua hasta una composición final de ácido morfolinopropansulfónico (MOPS, 100 mM, pH 6,5), NaCl (1 M), disolvente (0, 10, 20, 30 ó 35% vol.) y activador químico (DMTMM, n° 74104 de Fluka, solución acuosa 1,0 M, concentración final de 75 mM) que se incubó durante 1 h a 50°C. La concentración final del ADN fue de 0,5 mM. Se analizaron las mezclas de reacción mediante PAGE desnaturalizante (gel al 10%), que se tiñó con SYBR verde (Molecular Probes, n° S7563) según las instrucciones de los fabricantes. En la fig. 22 se presentan los resultados.

Para el dioxano, se formó el producto reticulado con hasta el 20% de disolvente. Por otra parte, se formó para todas las reacciones que contienen cantidades similares de acetonitrilo o tetrahidrofurano de producto, indicando de este modo que la presencia de por lo menos hasta el 35% del disolvente orgánico era bien tolerada y el emparejamiento de las bases del ADN estaba intacto.

Ejemplo 15

Estabilidad del centro de la reacción a diferentes concentraciones de DMF

Para demostrar la estabilidad de las estructuras en estrella del ADN, se realizó la transferencia de un aminoácido en una mezcla H₂O-DMF, recordando de este modo las condiciones utilizadas en la síntesis química orgánica. Si el emparejamiento de las bases y la estructura en estrella se destruían en estas condiciones, no puede formarse ningún producto reticulado.

Los oligos vip016, vip008 y vip017-Phe (tecnología de ADN Århus, Dinamarca, vip017 modificado como se describe en el ejemplo 11) en forma de soluciones madre 20 μ M se mezclaron en un tampón de MOPS (500 mM, pH 6,5; n° 69947 de Fluka) y NaCl (4 M; n° 71376 de Fluka) y se sometieron a un programa de hibridación (máquina de PCR: 5 min @ 94°C, 30 s. @ 80°C, 30 s. @ 65°C, 30 s. @ 50°C, 30 s. @ 35°C, 30 s. @ 20°C, 30 s. @ 10°C). Se diluyó esta mezcla de hibridación en mezclas de DMF y agua hasta una composición final de ácido morfolinopropansulfónico (MOPS, 12,5 mM, pH 6,5), NaCl (100 mM), DMF (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 ó 70% vol. DMF) y activador químico (DMTMM, n° 74104 de Fluka, solución acuosa 1,0 M, concentración final de 75 mM) que se incubó durante la noche a 25°C. La concentración final del ADN fue de 0,5 mM. Se analizaron las mezclas de reacción mediante PAGE desnaturalizante (gel al 10%), que se tiñó con SYBR verde (Molecular Probes, n° S7563) según las instrucciones de los fabricantes. En la fig. 23 se presentan los resultados.

La banda del producto producida en las cinco primeras bandas era de similar intensidad, indicando de este modo que la presencia de por lo menos hasta el 40% del disolvente orgánico, DMF, era bien tolerada y el emparejamiento de las bases del ADN estaba intacto. A 50% de DMF, una banda débil se observaba todavía, pero desde el 60% en adelante no se detectó ningún producto reticulado.

Ejemplo 16

Diferentes activadores para mediar en la reacción química

Este ejemplo sirve para ilustrar cómo varios activadores químicos y nucleófilos auxiliares pueden utilizarse para mediar en la acilación de una amina receptora con un aminoácido. Es sabido en química de péptidos que la adición de un nucleófilo auxiliar puede aumentar en gran medida la velocidad de acilación y/o cambiar el resultado final de la reacción. En este ejemplo se controlaron las reacciones utilizando un nucleófilo no auxiliar, N-hidroxisuccinimida (NHS, p. ej. n° 56480 de Fluka), sal sódica de N-hidroxisulfo-succinimida (s-NHS, n° 56485 de Fluka) o N-hidroxibenzotriazol hidratado (p. ej. n° 54804 de Fluka) se utilizaron con DMTMM (n° 74104 de Fluka) o EDC (p. ej. n° 03449 de Fluka) como activadores.

Los oligos vip016, vip008 y vip017-Tyr (tecnología de ADN Århus, Dinamarca, vip017 modificado como se describe en el ejemplo 11) en forma de soluciones madre 20 mM se mezclaron en un tampón de MOPS (200 mM, pH 6,5) y NaCl (2 M) y se sometieron a un programa de hibridación (máquina de PCR: 5 min @ 94°C, 30 s. @ 80°C, 30 s. @ 65°C, 30 s. @ 50°C, 30 s. @ 35°C, 30 s. @ 20°C, 30 s. @ 10°C). Esta mezcla de hibridación se diluyó con agua y soluciones de aditivos hasta una composición final de ácido morfolinopropansulfónico (MOPS, 100 mM, pH 6,5), NaCl (1 M), nucleófilo auxiliar (conc. Final 25 mM) y activador químico (DMTMM o EDC, solución acuosa 0,5 M, concentración final de 75 mM). La concentración final de ADN fue de 0,5 mM. Se incubaron las reacciones durante 1 h. a 50°C.

ES 2 320 361 T3

Se analizaron las mezclas de reacción desnaturalizando PAGE (gel al 10%), que se incubó con SYBR verde (dilución 10.000 veces en TBE-EtOH (96%) 1:1 en solución madre de DMSO) durante 10 min. En la Fig. 24 se presentan los resultados.

Las reacciones 1 a 4 utilizando DMTMM como activador, no se observó ninguna diferencia utilizando aditivo o nada. Se observó más claramente para EDC solamente, en cuyo caso no se observó producto o solo débilmente. Sin embargo, la adición de cualquier nucleófilo auxiliar dio una cantidad comparable de producto reticulado de nuevo. Esto demuestra que el nucleófilo auxiliar es necesario cuando se utiliza EDC como activador y de otra manera es bien tolerado en la mezcla de reacción.

Ejemplo 17

Transferencia de aminoácido a otros receptores

Este ejemplo demuestra cómo un aminoácido puede ser transferido eficazmente a numerosas aminos receptoras unidas de varias maneras. El vip016 que lleva una C₆-NH₂ sirvió como referencia como anteriormente. Otros receptores fueron el tripéptido GFL-vip016, el tripéptido unido por PEG GFL-PEG-vip016, NH₂-PEG-vip016 con grupos funcionales amino, NH₂-C₆-vip016 con grupo funcional amino y glicina en G-vip016 (preparados todos como se describe en el ejemplo XX).

Los oligos vip016-X-NH₂, vip008 y vip017-Gly (tecnología de ADN Århus, Dinamarca, vip017 modificado como se describe en el ejemplo XX) en forma de soluciones madre 20 mM se mezclaron en un tampón de MOPS (200 mM, pH 6,5) y NaCl (2 M) y se sometieron a un programa de hibridación (máquina de PCR: 5 min @ 94°C, 30 s. @ 80°C, 30 s. @ 65°C, 30 s. @ 50°C, 30 s. @ 35°C, 30 s. @ 20°C, 30 s. @ 10°C). Esta mezcla de hibridación se diluyó con agua y solución de activador hasta una composición final de ácido morfolinopropansulfónico (MOPS, 100 mM, pH 6,5), NaCl (1 M) y activador químico (DMTMM, n° 74104 de Fluka, solución acuosa 1,0 M, concentración final de 75 mM). La concentración final de ADN fue de 0,5 mM. Se incubaron las reacciones durante 1 h. a 50°C.

Se analizaron mezclas de reacción mediante PAGE desnaturalizante (gel al 10%), que se tiñó con SYBR verde (dilución 10.000 veces en TBE-EtOH (96%) 1:1 en solución madre de DMSO) durante 10 min. En la Fig. 25 se presentan los resultados.

Las seis reacciones presentan una banda fuerte procedente del producto reticulado. Se observó que las franjas 4 y 5 corren al margen más lentas en comparación con otras debido al péptido mayor (tetrapéptido). De este modo, la transferencia de una glicina a un grupo amino unido por el enlazador tripéptido ± PEG, el propio enlazador PEG, el enlazador C₆ o la glicina proporciona directamente resultados coherentes. Esto demuestra la robustez en el reactor formada por las estructuras en estrella. El tamaño creciente del receptor tiene poco o ningún efecto en los resultados de la reticulación.

Ejemplo 18

Montaje y ulterior unión de dos productos estructurales de presentación del ADN

Se formaron dos productos estructurales de presentación del ADN: Leu-encefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-ADN) y Leu-encefalina mezclados (Gly-Leu-Phe-Tyr-Gly-ADN). Este último estaba incluido como referencia negativa para el ensayo de división utilizando el anticuerpo 3E7 monoclonal específico para Leu-encefalina. Las etapas clave del proceso se ilustran en la Figura 26.

Se adquirieron oligonucleótidos de ADN en DNA Technology (Århus, Dinamarca) y se funcionalizaron como se describe en el Ejemplo 11.

La primera etapa del procedimiento conllevaba la hibridación de los oligos siguientes, en dos reacciones por separado para formar Leu-encefalina-ADN y Leu-encefalina mezclada respectivamente. En la reacción 1 (R1); Gly-Phe-Leu-PEG-vip231, Gly-BSOCOES-vip262 y vip088 (posición 1, 2 y 3 en la estructura en estrella de ADN de 3 franjas, respectivamente) y en la reacción 2 (R2): Gly-Tyr-Phe-PEG-vip238, Leu-BSOCOES-vip269 y vip088 (posiciones 1, 2 y 3 en una estructura en estrella de 3 franjas, respectivamente). Los tres oligos en las reacciones se hibridarán entre sí, formando de este modo una unión de 3 franjas, donde los aminoácidos unidos se sitúan en el centro de la estructura. Obsérvese que vip088 no tiene un grupo funcional químico apropiado. La función de vip088 consiste simplemente en hibridar los otros dos oligos para formar el enlace de 3 franjas cerrado.

Se mezclaron 200 pmoles de cada oligo en el ácido morfolinopropansulfónico 100 mM (MOPS, n° 69947 de Fluka) pH 6,5 y NaCl 1 M en un volumen total de 370 µl. La hibridación de los oligos se realizó por incubación durante cinco minutos a 95°C, antes de enfriar a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. El activador DMT-MM (n° 74104 de Fluka) se disolvió en agua y se añadió a una concentración final de 75 mM. El volumen de la reacción final fue de 400 µl. La reacción química se incubó durante 1 hora a 50°C. A continuación, el producto se precipitó

ES 2 320 361 T3

en etanol añadiendo 2,5 volúmenes de etanol y 1 μ l de GenElute (Sigma 56575) a cada reacción, y centrifugando los tubos 30 minutos, $20.000 \times g$ a 4°C. Se lavaron los sedimentos con etanol al 70%, antes de que se secaran con aire y se volvieron a poner en suspensión en agua.

5 A continuación, se sometieron las muestras a electroforesis en gel de poliacrilamida artificial de preparación (PAGE); TBE al 10%-gel de urea (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. La banda correspondiente al producto reticulado se cortó y se extrajo el producto por el procedimiento “triturar y remojar” (Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989) en: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory); la pieza de gel se trituró y se remojó toda la noche en tampón 400 TBE. Las muestras se precipitaron en etanol como se describió
10 anteriormente. Se disolvieron los precipitados en 1 $\times$ tampón de ligasa (New England Biolabs), NaCl 50 mM. A continuación, los terminales 5' se fosforilaron mediante polinucleótido cinasa; 50 unidades de polinucleótido cinasa (NEB M0201) se incluyeron en un total de 200 μ l de volumen de reacción. Se incubaron las reacciones durante 30 min. a 37°C.

15 A continuación, los dos oligos reticulados se transformaron en una cadena continua de ADN mediante una ADN ligasa, que formó un enlace fosfodiéster entre el extremo 3' yuxtapuesto de vip231 y el extremo 5' de vip262 para R1 y el extremo 3' yuxtapuesto de vip238 y el extremo 5' de vip269 para R2. Se añadió T4 ADN ligasa (NEB M0202L) en 1 $\times$ tampón de ligasa, NaCl 50 mM y se añadieron 5 unidades/ μ l de enzima, proporcionando un volumen de reacción final de 300 μ l. Se incubó la ligadura durante la noche a 16°C.

20 A continuación, se eliminó el enlazador BSOCOES escindible. Se añadieron el tampón del ácido 3-(ciclohexil-amino)-1-propanosulfónico (CAPS, n° 29338 de Fluka) (pH 11,8) y 2-mercaptoetanol (n° 63689 de Fluka) dando concentraciones finales de 100 y 60 mM, respectivamente, en un volumen de reacción final de 600 μ l. Se incubaron las reacciones durante 2 horas a 37°C. Las reacciones se neutralizaron a continuación añadiendo 200 μ l de tampón MOPS
25 1 M, pH 6,5. A continuación, el ADN se precipitó con etanol según el procedimiento convencional. Después del secado con aire de los sedimentos, el ADN estaba listo para la etapa siguiente, que era la introducción de oligonucleótidos con grupos funcionales en la posición 3. Obsérvese que mediante la eliminación del enlazador BSOCOES se forman dos aminas primarias. Una es en el terminal de la cadena peptídica en crecimiento en el oligonucleótido en la posición 1 original y la otra está situada en el oligonucleótido en la posición 2 original. Se utilizó la denominada estrategia
30 “oscilante” para favorecer la reacción ulterior entre la cadena peptídica en crecimiento y el aminoácido entrante en la posición 3 en la etapa siguiente: los oligos en la posición 2 contienen corriente arriba de la base modificada una prolongación de las bases (bases oscilantes), que se desemparejan durante la primera transferencia química, sin embargo en el segundo proceso de transferencia son bases emparejadas con la posición 3 oligo. Por consiguiente, la amina primaria en el oligonucleótido en la posición 2 original está ahora separada del centro de la estructura por una
35 prolongación del ADNds que disminuirá su reactividad con los restos en el centro de la estructura en estrella debido a que el ADNds es rígido.

Se hibridó el producto de R1 con Tyr-BSOCOES-vip263 y el producto de R2 se hibridó con Gly-BSOCOES-vip270 en las condiciones siguientes: 200 pmoles de oligo, en MOPS 100 mM, pH 6,5, NaCl 1 M en un volumen
40 total de 240 μ l. Se incubó la mezcla 5 minutos a 95°C, antes de enfriar a temperatura ambiente durante un periodo de aproximadamente 30 minutos. A continuación, se añadió el activador DMT-MM (n° 74104 de Fluka) hasta una concentración final de 75 mM, para activar la reacción química entre los aminoácidos. Se incubó la reacción química durante 1 hora a 50°C. Se precipitaron las muestras en etanol y se sometieron posteriormente a PAGE artificial de preparación (como se describió anteriormente) donde la banda correspondiente al producto reticulado se escindió
45 del gel. A continuación, cada producto reticulado se transformó en una cadena continua de ADN mediante una ADN ligasa, que formó un enlace fosfodiéster entre el extremo 3' yuxtapuesto del vip232 original y el extremo 5' del vip263 para R1 y el extremo 3' yuxtapuesto del vip269 original y el extremo 5' de vip270 para R2, respectivamente.

Además, los sitios terminales de cebado de la PCR fueron introducidos en la misma reacción por la ADN ligasa.
50 Los oligos de ADN con los sitios de cebado para PCR, vip029/vip070 y vip029/vip030 para R1 y R2, respectivamente, se hibridaron previamente en las condiciones siguientes: 200 pmoles de cada oligo en 1 $\times$ tampón de ligasa y NaCl 50 mM en un volumen total de 40 μ l y se incubaron en un máquina para PCR durante 5 minutos a 95°C y durante etapas de 30 segundos a las temperaturas siguientes: 80°C, 65°C, 50°C, 45°C, 30°C y 20°C. Cuando vip070 se hibrida con vip029 sobresalen la mayor parte de los cuatro nucleótidos con terminales 5' de vip070. Estos cuatro son complementarios
55 inversos a la mayoría de los cuatro nucleótidos 5' terminales en vip231 que también sobresalen cuando vip231 se hibrida con vip263. Por consiguiente, los extremos que sobresalen pueden hibridarse y formar un sustrato para una ADN ligasa. Asimismo, cuando la vip030 se hibrida con vip029 sobresale la mayoría de los cuatro nucleótidos con terminal 5' de vip070. Estos cuatro nucleótidos son complementarios inversos a la mayoría de los cuatro nucleótidos 5' en vip238 que también sobresalen cuando vip238 se hibrida con vip270. Los productos reticulados, purificados en
60 gel se volvieron a poner en suspensión en 1 $\times$ tampón de ligasa, NaCl 50 mM y se mezclaron con las secuencias de PCR prehibridadas que contienen los oligos de ADN; vip029/vip070 y vip029/vip030 para R1 y R2, respectivamente. Los extremos 5' del ADN fueron fosforilados en primer lugar por 50 unidades de polinucleótido cinasa (NEB 0201L) en un volumen final de 200 μ l. Se dejó incubar la reacción durante 30 minutos a 37°C.

65 A continuación, una T4 ADN ligasa transformó el ADN en una cadena continua de ADN constituida por vip029-vip231-vip262-vip263-vip070 y vip029-vip238-vip269-vip270-vip030 en R1 y R2 respectivamente. Se añadieron a las reacciones 1500 unidades de T4 ADN ligasa (NEB 0201L) en 1 $\times$ tampón de ligasa, NaCl 50 mM dando un volumen final de reacción de 300 μ l. Se incubaron las reacciones de ligadura a 16°C durante la noche. A continuación,

se eliminó el enlazador BSOEES tal como se describió anteriormente. Las muestras fueron precipitadas por etanol y se sometieron posteriormente a PAGE artificial de preparación, se precipitó con etanol otra vez y se disolvió en 20 μ l de agua como se describió anteriormente. Los productos montados no estaban listos para la prolongación del cebador.

En todo el procedimiento descrito anteriormente, se eliminaron las muestras pequeñas para el análisis por PAGE artificial como se describió anteriormente. En la Figura 27 se presenta la fotografía del gel. Las bandas 1 y 2 muestran los oligos vip-231 (35 nt)/vip262 (68 nt) y vip-238 reticulado (35 nt)/vip-269 (68 nt) funcionalizados y reticulados formados con éxito, para R1 y R2, respectivamente. Los productos reticulados migran con un tamaño aparente de aproximadamente 200 bp. No es inesperada la diferencia observada entre el tamaño real y el tamaño aparente debido a las estructuras secundarias potentes en los productos formados que están presentes incluso en un gel artificial debido a las secuencias complementarias inversas. Además, se observaron bandas de tamaño más pequeño que lo más probable se originan en la degradación de la especie completa.

Las bandas 3 y 4 presentan los productos después de ambas ligaduras de los dos oligos y la eliminación del enlazador BSOEES para R1 y R2 respectivamente. Los productos principales migran con un tamaño aparente de 150 bp. Además, se observaron también bandas de tamaño más pequeño lo más probablemente generadas por degradación de las especies completas. Obsérvese que las especies en ambas bandas 1 y 3 (y en la banda 2 y 4) son de tamaño casi igual pero migran de manera significativa diferentemente en el gel. Esto no es inesperado porque las especies en las bandas 1 y 2 esencialmente son moléculas de ADN ramificadas, mientras que las especies en la banda 3 y en la banda 4 son moléculas de ADN lineal.

Las bandas 5 y 6 presentan el producto después de la reticulación de los oligos en posición 3 para R1 y R2 respectivamente. En ambas reacciones, el oligo en la posición 3 tiene 74 nt. Por lo tanto, los productos esperados son de 177 nt. Sin embargo el tamaño aparente en el gel de las especies reticuladas es aproximadamente 600 bp. Esto no es inesperado debido a que las especies están constituidas por moléculas de ADN lineal no reticuladas con estructuras secundarias muy potentes debido a las secuencias complementarias inversas en los brazos de la estructura de ADN en estrella. Incluso una PAGE que contiene urea no es capaz de desnaturalizar la estructura.

Las bandas 7 y 8, contienen los productos después de tanto la ligadura de los oligos en posición 3 como los sitios de PCR que contienen oligos y la eliminación del enlazador BSOEES para R1 y R2 respectivamente. Los sitios de cebado para PCR que contienen los oligos añaden un total de 64 nt, de este modo los productos deseados son de 241 nt. Se observaron dos bandas sobresalientes de un tamaño aparente de 1.000 bp en exceso. La banda superior contiene más probablemente los productos completos, mientras que la banda inferior contiene más probablemente las moléculas que carecen de uno de los dos oligos que contienen los sitios de la PCR. Además, en la banda 8, se observó una banda que migra con un tamaño aparente de 600 bp. La banda representa lo más probablemente una especie sin sitios de PCR que contienen los oligos ligados (compárese las bandas 8 y 6).

La banda 9 contiene el escalón de ADN de 100 bp (Fermentas, SM0248).

Ampliación del cebador

Los productos montados se sometieron a la ampliación del cebador, que transforma el ADN plegado en una estructura en estrella con el producto químico en el centro en las moléculas lineales bicatenarias con el producto químico desplegado en la superficie. La reacción fue cebada por vip038 que es complementario inverso al 3' de las moléculas montadas. Las reacciones se condujeron en 1 $\times$ tampón Thermopol, dNTP 0,2 mM, MgSO₄ 8 mM, betaína 1 M (Sigma, B-0300), vip038 0,4 μ M, 0,2 U/10 μ l de Vent (exo-) (NEB M0259L) y 5 μ l de molécula montada como plantilla en 10 μ l de reacción de ampliación del cebador. La mezcla de reacción se incubó a 95°C durante 2 minutos, 60°C durante 30 segundos y 74°C durante 5 minutos.

Ensayo de unión

El ADN que presenta los péptidos sintetizados fue analizado en un ensayo de desplazamiento por movilidad en electroforesis (EMSA). Una demostración de la unión confirmará la capacidad de sintetizar correctamente un compuesto procedente de módulos transportadores dirigidos por el ADN estructural.

Este ensayo está adaptado de la bibliografía (Halpin y Harbury, PLoS Biol., 2, E174, 2004), 10 μ l del producto de ampliación del cebador de R1 (Leu-encefalina-ADN) o de R2 (Leu-encefalina-ADN mezclados) se colocaron cada uno en 4 tubos. A los tubos R1-1 y R2-1 se añadieron 1 μ l, 0,5 mg/ml de 3E7 anticuerpo monoclonal anti Leu-encefalina (Chemicon, n° de cat. MAB5276), 1 μ l de Tris-HCl 1 M, pH 7,2 y 1 μ l de Triton-X/PBS al 0,1%. A los tubos R1-2 y R2-2 se añadieron 1 μ l (0,5 mg/ml) de anticuerpo monoclonal W6/32 (Sigma, H1650), 1 μ l de Tris-HCl 1 M, pH 7,2 y 1 μ l de Triton-X/PBS al 0,1%. A los tubos R1-3 y R2-3 se añadieron 1 μ l (0,5 mg/ml) de 3E7 y anticuerpo monoclonal anti Leu-encefalina, 1 μ l de Leu-encefalina 20 μ M (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) (Schafer-N, Dinamarca) y 1 μ l de Tris-HCl 1 M, pH 7,2. A los tubos R1-4 y R2-4 se añadieron 1 μ l (0,5 mg/ml) de 3E7 anticuerpo monoclonal anti Leu-encefalina, 1 μ l de Leu-encefalina mezclada 20 μ M (Gly-Leu-Phe-Tyr-Gly) (Schafer-N, Dinamarca) y 1 μ l de Tris-HCl 1 M, pH 7,2. Todas las muestras se incubaron con agitación durante una hora a temperatura ambiente. Se añadieron a cada muestra 1,4 μ l de 10 $\times$ colorante de carga (Invitrogen, n° de cat. 10816-015) y se cargó la cantidad

ES 2 320 361 T3

entera sobre el gel. Se cargó también 1 μ l de ambas escalones de 100 bp y 1 kb (Fermentas nº SM024S y nº SM0318). El gel de PAGE TBE al 10% (Invitrogen) se introdujo frío a 220 mV y 15 mA durante 45 minutos. Se desarrolló el gel durante 20 minutos en tinte de ácido nucleico SYBR verdeTM (Molecular Probes) según las instrucciones de los fabricantes. La fotografía del gel se presenta en la figura 28.

Resultados: en todas las franjas se observan dos bandas destacadas que presentan tamaños aparentes entre 200 y 250 bp. Las bandas contienen lo más probablemente especies que tienen ADN bicatenario (pueden encontrarse pruebas además p. ej. en el Ejemplo 21). La banda superior corresponde bien con el producto completo deseado de 241 bp, mientras que la banda inferior lo más probable es que contenga una especie que pierde el vip029 que dará un producto más pequeño de 30 bp. Dos bandas destacadas con tamaños aparentes de aproximadamente 1.000 bp se observan en todas las franjas. Lo más probable es que las bandas contengan especies con ADN plegado con estructura de estrella: la banda superior lo más probable es que contenga los productos completos, mientras que la banda inferior lo más probable es que contenga moléculas que pierden uno de los dos oligos que contienen sitios de PCR.

En la franja 1 que contiene R1-1 se observa una banda de tamaño aparente de aproximadamente 1500 bp. La mayor parte de esta banda contiene el producto Leu-encefalina-ADN que se une al anticuerpo 3E7 que ralentiza la migración electroforética del complejo completo. Esta banda está ausente cuando el producto R1 se incuba con el anticuerpo de referencia negativa compatible con el isotipo IgG2A como se muestra en la franja 2 (R1-2). La especificidad de la interacción está más reforzada por la competencia del enlace por Leu-encefalina soluble libre: En la franja 3 la banda desplazada en el gel está ausente cuando el producto R1, 3E7 y el péptido Leu-encefalina libre se incuban conjuntamente. La competencia no se aprecia en la banda 4 que contiene R1-4 cuando está presente Leu-encefalina mezclado soluble libre. Las franjas 5, 8 que contienen R2-1, R2-2, R2-3 y R2-4, respectivamente, demuestran que el producto R2 de referencia negativa (Leu-encefalina-ADN mezclado) no se une a 3E7, como era de esperar.

Ampliación

Para demostrar que el ADN de la banda desplazada en el gel y otras bandas son piezas de gel intactas se escindieron y se extrajo el ADN para su utilización como plantillas para PCR.

Se cortaron las piezas de gel encasilladas en la figura 29 y el producto extraído por el procedimiento de “triturar y remojar” (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) en: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory); la pieza de gel se trituró y se remojó durante la noche en 400 μ l de tampón TE. Se centrifugaron los tubos durante 10 minutos a 20.000 $\times$ g y se transfirió el sobrenadante a un tubo reciente. Se llevó a cabo a continuación la PCR [1 $\times$ tampón de polimerasa, dNTP 0,2 mM, MgSO₄ 6 mM, vip027 0,2 μ M, vip028 0,2 μ M, betaína 0,5 M (Sigma, B-0300), 0,1 mg/ml de BSA, 0,08 unidades/ μ l de Vent(exo-)(NEB M0259L)] se realizó a continuación utilizando 5 μ l del sobrenadante diluido 200 veces en 20 μ l de reacción. Se llevaron a cabo 20 ciclos de 30’’ a 95°C, 30’’ a 60°C y 30’’ a 74°C en un termociclador, se analizaron 2 μ l de las muestras en una PAGE al 10% natural (Invitrogen), se tiñeron con SYBR verde (Molecular Probes) según las instrucciones de los fabricantes y se tomó una fotografía. En la figura 29 se presenta el resultado. La franja M contiene el escalón de ADN de 100 bp (Fermentas, SM0248). Las bandas 1-5 contienen las reacciones con las plantillas de gel purificadas: en todas las franjas se observa una banda destacada de aproximadamente 250 bp correspondiente al tamaño esperado del producto completo. En cambio en la franja 6 que contiene la referencia negativa sin plantilla añadida no se observa la banda. Por consiguiente, se demuestra en la presente memoria que puede formarse, dividirse y ampliarse el producto de presentación del ADN estructural.

En conclusión, la unión específica del producto de la R1 al anticuerpo 3E7 anti-Leu-encefalina demuestra en conclusión que el péptido Leu-encefalina ha sido montado correctamente por el proceso. Además, se ha demostrado que la división de un producto que presenta un ligando a partir de un producto que no presenta un ligando realmente es factible. Por ejemplo, tal como se ilustra en la presente memoria simplemente aislando la banda desplazada en el gel. Además, el producto dividido puede ampliarse para la identificación sucesiva mediante p. ej. secuenciado del ADN o utilizarse como plantilla en un proceso de traducción, permitiendo de este modo que se realicen ciclos de selección y ampliación.

Ejemplo 19

Dirección de aminación reductora de la estructura en estrella del ADN

El presente ejemplo sirve para ilustrar que el ADN estructural puede dirigir la aminación reductora. Se seleccionó la aminación reductora como ejemplo de una importante y extensamente aplicable reacción quimiosselectiva.

Se obtuvieron oligos por la tecnología ADN (Århus, Dinamarca). Se acetiló el oligonucleótido vip046 con DST (tartrato de disuccinimidilo, nº 20589 de Pierce) en la amina primaria en una dT interna modificada en el oligonucleótido seguido de escisión oxidativa con NaIO₄ (nº 31.144-8 de Aldrich) para proporcionar el oligo funcionalizado con glioxilato. Se trató el oligonucleótido (2,5 nmoles) con DST (10 mM) en una mezcla al 40% de DMF/agua que contiene tampón de fosfato sódico 400 mM pH 8,8. El volumen de la reacción fue de 100 μ l. Se incubaron las reacciones 2

ES 2 320 361 T3

h. a 25°C. Se añadió a continuación NaIO₄ (50 µl de una solución 150 mM) y se incubaron durante 2 h. más a 25°C. Se diluyó la mezcla de reacción a 200 µl y se purificó en una columna rotativa (Amersham Biosciences nº 27-5325-01) según el protocolo de los fabricantes seguido de purificación por HPLC y análisis de espectrometría de masas según el Ejemplo 11. Rendimiento: 36%.

ADN	Masa calculada	Masa obtenida
Vip046-NHCOCHO	6653,202	6656,1

Síntesis de un oligo con grupos funcionales benzaldehído con dT interna modificada (amina-C6-dT) (posición n = 1) (Vip046-NHCOC₆H₄CHO)

Se aciló el oligonucleótido vip046 con 4-carboxibenzaldehído (nº 8192 de Lancaster) activado por DMT-MM (cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio, nº 74104 de Fluka) por tratamiento del oligonucleótido (2,5 nmoles) disuelto en una mezcla de DMF/agua al 40% que contiene NaCl 150 mM, tampón de fosfato sódico 200 mM, pH 8,8 con DMT-MM 50 mM. El volumen de la reacción total fue de 100 µl. Se incubó la reacción 4 h. a 25°C. Se purificó la mezcla de reacción en una columna rotativa (nº 27-5325-01 de Amersham Biosciences) según el protocolo de los fabricantes seguido por purificación por HPLC y análisis de espectrometría de masas según el Ejemplo 11. Rendimiento: 53%

ADN	Masa calculada	Masa obtenida
Vip046-NHCOC ₆ H ₄ CHO	6729,233	6729,9

Aminación reductora dirigida por ADN estructural

En las reacciones 1 y 5 los dos derivados de vip046 que llevan una amida de ácido glioxílico y ácido 4-formilbenzoico, respectivamente, se mezclaron con cantidades equimolares (10 pmoles de cada uno) de vip017 y vip008 en una solución de tampón que contiene una composición final de ácido morfolinpropansulfónico (nº 69947 de Fluka; MOPS, 100 mM, pH 5,2) y NaCl (nº 71376 de Fluka, 1 M). Se sometieron las soluciones a un programa de hibridación (máquina para PCR: 5 min. @ 94°C, 30 s. @ 80°C, 30 s. @ 65°C, 30 s. @ 50°C, 30 s. @ 35°C, 30 s. @ 20°C, 30 s. @ 10°C). A la mezcla de hibridación se añadió el reductor (NaCNBH₃; nº 156159 de Sigma, solución acuosa 1 M, concentración final de 100 mM; volumen de reacción total 20 µl) y se incubó durante 2 h. a 30°C.

Las referencias corren en paralelo para ambos aldehídos:

- El vip017 fue intercambiado por vip007, que no lleva una amina (reacciones 2+6).
- Se omitió el vip008 con objeto de probar la eficacia del dímero en comparación con el trímero (reacciones 3+7).
- Se intentó reticular vip046-CHO con vip019, permitiendo de este modo la reacción entre oligos, que no puede emparejar bases (reacciones 4+8).

Las ocho mezclas de reacción se diluyeron hasta 50 µl y se precipitó EtOH (0,5 µl de GenElute añadido; Sigma 56575) y EtOH al 96% (grado Biochemika; 250 µl). Se incubaron 15 min. en hielo, a continuación se centrifugaron a 14.000 rpm durante 30 min. a 4°C. Se decantó el sobrenadante, se centrifugaron los tubos brevemente, quedando el líquido removido por la pipeta y se dejó secar el sedimento en una corriente de aire).

Se disolvió ADN en bruto en agua y se analizó por PAGE al 10% desnaturalizante (Invitrogen) y posteriormente se tiñó con SYBR verde (Molecular Probes) según las instrucciones de los fabricantes. En la figura 30 se muestra una fotografía del gel. La formación de una nueva banda con una movilidad correspondiente a 60-70 nt confirma la reticulación esperada de vip046 (21 nt) y vip017 (42 nt) (vías 5 y 9). No se observó ninguna reticulación en los experimentos de referencia con vip007, que es idéntico al vip017 (excepto que está sin una amina de la dT interna) lo que indica una reacción selectiva (vías 6 y 10). Se formó algún producto en el dímero, pero se observaron bandas ligeramente menos intensas (bandas 7+11). No se observó ningún producto para los oligos que no puede emparejar bases lo que indica que se requieren secuencias compatibles para la formación del producto (vías 8+12).

Por consiguiente, el ADN estructural es capaz de dirigir la aminación reductora de una manera muy específica.

ES 2 320 361 T3

Ejemplo 20

Dirección con ADN estructural de la formación de urea

5 El presente ejemplo sirve para ilustrar que el ADN estructural puede dirigir la formación de urea. La formación de urea entre dos aminos se seleccionó como ejemplo de una reacción importante y extensamente aplicable. Las ureas son isoésteres conocidos en la química médica.

10 Se obtuvieron oligos a partir de la tecnología ADN, Århus, Dinamarca.

Se montó una estructura en estrella de ADN constituida por una unión de ADN de tres franjas que comprende dos oligos con grupos funcionales amino y un oligo auxiliar. Se mezclaron los oligos vip046, vip017 y vip008 en cantidades equimolares (10 pmoles de cada uno) en una solución tampón que contenía una composición final de ácido morfolinopropansulfónico (n° 69947 de Fluka; MOPS, 100 mM, pH 8,0) y NaCl (n° 71376 de Fluka, 1 M). Se sometieron las soluciones a un programa de hibridación (máquina de PCR: 5 min. @ 94°C, 30 s. @ 80°C, 30 s. @ 65°C, 30 s. @ 50°C, 30 s. @ 35°C, 30 s. @ 20°C, 30 s. @ 10°C). La mezcla de hibridación eran reactivos que forman urea (carbonato de N,N'-disuccinimidilo, n° 225827 de Aldrich (0,45 M en DMF) o carbonato de bis(4-nitrofenilo), n° 161691 de Aldrich (1,0 M en DMF)) hasta una concentración final de 10, 50 ó 100 mM (volumen total de reacción 20 µl) y se incubó durante 90 min. a 37°C.

20 Una alícuota de cada mezcla de reacción fue analizada por PAGE al 10% desnaturalizante (Invitrogen). Se visualizaron las bandas mediante tinte SYBR verde (n° S7563 de Molecular Probes) según las instrucciones de los fabricantes.

25 En la Figura 31 se presenta una fotografía de la PAGE. La formación de una nueva banda con una movilidad correspondiente a 60-70 nt confirma la reticulación esperada de vip046 (21 nt) y vip017 (42 nt) en las franjas 5-10. Significativamente, se formó una cantidad decreciente de producto con cantidades crecientes de agente de acoplamiento. Esta observación, sin embargo, puede explicarse por las reacciones de las moléculas del reactivo con ambos grupos amino, transformando de este modo ambas aminas en nucleófilos. De este modo, una concentración inferior de reactivo puede permitir que solo una de las aminas forme un carbamato intermedio, que reacciona rápidamente con la otra amina para formar la urea esperada.

35 Por consiguiente, el ADN estructural en estrella es capaz de dirigir la formación de urea.

Ejemplo 21

Electromovilidad de la estructura en estrella del ADN

40 Este ejemplo demuestra la electromovilidad del ADN estructural en geles de poliacrilamida naturales.

El ADN estructural presenta una conformación diferente distinta que el ADN bicatenario. Este último es una molécula lineal alargada, mientras que el ADN estructural tiene una estructura más globular. Por consiguiente, son de esperar diferentes modelos de migración de las dos configuraciones: el ADN estructural presenta un tamaño aparente que excede mucho al de la contrapartida del ADN lineal bicatenario. Para demostrar este fenómeno se realizó el experimento siguiente:

Se formó una estructura en estrella de ADN trimérico con los sitios terminales de cebado por PCR por ligadura de cinco oligos vip029, vip161, vip192, vip193 y vip207. En la Figura 32 se presenta un dibujo esquemático de la organización.

Se mezclaron oligos de ADN (preparados por tecnología de ADN Århus, Dinamarca) en concentraciones de 2 µM cada uno en 1× tampón de ligasa (New England Biolabs), NaCl 50 mM. Se incubaron las mezclas de la manera siguiente: 94µC durante 5 minutos, 80µC durante 30 segundos, 65µC durante 30 segundos, 50µC durante 30 segundos, 35µC durante 30 segundos, 20µC durante 30 segundos, 10µC hasta la etapa siguiente. El procedimiento de hibridación se realizó en una máquina para PCR AB2720 de Applied Biosystems. Los terminales 5' de los oligonucleótidos fueron fosforilados por la polinucleótido T4 ADN cinasa. Una mezcla constituida por estructura en estrella 1,5 µM, 1× tampón ADN ligasa (New England Biolabs), NaCl 50 mM y 0,17 u/µl de polinucleótido T4 ADN cinasa (New England Biolabs, n° de cat. M0201), se preparó y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Se formó un enlace fosfodiéster entre los extremos yuxtapuestos de oligonucleótidos hibridados por T4 ADN ligasa (New England Biolabs, n° de cat. M0202), en 1× tampón de ADN ligasa (New England Biolabs), NaCl 50 mM y 200 U de T4 ADN ligasa (n° de cat. M0202 de New England Biolabs) en un volumen de 10 µl y se incubó durante la noche a 16°C.

Ampliación por PCR

Se utilizaron 0,04 µl de la reacción de ligadura como plantilla en 400 µl de mezcla de reacción para PCR [1 × tampón ThermoPol (B9004S de New England Biolabs), dNTP 0,2 mM (New England Biolabs O447S), MgSO₄ 8

ES 2 320 361 T3

mM, 0,2 μ M de vip202 y vip224, betaína 0,5 M (B0300 de Sigma), 1 U/100 μ l de Vent (exo-) (M0257L de New England Biolabs)]. Se llevó a cabo la ampliación por PCR en 50 μ l de alícuotas utilizando las siguientes condiciones de ciclación: 30 segundos a 92°C y 25 ciclos de 92°C/15 s., 50°C/15 s. y 70°C/30 s.

- 5 Se precipitó la muestra en etanol añadiendo 1 ml de etanol y 1/10° de acetato sódico 3 M (pH 5,2), se incubó 30 minutos en hielo y se centrifugó 30 minutos a 20.000 $\times$ g, se descartó el sobrenadante, se volvió a poner en suspensión el sedimento en 1 $\times$ tampón de carga (Invitrogen), se sometió a PAGE al 10% natural de preparación (Invitrogen) y se tiñó con SYBR verde (S7563 de Molecular Probes) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. En la Figura 32 se presenta una fotografía del gel. La franja M contiene el escalón de ADN de 100 bp (Fermentas, SM0248). Se aislaron
10 dos bandas: la banda de alrededor 250 bp (A) y la banda con un tamaño aparente en exceso de 1.000 bp. Se cortaron las piezas de gel encasilladas en la figura 32 y se extrajo el producto por el procedimiento de “triturar y remojar” (Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989) en: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory); la pieza de gel se trituró y se remojó durante la noche en 400 μ l de un tampón TE. Se centrifugaron los tubos durante 10 minutos a 20.000 $\times$ g y se transfirió el sobrenadante a un tubo reciente y se precipitó en etanol tal
15 como se describió anteriormente y se volvió a poner en suspensión en 100 μ l de agua.

Ampliación del cebador

- Se realizaron a continuación las ampliaciones del cebador utilizando el ADN aislado como plantilla. Se utilizaron
20 2 μ l de plantilla en 20 μ l de reacción que contienen [1 $\times$ tampón Thermopol (B9004S de New England Biolabs), dNTP 0,2 mM (New England Biolabs O447S), MgSO₄ 8 mM, betaína 0,5 M (B0300 de Sigma), 1 U/100 μ l de Vent (exo-) (M0257L de New England Biolabs)]. A las reacciones 1 y 5 no se incluyó ningún cebador, en las reacciones 2 y 6 se incluyeron vip202 0,2 μ M, en la reacción 3 y 7 vip224 0,2 μ M y en las reacciones 4 y 8 se incluyeron vip202 y vip224 0,2 μ M. Se realizaron ampliaciones del cebador incubando las muestras a 95°C durante un minuto, a 50°C durante 15
25 segundos y a 70°C durante 30 segundos. Se analizaron 10 μ l de las reacciones por PAGE al 10% tal como se describió anteriormente.

Exposición y conclusión

- 30 En primer lugar, se realizó la PCR utilizando la estructura en estrella de ADN trimérico con sitios terminales de cebado por PCR como plantilla. En segundo lugar, se sometió la muestra a PAGE de preparación en la que se aislaron dos bandas: una banda (A) con un tamaño aparente de aproximadamente 250 bp (el tamaño esperado del producto de la PCR bicatenario es de 241 bp) y una banda (B) con un tamaño aparente en exceso de 1.000 bp. Por último se utilizó el ADN aislado como plantilla en reacciones de ampliación del cebador y se analizó por PAGE. Como se muestra en
35 la figura 32, ambas plantillas dan lugar a un producto bicatenario con un tamaño de aproximadamente 250 bp, tanto con (las franjas 2 y 6) delanteras como con el cebador trasero (vías 3 y 7). Además, cuando ambos cebadores están presentes se forma más producto (vías 4 y 8). Esto es ilustrativo de que tanto la banda A como la banda B contienen el producto deseado de 241 bp y la diferencia de la movilidad en el gel se debe por consiguiente al plegamiento: A es supuestamente el producto lineal bicatenario, mientras que B es el ADN plegado con estructura en estrella.

- 40 Significativamente, sin ningún cebador presente en la reacción de ampliación del cebador solamente una banda bicatenaria limitada de alrededor 250 bp no se observa incluso cuando el comienzo era ADN bicatenario como se muestra en la franja 1. Esto propiamente es debido a la desnaturalización térmica y al ciclo de renaturalización que ha experimentado la muestra, que conducirá a la formación de un producto mezclado de ADN bicatenario y ADN
45 plegado con estructura en estrella. Se observa el mismo fenómeno en la franja 5 en la que el material de partida es la banda B.

- Por consiguiente, la presente memoria demuestra que la molécula de ADN de 241 nucleótidos de longitud puede plegarse en una configuración (estructura en estrella), que conduce a un tamaño aparente en un gel natural en exceso
50 de 1.000 bp.

Ejemplo 22

- 55 *Traducción de las estructuras en estrella de ADN*

- Este ejemplo demuestra el principio del proceso de traducción de las estructuras en estrella del ADN. En este contexto el proceso de traducción es el proceso en el que los módulos individuales en varias posiciones son sustituidos por módulos recientes y el proceso de sustitución está dirigido por el reconocimiento codón/anticodón. Los módulos
60 recientes pueden tener un reactivo químico acoplado de tal manera que estará situado en el centro o en la proximidad del centro en el propio plegamiento o la nueva estructura en estrella del ADN de la que formarán parte los módulos recientes. Por consiguiente, la traducción permite sintetizar el compuesto químico codificado por la estructura en estrella del ADN.

- 65 El material de partida para el proceso de traducción puede ser un producto de la PCR que utiliza el resultado del proceso de selección como plantilla, por ejemplo, como se muestra en el Ejemplo 18. Esto permitirá ciclos iterativos de selección y ampliación, que a su vez permitirán convertir un banco diverso en soluciones para la presión de selección aplicada.

Esbozo del proceso de traducción

En la Figura 33 se presenta un dibujo esquemático de las etapas principales de un proceso de traducción que utiliza un producto de PCR como material de partida.

En primer lugar, una estructura en estrella de ADN se amplió por PCR utilizando un cebador trasero biotinilado, que permite la separación de las dos cadenas. La separación se realizó utilizando perlas magnéticas de estreptavidina. La cadena de interés (cadena superior) se eluyó de las perlas y se plegó en la estructura de ADN en estrella que tiene dos tallo-bucles y tallo. A continuación, el tallo en la posición 1 (sin un lazo) fue digerido por la enzima de restricción BSA I, que digiere fuera su secuencia de reconocimiento y formó una prolongación en 5'. Esta prolongación fue el codón para la posición 1.

A continuación se ligó a la estructura en estrella un módulo transportador reciente para la posición 1 con una secuencia de anticodón en 5' adecuada. Para ayudar a la ligadura y a la purificación corriente abajo se incluyó un oligo colaborador biotinilado. El oligo colaborador se hibrida al módulo transportador en posición 1 reciente y de tal manera que se crea una prolongación en 5', que fue el anticodón. Por consiguiente, la ligadura posterior (oligo colaborador/estructura en estrella/módulo 1 fue guiada por la hibridación codón/anticodón.

A continuación, el módulo original en la posición 1 fue liberado de la estructura en estrella realizando en primer lugar una etapa de desnaturalización en la que el módulo transportador reciente se reemplazó por el módulo en la posición 1 original en la estructura en estrella y a continuación el digesto de la enzima de restricción se realizó en la secuencia que estaba situada originalmente en el lazo distal en el segundo tallo. Mediante este ejercicio se eliminaron el enlace covalente entre el módulo de la posición 1 original así como el emparejamiento de bases con la estructura en estrella. El digesto de la enzima de restricción fue realizado en una estructura en estrella capturada o perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Por consiguiente, las estructuras en estrella liberadas de las bolas se tradujeron sucesivamente para la posición 1.

Obsérvese que en el plegamiento a la estructura en estrella, el extremo 3' del módulo reciente en posición 1 estaba participando en la formación del segundo tallo y en los extremos del tallo inmediatamente antes del codón en la posición 2. Por consiguiente el extremo 3' del módulo 1 reciente se recubrió para aceptar un módulo transportador reciente para la posición 2 dirigida por interacciones codón/anticodón para la posición 2. Por consiguiente, la estructura estaba lista para la segunda sustitución del módulo dirigida por el codón/anticodón. Por consiguiente, repitiendo el proceso de sustitución descrito para todas las posiciones en la estructura en estrella se lleva a cabo una traducción completa.

Formación de la estructura en estrella

La primera etapa conllevaba la hibridación de cinco oligos: vip206, vip161, vip192, vip193 y vip207. En la Figura 34A se presenta un diagrama esquemático de la organización. Los cinco oligos en la reacción se hibridarán entre sí, formando de este modo una unión de tres franjas, constituida por dos tallo-lazos y un tallo tanto con las secuencias 5' y 3' no hibridada en la terminación distal al centro de la unión de 3 franjas. Las secuencias no hibridadas representan secuencias de cebado para PCR (segmento 5' de vip206 y segmento 3' de vip207). Se mezclaron los oligos en 1 × tampón de ligasa (NEB B0202S), NaCl 50 mM, con 20 pmoles de cada oligonucleótido en un volumen de 10 µl. La hibridación se realizó por incubación en una máquina para PCR durante 5 minutos a 95°C y durante etapas de 30 segundos a las temperaturas siguientes: 80°C, 65°C, 50°C, 45°C, 30°C, 20°C.

A continuación, se fosforilaron los terminales 5' por polinucleótido cinasa; se incluyeron 2,5 unidades de polinucleótido cinasa (NEB M0201) en 15 µl de volumen de reacción, en 1 × tampón de ligasa, NaCl 50 mM. Se incubó la reacción durante 30 minutos a 37°C.

Los oligos hibridados fueron transformados en una cadena de ADN continua por una ADN ligasa, que formó enlaces fosfodiéster entre el extremo 3' yuxtapuesto de vip206 y el extremo 5' de vip161 y entre el extremo 3' yuxtapuesto de vip161 y el extremo 3' de vip192, y entre el extremo 3' de vip192 y el extremo 5' de vip193, y entre el extremo 3' de vip193 y el extremo 5' de vip207, respectivamente. La T4 ADN ligasa (NEB M0202L) se añadió en 1 × tampón de ligasa, NaCl 50 mM y se añadieron 20 unidades/µl de enzima, proporcionando un volumen de reacción final de 20 µl. Se incubó la ligadura durante la noche a 16°C. Se amplió por PCR la estructura en estrella de ADN en un volumen de reacción total de 400 µl, en 1 × tampón Thermopol (NEB M0257L), MgCl₂ 8 mM, dNTP 0,2 mM, betaína 0,5 M (B0300 de Sigma), 1 µg/ml de BSA (B9001S de NEB), cebadores 0,1 µM (vip202 y vip224) y 32 unidades de Vent(exo-) (NEB M257L). Vip224 tiene un resto de biotina en el extremo 5', capaz de capturar el producto de la PCR en perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Se realizó la ampliación con una etapa de desnaturalización inicial durante 30 segundos a 92°C, seguido de 25 ciclos con incubaciones a 92°C durante 10 segundos, a 60°C durante 15 segundos y a 70°C durante 30 segundos. Se realizó una ampliación final a 70°C durante 1 minuto.

Tras la ampliación por PCR, se limpiaron los productos de la PCR utilizando un kit Eppendorf (0032 007.740) según las instrucciones. Se utilizaron dos columnas. La elución se realizó con 150 µl de TE para cada columna. A continuación, el producto de la PCR limpio se añadió a perlas de magnetita recubiertas con estreptavidina (DynaMyOne, 605.02). Se lavaron 100 µl de perlas dos veces en 2 × tampón BWT (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM,

ES 2 320 361 T3

NaCl 2 M, Triton X-100 al 0,1%). Se pusieron en suspensión las perlas en 300 μ l de 2 $\times$ BWT y se añadieron a las perlas 300 μ l de producto de PCR limpio. Se incubaron las perlas durante 15 minutos a t.a., agitando lentamente. Se capturaron las perlas en un imán y se eliminó el sobrenadante. Se lavaron 3 veces las perlas con 1 $\times$ BWT (mitad de concentración de 2 $\times$ BWT). Se eluyó el ADN de la cadena de ADN biotinilada complementaria capturado en las perlas magnéticas añadiendo 50 μ l de NaOH 10 mM y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se capturaron las perlas en el imán, se eliminó el sobrenadante que contenía la cadena de ADN superior y se neutralizó inmediatamente con 20 μ l de Tris-HCl 1 M, pH 7,2.

Se determinó la pureza del ADN eluido mediante reacciones de ampliación del cebador con los cebadores transcrito y complementario en reacción por separado. Se realizaron las reacciones de ampliación del cebador utilizando Vent (exo-) (NEB), en reacciones de 10 μ l, en tampón Thermopol, MgCl₂ 8 mM, dNTP 0,2 mM, betaína 1 M y 0,2 unidades de Vent(exo-) y 0,2 μ l de plantilla y vip202 0,4 μ M o vip203 0,4 μ M por reacción. La reacción de la ampliación del cebador fue como se indica a continuación: 95°C durante 2 minutos, 60°C durante 30 segundos y 74°C durante 5 minutos.

En la figura 34A se presenta un resumen del procedimiento. Todas las muestras del procedimiento se eliminaron para el análisis por PAGE. En la figura 34B se presenta una fotografía del gel. El gel contiene también reacciones de ampliación del cebador para control de la calidad. En la franja 2 se observa una banda del tamaño esperado de 241 bp, que no está presente en la referencia negativa sin plantilla añadida (vía 1). Por consiguiente la estructura en estrella del ADN se ha montado y ampliado con éxito. Además, se observan dos bandas con un tamaño aparente en exceso de 1.000 bp en la franja 2, que representa la estructura en estrella del ADN plegado (para referencia véase el Ejemplo 21). La franja 3 presenta el producto después de la limpieza por PCR.

Se capturó el producto mediante el resto de biotina en la cadena inferior del producto de la PCR. En la franja 4 se muestra el flujo a través. La menor de las dos bandas con un tamaño aparente de 1.000 bp se observó aquí, que consecuentemente no contenía biotina ni se hibridó con la cadena biotinilada. Después del lavado de las perlas, la cadena no biotinilada se eluyó por pH alto que suprimió el emparejamiento de bases. El producto de la elución se presenta en la franja 5. Se observó una sola banda equivalente a la menor de las dos bandas con un tamaño aparente en exceso de 1.000 bp, indicación del aislamiento con éxito de una cadena superior no biotinilada del producto de la PCR. Significativamente, la banda superior de las dos bandas con un tamaño aparente en exceso de 1.000 bp se observó solamente cuando ambas cadenas de la PCR estaban presentes (vías 1 y 2). Por consiguiente la banda superior representa más probablemente dos moléculas hibridadas con estructura de estrella de ADN hibridado mediante los sitios terminales de cebado por PCR.

Como control de calidad del ADN purificado se realizaron dos ampliaciones del cebador. En una reacción, se utilizó el cebador delantero (vip202) y en la segunda reacción se utilizó el cebador trasero (vip203), que ceba las cadenas inferior y superior por PCR, respectivamente. Por consiguiente, si el ADN aislado es puro, solamente la segunda reacción daría lugar a un producto de ampliación del cebador. Por consiguiente, solamente se observó una banda correspondiente al tamaño esperado de 241 bp en la banda 7, mientras que no se observó ningún producto de extensión del cebador en la franja 6. Por consiguiente, se consiguió la purificación con éxito de la cadena deseada del producto de la PCR en una preparación muy pura.

Exposición del codón en la posición 1

La estructura en estrella del ADN contenía dos tallos-lazos en un tallo. El tallo sin lazo contenía el codón para la posición 1. El codón fue expuesto por digestión con enzima de restricción por Bsa I, que corta fuera sus secuencias de reconocimiento y formó una prolongación en 5' de 4 nucleótidos, cuya secuencia puede ser seleccionada sin restricciones, por lo tanto ideal con fines de codificación. En este contexto la prolongación se denomina codón para la posición 1.

El ADN con estructura en estrella se sometió a digestión con Bsa I. El sustrato bicatenario para Bsa I se encontró en el primer tallo (tallo sin lazo) generado por hibridación del segmento en 5' de vip161 y los segmentos en 3' de vip193. Obsérvese que el producto obtenido después de digerir con Bsa I corresponde a la secuencia vip161-vip192-vip193 descrita al principio de este ejemplo.

Se mezclaron 110 μ l de ADN con estructura en estrella purificado con 20 μ l de 10 $\times$ tampón NEB3 y 200 unidades de Bsa I (NEB R0535L) en un volumen total de 200 μ l. Se incubó el digesto a 50°C durante 2,5 horas. Se sometió el ADN a una precipitación con etanol habitual, antes se aplicó a 10% de TBE-gel de urea (Invitrogen) para la purificación del gel.

En la figura 35 se presenta una fotografía del gel después de la tinción con SYBR verde. Se cargó ADN sin cortar en la franja 1 como referencia. Se observa una banda destacada que migra con un tamaño aparente en exceso de 1.000 bp (obsérvese el "rebose" del marcador cargado en la franja M). Se observaron múltiples bandas en las franjas 2 a 7 donde se cargó el digesto Bsa I, indicando de este modo que el digesto de Bsa I no era completo. Sin embargo la banda de interés se escindió del gen (encasillado en la figura) y se extrajo ADN de la pieza de gel por el procedimiento "triturar y remojar", se precipitó en etanol y se volvió a disolver en 40 μ l de H₂O como se describió anteriormente.

Ligadura del módulo de la posición 1 reciente dirigida por la interacción codón/anticodón

El módulo de la posición 1 reciente, vip271 se ligó en la estructura en estrella de ADN digerido con Bsa I y purificado. Se incluyó el vip066 en la reacción de ligadura como una ayuda de ligadura y para introducir una molécula de biotina en el producto de la ligadura, por lo tanto facilitación de la purificación corriente abajo. La hibridación de vip271 y vip066 generará un producto con una prolongación en 5' de 4 nucleótidos (vip271) que en este contexto se denomina anticodón. La secuencia se seleccionó por lo tanto de tal manera que era complemento inverso al codón en la posición 1 en la estructura en estrella del ADN. Por consiguiente la hibridación codón/anticodón es capaz de guiar la ligadura de los dos oligos entrantes con la estructura en estrella del ADN. Se mezclaron vip271 y vip066 en 1 × tampón de ligasa (NEB B0202S), NaCl 50 mM, con 50 pmoles de cada oligonucleótido en un volumen de 10 µl. Se realizó la hibridación en una máquina de PCR utilizando el programa de hibridación descrito anteriormente.

A continuación, se mezclaron vip271/vip066 hibridados con la estructura en estrella del ADN digerido con Bsa I y purificado (30 µl) y los extremos 5' fueron fosforilados por la polinucleótido cinasa; se incluyeron 12,5 unidades de polinucleótido cinasa (NEB M0201) en un volumen de reacción de 50 µl en 1 × tampón de ligasa, NaCl 50 mM. Se incubó la reacción durante 30 minutos a 37°C.

A continuación, los extremos afines de las moléculas se unieron mediante una ADN ligasa, que formó un enlace fosfodiéster entre el extremo 3' yuxtapuesto de vip066 y el extremo 5' del ADN digerido con Bsa I, y entre el extremo 3' yuxtapuesto del extremo 5' de vip271 del ADN digerido con Bsa I. Se añadió T4 ADN ligasa (NEB M0202L) en 1 × tampón de ligasa, NaCl 50 mM y se añadieron 20 unidades/ml de enzima proporcionando un volumen de reacción final de 60 µl. Se incubó la ligadura durante la noche a 16°C.

Sustitución

La etapa siguiente consistió en eliminar el módulo en la posición 1 original de la estructura en estrella. La molécula se plegó permitiendo al módulo de la posición 1 reciente formar parte de la unión de tres franjas y de un enlace covalente entre la posición 1 original y se eliminó la estructura en estrella de ADN. Además, se introdujo un oligo colaborador (vip194), que hibridó en el sitio Pvu II en el lazo original en el extremo distal del 2º tallo (véase la figura 36) formando de este modo un sustrato bicatenario para Pvu II. Por consiguiente, tanto el enlace covalente como el emparejamiento de bases se destruyeron entre el módulo en posición 1 original y la estructura en estrella. Además se introdujo el módulo en posición 1 reciente como parte de la unión de tres franjas.

Se mezclaron 43 µl de la reacción de ligadura con 200 pmoles de vip194 en Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, 0,1% de Triton X-100 en un volumen total de 60 µl. Se llevó a cabo la desnaturalización e hibridación en la máquina para PCR durante 5 minutos a 95°C y durante etapas de 30 segundos a las temperaturas siguientes: 80°C, 65°C, 50°C, 45°C, 30°C y 20°C.

Se capturó a continuación el ADN en perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Dynal). Se lavaron 30 µl de perlas 2 veces en 2 × BWT (NaCl 2 M, Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 0,1%). Tras el lavado final, las perlas se pusieron en suspensión en 60 µl de 2 × BWT, y se añadieron 60 µl de vip194/reacción de hibridación de la estructura en estrella. Se realizó la incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Las perlas con el ADN acoplado a las mismas, fueron capturadas en un imán y posteriormente puestas en suspensión en tampón de digestión Pvu II: 22 µl de agua y 3 µl 10 × tampón de digestión Pvu II se añadió a las perlas y se añadieron 5 µl de Pvu II (10 unidades/µl; Fermentas ER0637). Se incubó el digesto durante 6 h. a 37°C. Después de la digestión, se separaron las perlas del sobrenadante en el imán.

En todo el procedimiento se recuperaron las alícuotas para análisis por TBE al 10%-gel de urea (Invitrogen) teñido con SYBR verde (Molecular Probes) según el protocolo de los fabricantes. En la Figura 36 se presenta una fotografía del gel.

Se cargó la estructura en estrella digerida con Bsa I purificada en la franja 1; se observó una banda destacada del tamaño aparente esperado de aproximadamente 600 nt. Se cargó en la franja 2 el producto de ligadura de la estructura en estrella digerido con Bsa I con módulo reciente para la posición 1/oligo cooperador (vip066). Se observó una banda destacada con un tamaño aparente en el exceso de 1.000 nt, indicando de este modo una ligadura con éxito. Se cargaron en la franja 4 las perlas tras la digestión con Pvu II. Se observó una banda con un tamaño aparente en exceso de 1.000 nt. Esta banda corresponde al ADN no digerido que se observa por comparación con la franja 2. Sin embargo, en el sobrenadante del digesto de Pvu II (vía 5) se observó una banda con un tamaño aparente de aproximadamente 600 nt. Esta banda corresponde al tamaño aparente esperado de aproximadamente 600 nt de un producto de sustitución con éxito. El hecho de que se observase en el sobrenadante demuestra que el módulo reciente en la posición 1 ha sustituido al módulo original en la posición 1 en la estructura en estrella.

Por consiguiente, se ha demostrado la traducción con éxito, es decir la sustitución del módulo dirigida por codón/anticodón.

ES 2 320 361 T3

Listado de los oligonucleotidos utilizados en los ejemplos

	Nombre	Secuencia	Modificación
5	vip006	CTCGTTTTTCGAGACCGACTCTGGAAGTGTACCCGGATCTGG	5'P
	vip007	TTGGAAAAACCAACCAGATCCGGTGACTGTCAAGGCTGAGGT	5'P
	vip008	GAGGGAGAGCCTCACCTCAGCCTTGACTCTTCCAGAGTCGGT	5'P
	vip009	GAGGGAGAGCCTCACCTCAGCCTTGACTGGAGAACGCATTCT	5'P
10	vip010	ACACAAGAAGTGTAGAATGCGTTCTCCTCTTCCAGAGTCGGT	5'P
	vip016	CTCGTTTTTCGAGACCGACTCTGGAAGXGTCACCCGGATCTGG	X=amina-C6-dT
	vip017	TTGGAAAAACCAACCAGATCCGGTGACXGTCAAGGCTGAGGT	X=amina-C6-dT
	vip018	GAGGGAGAGCCTCACCTCAGCCTTGACXCTTCCAGAGTCGGT	X=amina-C6-dT
15	vip019	GAGGGAGAGCCTCACCTCAGCCTTGACXGGAGAACGCATTCT	X=amina-C6-dT
	vp020	ACACAAGAAGTGTAGAATGCGTTCTCCXCTTCCAGAGTCGGT	X=amina-C6-dT
	vp027	ACTATGAGGGCTGTCTGTGG	nada
	vp028	TAGCAAGCCCAATAGGAACC	nada
20	vip029	ACTATGAGGGCTGTCTGTGGCAGTCACGAG	nada
	vip030	AAACTCGTGACTGGGTTCTATTGGGCTTGCTA	5'P
	vip031	TTTTCGAGACCGACTCTGGAAGTGTACCCGGATCTGG	5'P
	vip034	ACTATGAGGGCTGTCTGTGG	5'biotina
25	vip038	TAGCAAGCCCAATAGGAACC	5'biotina
	vip046	ACTCTGGAAGXGTCACCCGGAT	X=amina-C6-dT
	vip048	GAGGGAGAGCCTCACCTCAGCCTTGACACACACXCTTCCAGA	5'P, X= amina-C6-dT
		GTCGGT	
30		CTCGTTTTTCGAGACCGACTCTGGAAGAGTGTTGTACCCGGA	
	vip056	TCTGG	
	vip068	CAGCCTTGACXCTTCCAGAGT	X=amina-C6-dT
	vip070	CTCTCTCGTGACTGGGTTCTATTGGGCTTGCTA	
35	vip076	ACTCTGGAAGXGTCACCCGGATCTGG	X=amina-C6-dT
		GAGGGAGAGCCTCACCTCAGCCTTGACTCTTCCAGAGTGGTT	
	vip078	CCTATTGGGCTTGCTA	
40	vip132	TTGGAAAAACCAACCAGATCCGGTGACTGTGTGTGTCAAGG	
		CTGAGGT	
	vip133	GAGGGAGAGCCTCACCTCAGCCTTGACACACACTCTTCCAG	
		AGTCGGTCTCG	
45	vip161	AGAGCGAGACCGACTCTGGAAGTGTACCCGGATCT	
	vip162	GGTTGGCAGGGCCCACTAGCTCAGGATCCACCCAACCAGATCC	
		GGTGACTGTGTGTGTCAAGGCTGAG	
	vip163	GTGAGGCTGAATTCTCTGTACCTGGTACCTCCCTCACCTCA	
50		GCCTTGACACACACTCTTCCAGAGTCGGTCTCG	
	vip164	GTGGGCCCTG	
	vip165	GTGGATCCTG	

55

60

65

ES 2 320 361 T3

(Continuación)

5	vip192	GGTTGGCACAGCTGACTAGCTCAGAGCTCACCCAACCAGAT CCGGTGACTGTGTGTGTCAAGGCTGAG	
	vip193	GTGAGGCTCCCGGGTCTGTACCTATTAATTCCTCACCTCAG CCTTGACACACACTCTCCAGAGTCGGTCTCG	
10	vip194	GTCAGCTGTG	
	vip195	GTGAGCTCTG	
	vip066	XCTTCCAGAGTCGGTCTCG	X=5' bio
	vip088	XCAGCCTTGACTCTTCCAGAGT	X= 5' bio
15	vip202	CAGGTCGCTGAGAGGTTGAC	
	vip203	ACGTCCGAGTCAGAAGTGTG	
	vip206	CAGGTCGCTGAGAGGTTGACCAGTCACGAG	
	vip207	CTCTcTCGTGACTGCACACTTCTGACTCGGACGT	
20	vip224	XACGTCCGAGTCAGAAGTGTG	X= 5' bio
	vip231	AGAGCGAGACCGACTCTGGAAGXGTCACCGGATCT	X=NH2-C6-dT
	vip238	TTTTCGAGACCGACTCTGGAAGXGTCACCGGATCT	X=NH2-C6-dT
	vip262	GGTTGGCACAGCTGACTAGCTCAGAGCTCACCCAACCAGAT- CCGGTGACTGTGTGXGTCAAGGCTGAG	X=NH2-C6-dT
25	vip263	GTGAGGCTCCCGGGTCTGTACCTATTAATTCCTCACCTCAG- CCTTGACACACACXCTTCCAGAGTCGGTCTCG	X=NH2-C6-dT
30	vip269	GGTTGGCACAGCTGACAAAAACAGAGCTCACCCAACCAGAT- CCGGTGACTGTGTGXGTCAAGGCTGAG	X=NH2-C6-dT
	vip270	GTGAGGCTCCCGGGTCGAGAGCTATTAATTCCTCACCTCAGC- CTTGACACACACXCTTCCAGAGTCGGTCTCG	X=NH2-C6-dT
35	vip271	CTCTCGAGACCGACTCTGGAAGXGTCACCGGATCTGGTTGGGT- GAGCTCTG	X=NH2-C6-dT
40			
45			
50			
55			
60			
65			

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un ácido nucleico y un compuesto químico, formando dicha composición una estructura en estrella definida por 3 o más tallos que se extienden a partir de un centro de reacción, en el que por lo menos un tallo se extiende radialmente desde el centro, comprendiendo cada tallo un dúplex de ácido nucleico, y estando situado el compuesto químico en el centro de la reacción, estando asociado el compuesto químico por lo menos a un ácido nucleico.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que 3 ó más tallos se extienden radialmente hacia afuera desde el centro de la reacción.
3. Composición según las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el ácido nucleico comprende uno o más codones que identifican uno o más grupos químicos, que han participado en la formación del compuesto químico formado.
4. Composición según la reivindicación 3, en la que un codón está situado en el extremo de un tallo.
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que se forma un lazo en el extremo del tallo.
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que un codón está situado en la parte de emparejamiento sin bases de la estructura tallo-lazo.
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que un sitio de restricción enzimática está presente en la estructura tallo-lazo.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el lazo es capaz de hibridarse a un oligonucleótido cooperador, formando de este modo un sustrato para una enzima de restricción.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que un lazo está presente en todos los extremos de los tallos excepto en uno, para formar una secuencia contigua de ácido nucleico.
10. Composición según cualquier de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la secuencia contigua de ácido nucleico es enzimáticamente extensible.
11. Composición según la reivindicación 10, en la que el ácido nucleico comprende un sitio de cebado para una ADN polimerasa, una ARN polimerasa o una transcriptasa inversa.
12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en la que el sitio de cebado está presente en el tallo que no tiene un lazo.
13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que un tallo comprende dos segmentos de hibridación que tienen por lo menos el 80% de complementariedad y cada segmento de hibridación comprende 12 o más nucleótidos.
14. Composición según la reivindicación 13, en la que cada segmento de hibridación comprende 18 ó más nucleótidos.
15. Composición según la reivindicación 1, en la que el compuesto químico está unido por enlace covalente al ácido nucleico.
16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que los grupos químicos antes de la reacción están unidos por enlace covalente al ácido nucleico.
17. Composición según la reivindicación 16, en la que uno o más de los enlaces covalentes se escinde simultáneamente o después de la reacción.
18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la que todos excepto uno de los enlaces covalentes se escinden simultáneamente o después de la reacción.
19. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en la que el compuesto químico se forma por reacción de los grupos químicos unidos al ácido nucleico y opcionalmente uno o más reactivos adicionales.
20. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en la que uno o más reactivos son reactivos libres no asociados al ácido nucleico.
21. Banco de composiciones que comprende muchas composiciones diferentes según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.

ES 2 320 361 T3

22. Procedimiento para crear una o más estructuras químicas que comprenden las etapas siguientes:

(i) proporcionar N (N = 3-100) módulos transportadores que comprenden:

(1) un módulo transportador en primera posición con

i) un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar a un segmento de ácido nucleico del módulo transportador de la posición N, y

ii) un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar a un segmento de un segundo módulo transportador en segunda posición,

(2) módulo(s) transportador(es) en posición n (n = de 2 a N-1) con un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar dicho segmento de ácidos nucleicos de n-1 módulos transportadores y un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar un segmento del n+1 módulo transportador, y

(3) un módulo transportador en la posición N con un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar dicho segmento de ácido nucleico de dicho módulo transportador de N-1, y un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar a un segmento de dicho primer módulo transportador, en el que

por lo menos tres de dichos módulos transportadores comprenden un grupo químico asociado (CG) situado en la sección media entre los segmentos de hibridación o en la proximidad de los mismos y opcionalmente un segmento de codón situado externo a uno de los segmentos de hibridación;

(ii) poner en contacto dichos módulos transportadores en condiciones que permiten la hibridación de dichos segmentos de hibridación, colocando de este modo dichos grupos químicos en proximidad, estando asociado el compuesto químico formado con por lo menos uno de dichos módulos transportadores.

23. Procedimiento según la reivindicación 22, que comprende asimismo la etapa que proporciona las condiciones que permiten la ligadura de los terminales del módulo n-1 al módulo N y del módulo N-1 al módulo N, formando de este modo una molécula continua de ácido nucleico, con estructuras tallo-lazo y un compuesto químico asociado.

24. Procedimiento según la reivindicación 22 ó 23, en el que el compuesto químico formado está asociado por enlace covalente con por lo menos una de dichas moléculas portadoras o con la molécula continua de ácido nucleico.

25. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, que comprende poner en contacto los módulos transportadores en condiciones que permitan la hibridación de segmentos de hibridación, colocando de este modo grupos reactivos en la proximidad del reactivo; y

proporcionando condiciones que permitan la reacción de grupos reactivos, estando asociado el compuesto químico formado por lo menos a un módulo transportador; y condiciones que permitan la ligadura de los terminales del módulo n-1 al módulo n y del módulo N-1 al módulo N y formando de este modo la molécula continua de ácido nucleico con estructuras tallo-lazo y un compuesto químico asociado.

26. Procedimiento según la reivindicación 22, en el que la puesta en contacto de los módulos transportadores se realiza secuencial o simultáneamente.

27. Procedimiento según las reivindicaciones 22 y 26, en el que las reacciones químicas se realizan secuencial o simultáneamente y/o en el que dichas ligaduras se realizan por vía enzimática o química; y secuencial o simultáneamente.

28. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 27, que comprende asimismo un sitio de cebado para una secuencia de ADN polimerasa, ARN polimerasa o de transcriptasa inversa por lo menos en el primer módulo transportador y/o en el N módulo transportador.

29. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 28, que comprende la etapa adicional de realizar una reacción enzimática de ampliación para presentar el compuesto químico formado.

30. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 29, en el que N es 3, 4, 5, 6 ó 7 y en particular en el que cada uno de los módulos transportadores comprende un grupo químico (CG) asociado situado en la sección media entre los segmentos de hibridación o en la proximidad de los mismos y un segmento del codón externo situado en uno de los segmentos de hibridación.

31. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 30, en el que se sintetiza un banco de más de un compuesto con un repertorio de módulos transportadores en una o más posiciones.

32. Procedimiento según la reivindicación 31, en el que el repertorio comprende en una posición por lo menos 10 módulos transportadores diferentes.

ES 2 320 361 T3

33. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 31 ó 32, en el que el repertorio comprende en dos posiciones por lo menos 10 módulos transportadores diferentes.

34. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en el que la sección media comprende un enlace químico o 1 a 20 nucleótidos.

35. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el grupo químico está asociado a una nucleobase de la sección media.

36. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 34, en el que el grupo químico está asociado a un enlace fosfodiéster de la sección media.

37. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 36, en el que el grupo químico está asociado a la sección media mediante uno o más enlaces covalentes.

38. Procedimiento para realizar la sustitución del módulo que comprende las etapas siguientes:

a) proporcionar una secuencia de ácido nucleico contigua monocaténaria que comprende N ($N = 3$ o más) segmentos de hibridación y segmentos de hibridación complementarios así como N-1 segmentos no hibridadores entre los segmentos de hibridación y los segmentos de hibridación complementarios,

b) hibridar el ácido nucleico en condiciones que favorecen la hibridación intramolecular, formando de este modo un ácido nucleico continuo, que contiene por lo menos N-1 tallo-lazos y un tallo;

c) introducir una rotura en dicho tallo o lazo creando de este modo una prolongación que contiene por lo menos un segmento de codón;

d) proporcionar un primer grupo de módulos transportadores que presenta por lo menos:

un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar a dicho tallo, un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar al tallo de un tallo-lazo adyacente, opcionalmente un grupo reactivo asociado y un segmento anticodón;

d) proporcionar condiciones que permitan la hibridación de los segmentos de codón y anticodón; y

e) proporcionar las condiciones que permitan la ligadura enzimática o química de dicho módulo transportador hibridado a los terminales recesivos de dicha prolongación; y llevar a cabo las etapas siguientes:

i) digerir con una enzima de restricción el tallo o lazo del tallo-lazo adyacente a dicha secuencia del codón haciendo de este modo prolongaciones que contienen por lo menos un segmento del codón próximo; y

ii) desnaturalizar los ácidos nucleicos; e

iii) hibridar en condiciones que favorecen la hibridación intramolecular formando de este modo N-1 tallo-lazos y un tallo con prolongación por lo menos que contiene dicho segmento de codón próximo; y

iv) proporcionar opcionalmente las condiciones que permitan la reacción de dichos grupos reactivos, estando asociado el compuesto químico formado con por lo menos uno de dicho módulo transportador; y

v) proporcionar un grupo próximo de módulos transportadores que tienen por lo menos:

un segmento de ácido nucleico capaz de hibridar dicho tallo, y un segmento de ácido nucleico capaz de hibridarse con el tallo del tallo-lazo adyacente, y opcionalmente con un grupo reactivo asociado, y con un segmento anticodón; y

vi) proporcionar las condiciones que permiten la ligadura enzimática o química del módulo transportador hibridado a los terminales recesivos de dicha prolongación; y repetir las etapas i) a la vi) N-1 veces; y

f) introducir una rotura en dicha estructura tallo-lazo que constituye parte de dicho primer grupo de módulos transportadores que tienen por lo menos dicho segmento anti-codón conectado a dicho primer módulo transportador; y

g) desnaturalizar los ácidos nucleicos; e

h) hibridar en condiciones que favorezcan la hibridación molecular formando de este modo N-1 tallo-lazos y un tallo; y

i) opcionalmente, proporcionar las condiciones que permitan la reacción de dichos grupos reactivos, estando asociados los compuestos químicos formados a por lo menos dicho módulo transportador.

39. Procedimiento según la reivindicación 38, en el que la secuencia de ácido nucleico contigua de la etapa a) se puede obtener por un procedimiento según las reivindicaciones 22 a 37, pero sin incluir los grupos químicos (banco de prueba).

40. Procedimiento según la reivindicación 38, en el que la secuencia de ácido nucleico contiguo de la etapa a) se puede obtener por un procedimiento según la reivindicación 29.

41. Procedimiento según la reivindicación 40, en el que el producto de ampliación según la reivindicación 29 se amplía mediante PCR.

42. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 38 a 41, en el que la secuencia de ácido nucleico contigua en la etapa a), b) o c) se obtiene inmovilizando la cadena transcrita del producto de PCR sobre un soporte sólido, aislando el soporte sólido, permitiendo a la cadena transcrita autohibridarse con el fin de formar la estructura en estrella, y, opcionalmente, rompiendo el tallo que une la estructura en estrella autohibridada con el soporte sólido, liberando de este modo la estructura en estrella del soporte sólido.

43. Procedimiento según la reivindicación 42, en el que la autohibridación se realiza por enfriamiento instantáneo.

44. Procedimiento según la reivindicación 42 ó 43, en el que la rotura del tallo que une el soporte sólido y la estructura en estrella repliegada se lleva a cabo con una enzima de restricción.

45. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 38 a 44, que comprende asimismo la etapa de añadir un oligonucleótido cooperador complementario a una secuencia de un lazo, antes de la etapa de digestión, para crear un sustrato doble destinado a la enzima de restricción en el lazo.

46. Composición que comprende una estructura de ácido nucleico y un compuesto químico asociado o un banco de más de una de dichas estructuras que puede obtenerse por un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 37, formando dicha composición una estructura en estrella definida por 3 o más tallos que se extienden a partir de un centro de reacción, en el que por lo menos un tallo se extiende radialmente desde el centro, comprendiendo cada tallo un dúplex de ácido nucleico, y estando situado el compuesto químico en el centro de la reacción, estando asociado el compuesto químico por lo menos con un ácido nucleico.

47. Procedimiento para cribar un banco de más de un compuesto químico preparado tal como se da a conocer en la reivindicación 29, que comprende las etapas siguientes:

sondar el banco para los miembros del banco que tienen un compuesto químico de la propiedad deseada;

dividir los miembros del banco que tienen la propiedad deseada de los miembros del banco que no tienen la propiedad deseada; y

obtener de este modo un grupo enriquecido de miembros del banco con la propiedad deseada.

48. Procedimiento según la reivindicación 47, en el que el procedimiento comprende asimismo ampliar el ácido nucleico de los miembros de la mezcla enriquecida, indicando dicho ácido nucleico del historial de las reacciones químicas.

49. Procedimiento según la reivindicación 38, que comprende asimismo el reensamblado de los compuestos químicos por los miembros del banco enriquecido según las reivindicaciones 47 ó 48.

50. Procedimiento según la reivindicación 38, en el que las roturas en los tallos o lazos son introducidas por enzimas de restricción, RNasa, endonucleasa III, endonucleasa VIII, APE1, Fpg, por escisión química o fotoescisión.

51. Procedimiento según la reivindicación 49 ó 50, que comprende además que las reacciones químicas se realizan sucesiva o simultáneamente.

52. Procedimiento según la reivindicación 49 a 51, que comprende asimismo un sitio de cebado para una ADN polimerasa, una ARN polimerasa o una transcriptasa inversa por lo menos en el primer módulo transportador o en el N módulo transportador.

53. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 38 a 52, en el que las secuencias de la etapa a) incluyen secuencias de ácido nucleico preparadas mediante las etapas siguientes:

ES 2 320 361 T3

digerir las estructuras de ácido nucleico intramolecular hibridadas procedentes de un banco enriquecido con dos enzimas de restricción consecutivas, que eliminan los enlaces covalente entre el módulo en cuestión y la estructura restante,

5 desnaturalizar las estructuras digeridas,

 permitir la rehibridación de los fragmentos de ácido nucleico de las estructuras digeridas, permitiendo de este modo el intercambio de una fracción de ácido nucleico especificando el módulo en cuestión para obtener apareamiento, y

10 ligar los terminales apropiados.

54. Procedimiento según la reivindicación 53, en el que los fragmentos de ácido nucleico que representan módulos transportadores, no presentes en la formación del banco de la primera generación se añaden antes de permitir la rehibridación.

15 55. Procedimiento según la reivindicación 53, en el que se añade un repertorio de módulos transportadores no utilizados en la formación del primer banco de la generación antes de permitir la rehibridación.

20 56. Procedimiento según la reivindicación 53, en el que un banco enriquecido se somete a las etapas según la reivindicación 53 y el resultado emparejado se mezcla con la parte restante del banco enriquecido.

25

30

35

40

45

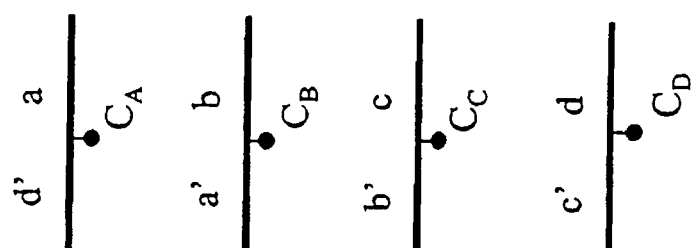
50

55

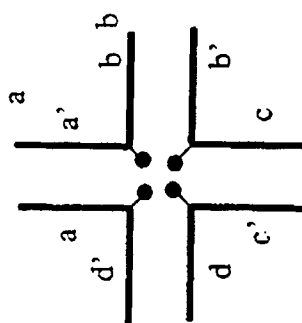
60

65

Figura 1a



hibridación



reacción química

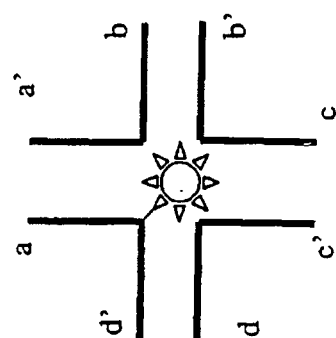


Figura 1b

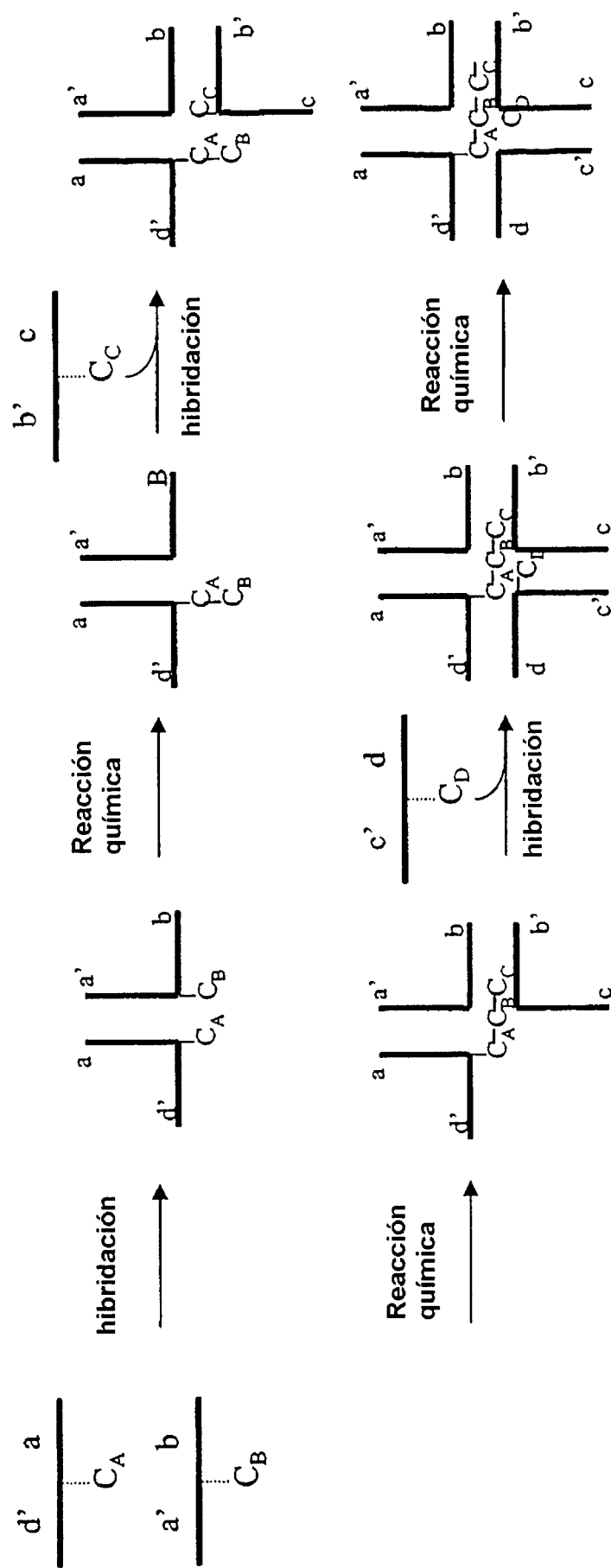
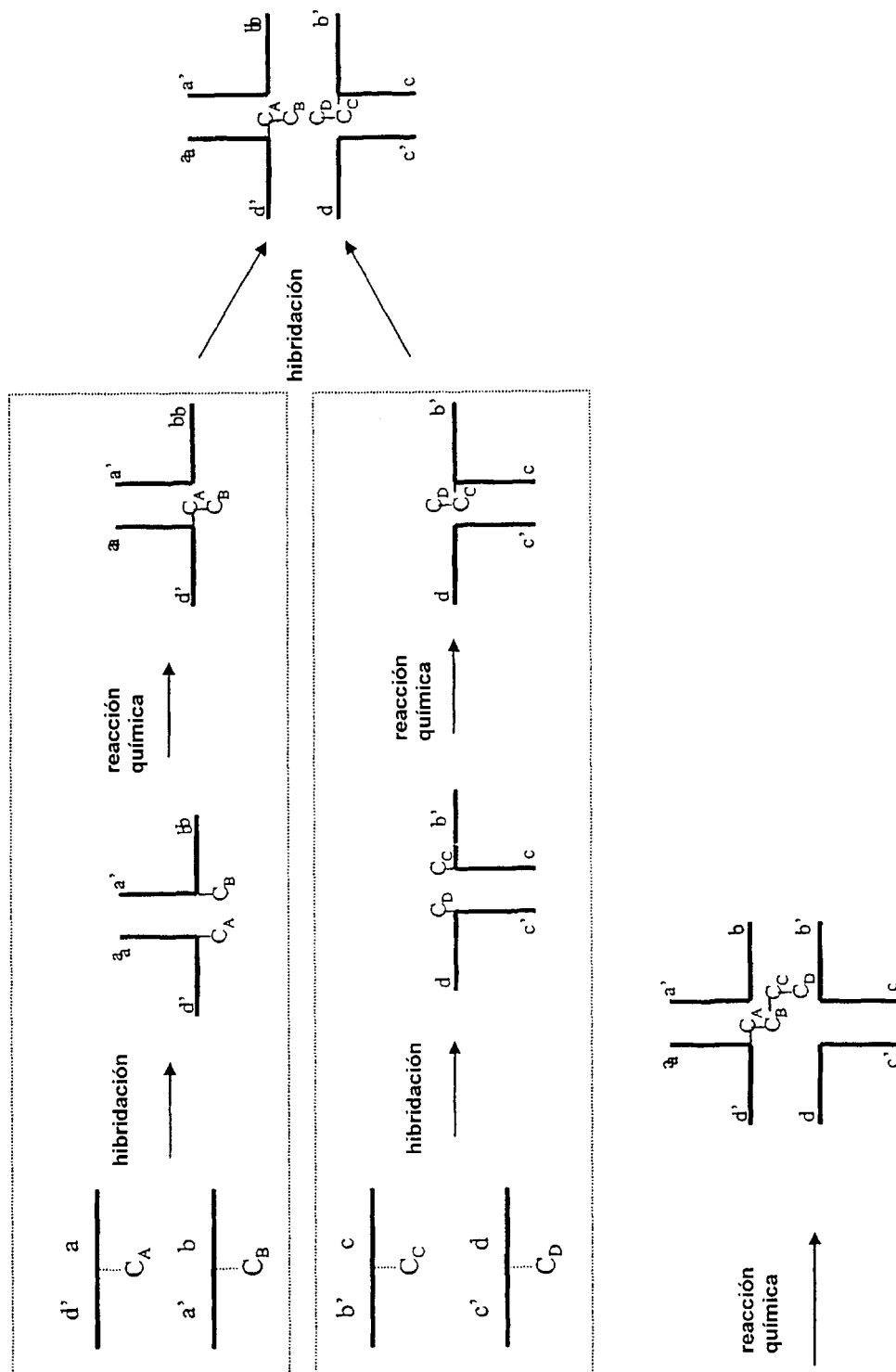


Figura 1c



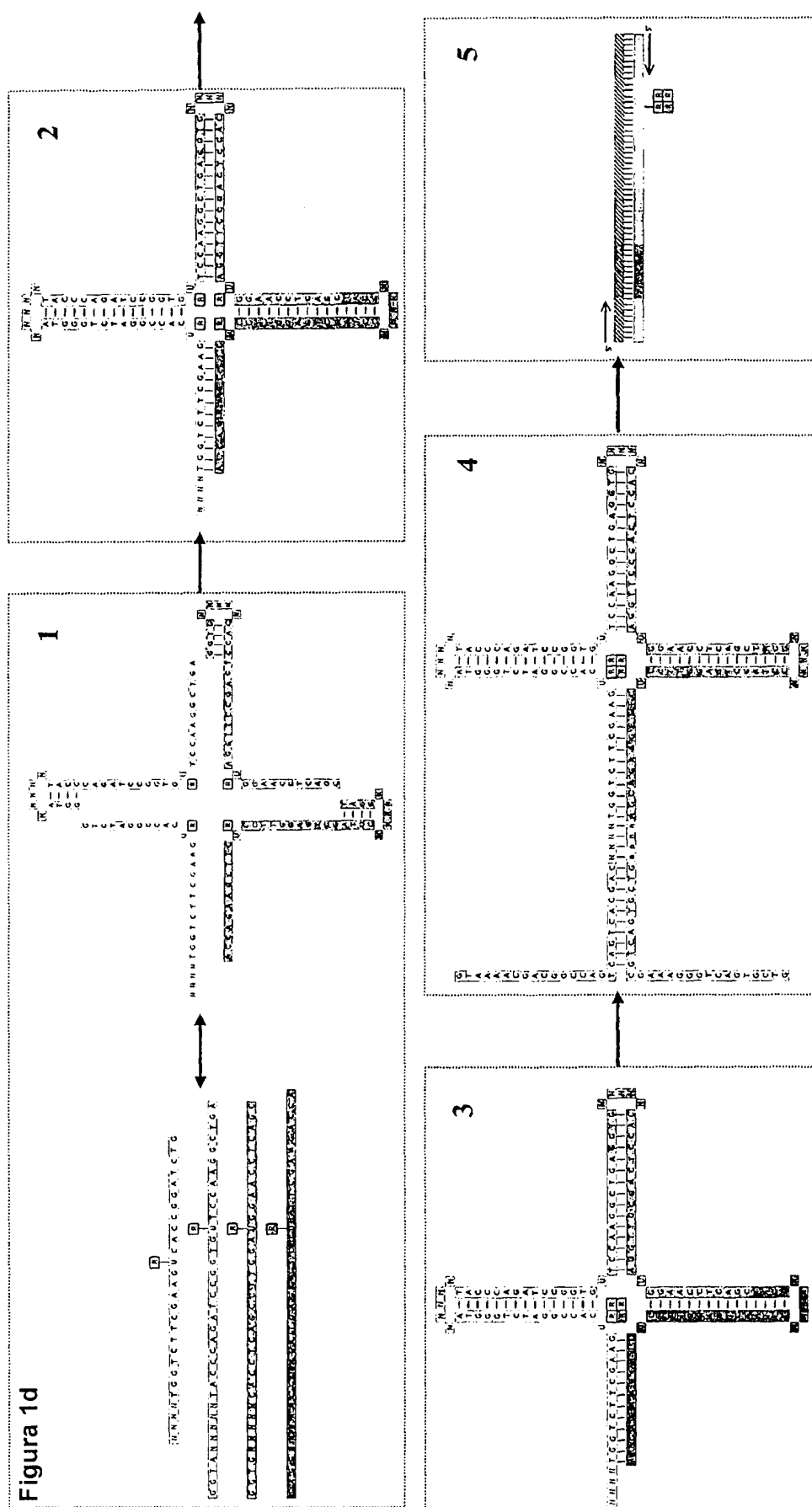


Figura 1e

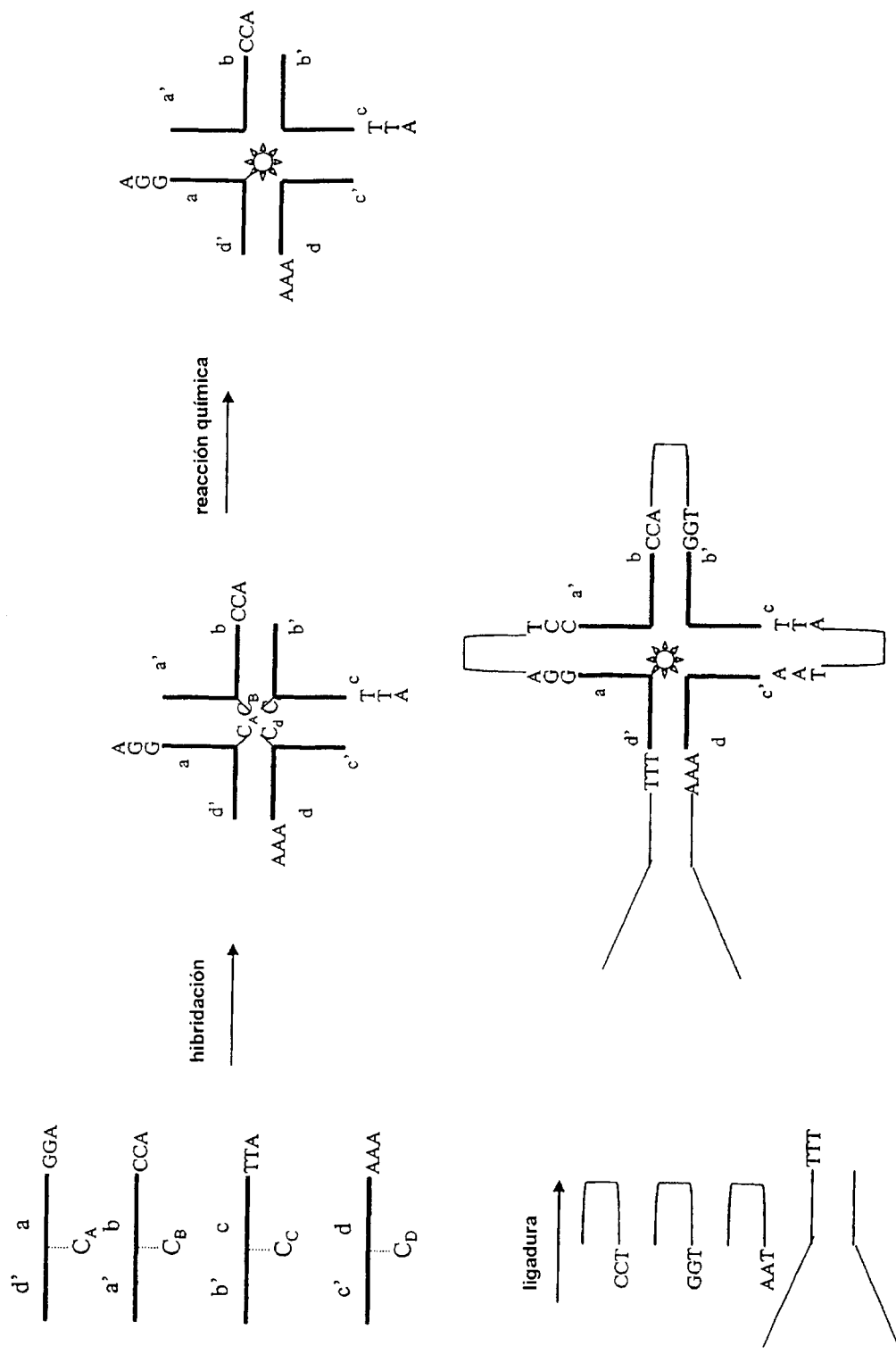


Figura 2a

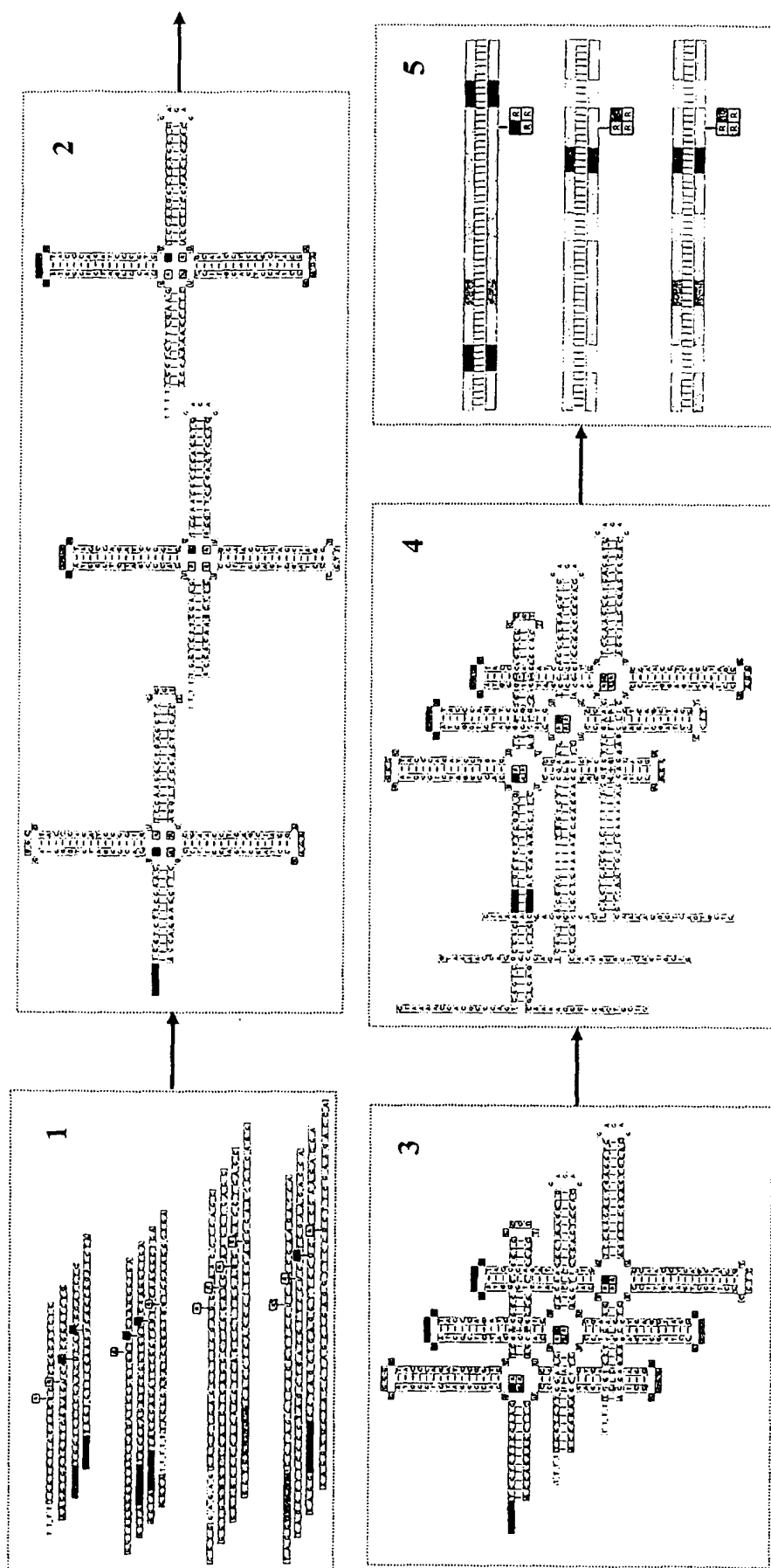
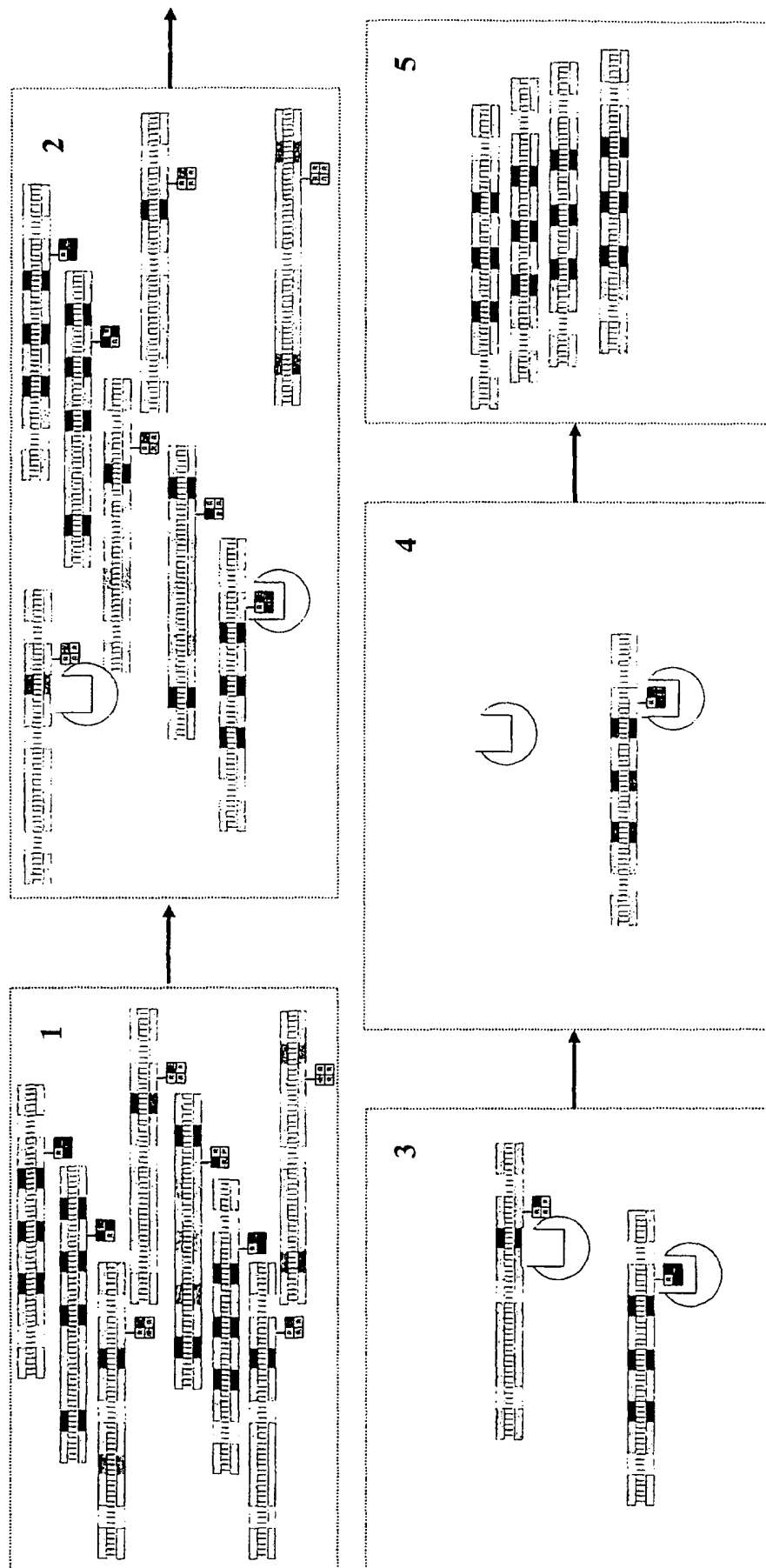


Figura 3



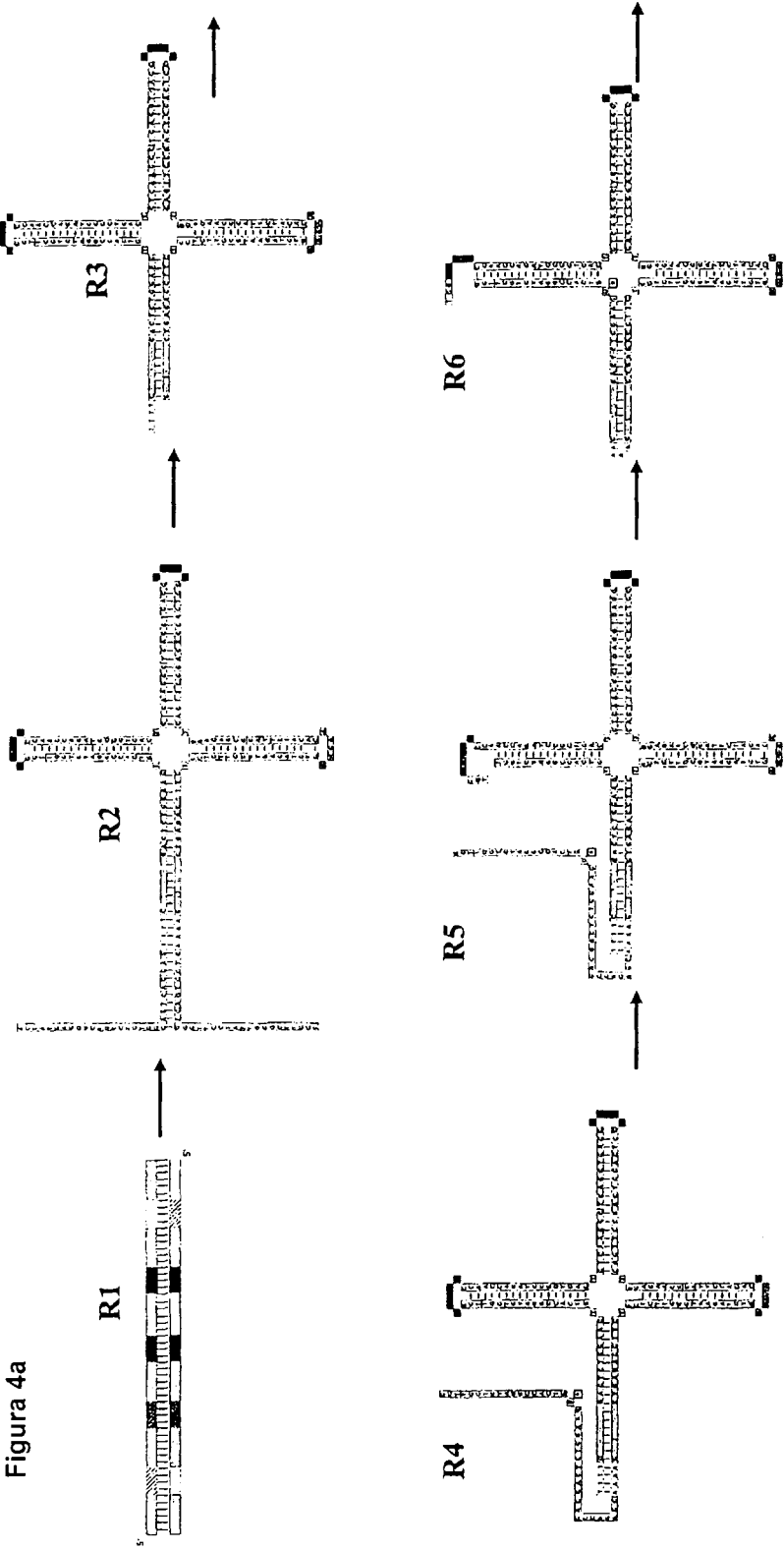


Figura 4a

- R1** Producto de PCR.

R2 Separación de la cadena – cadena superior

R3 Digerir tallo izquierdo con Bsa I.
- R4** Ligar el oligo en posición 1 guiado por codón/anticodón

R5 Digerir tallo superior con N. Alw I.

R6 Desnaturalización/renaturalización.

Figura 4a, continuación

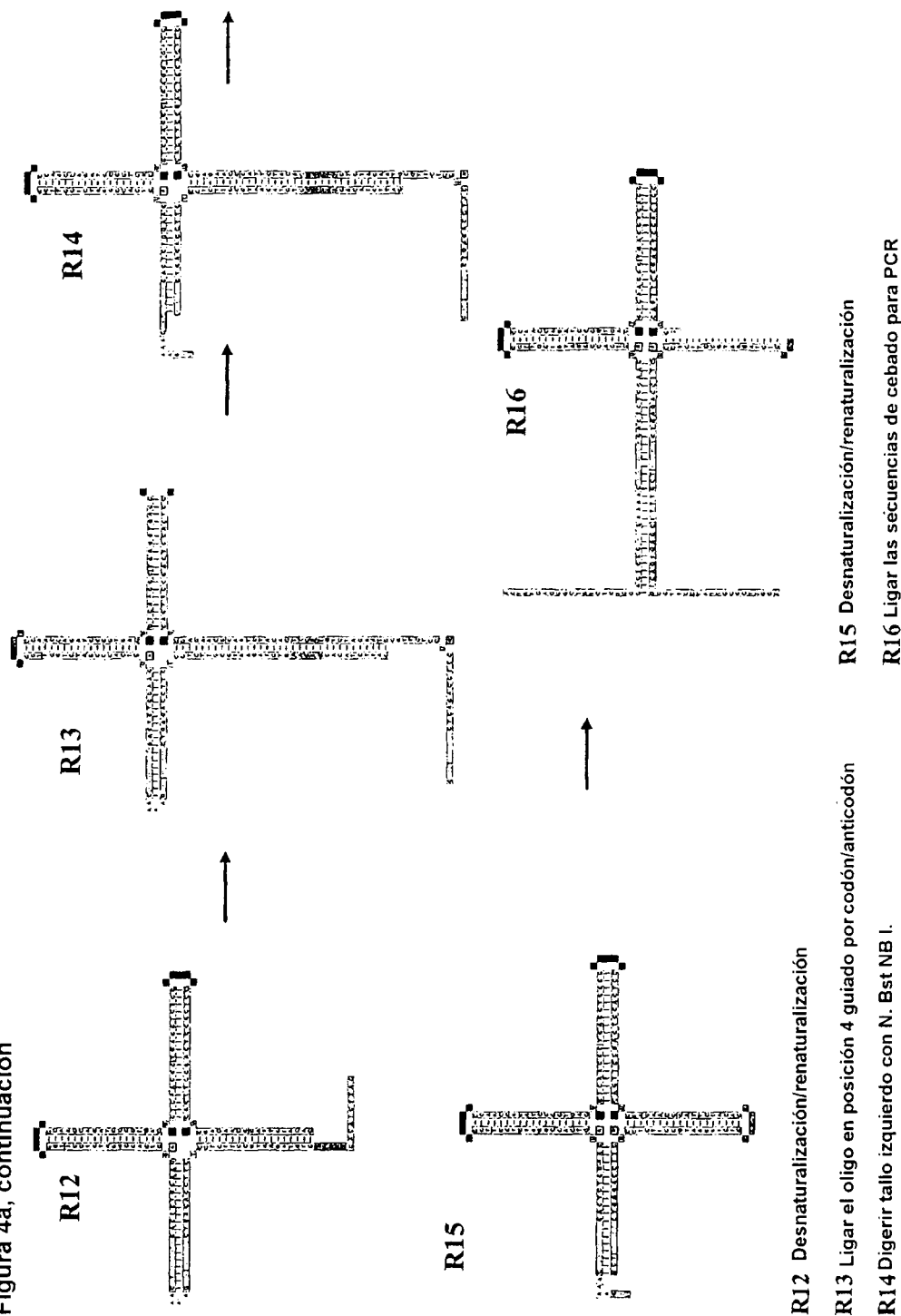
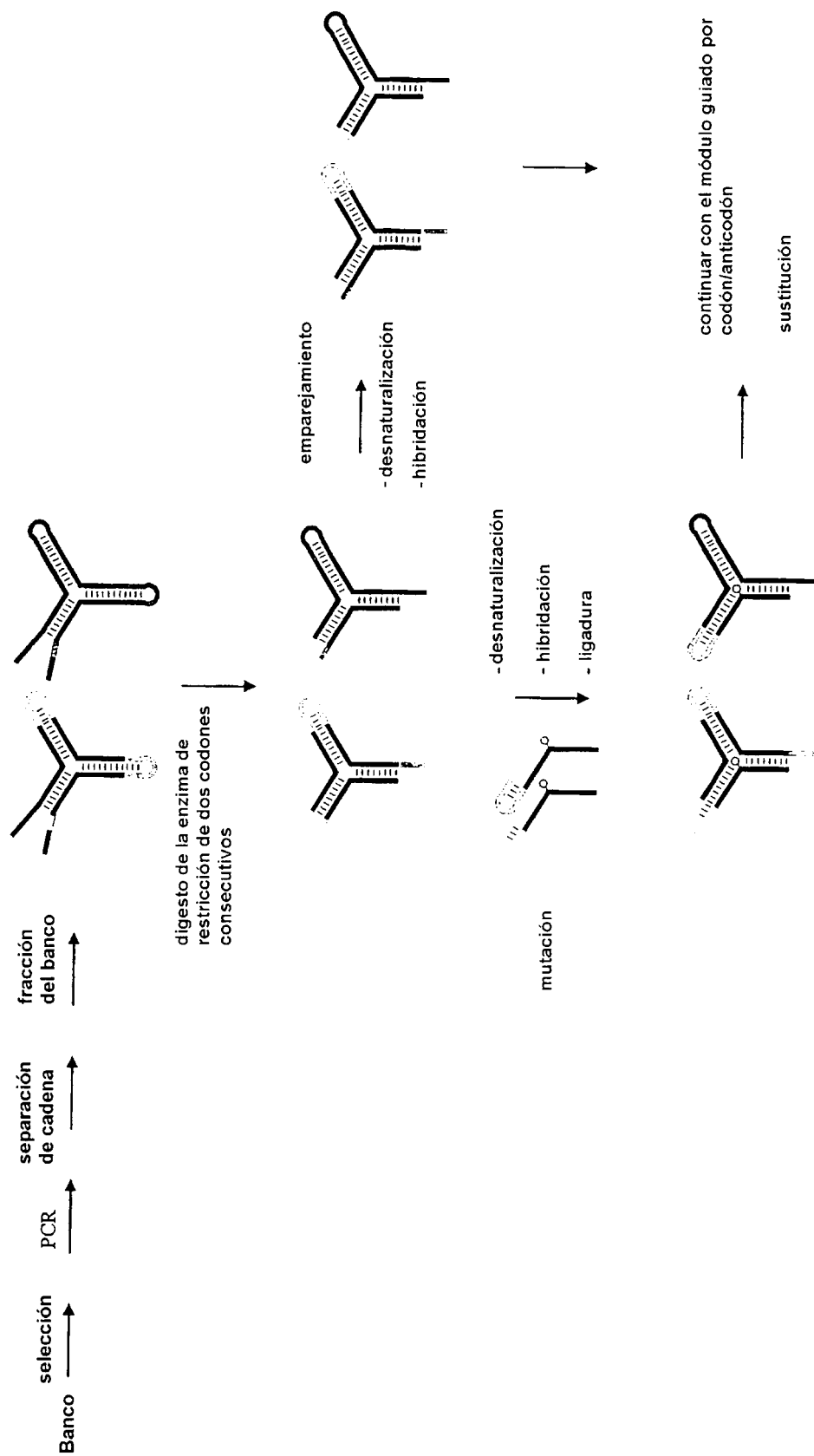
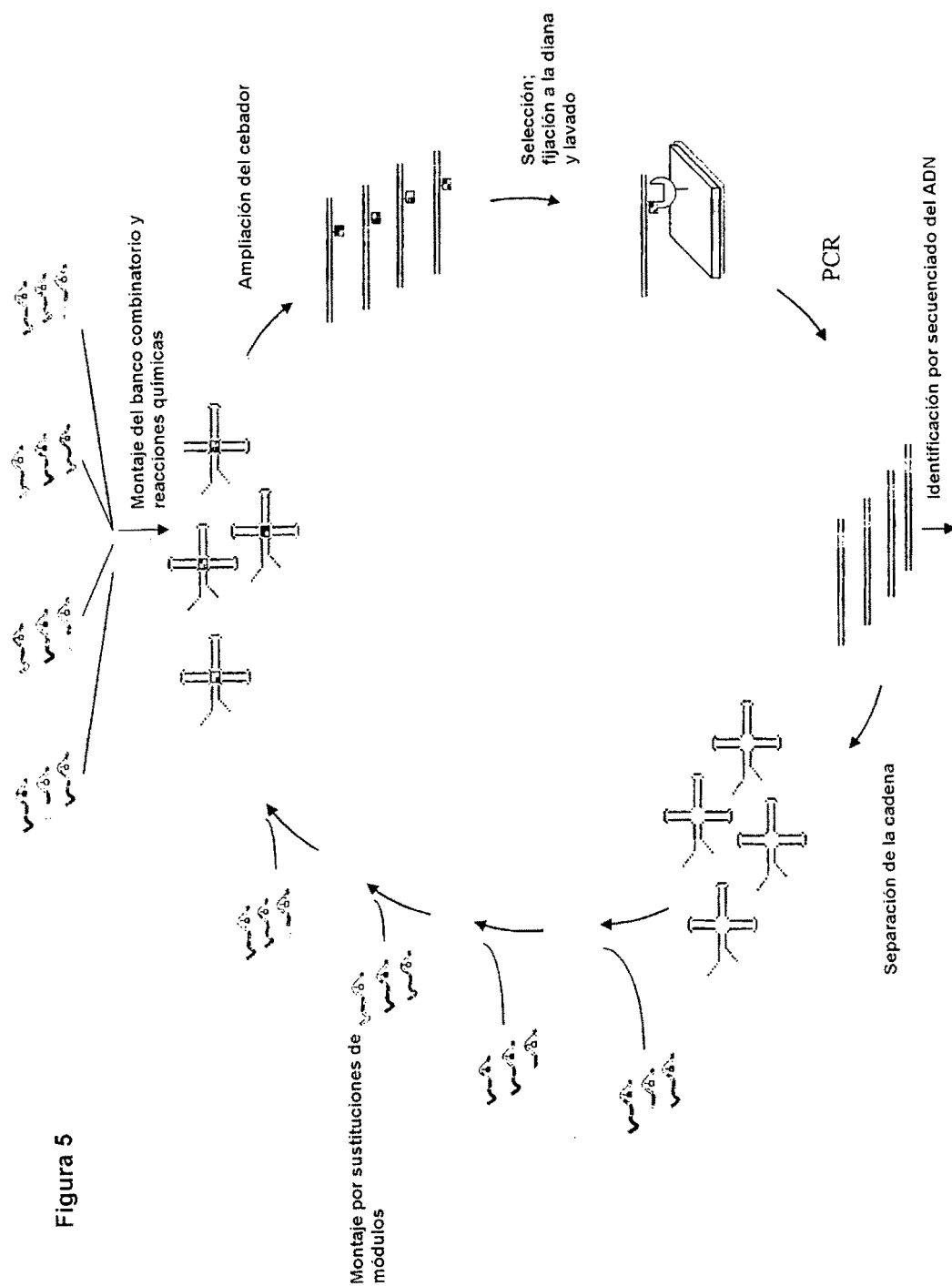


Figura 4b





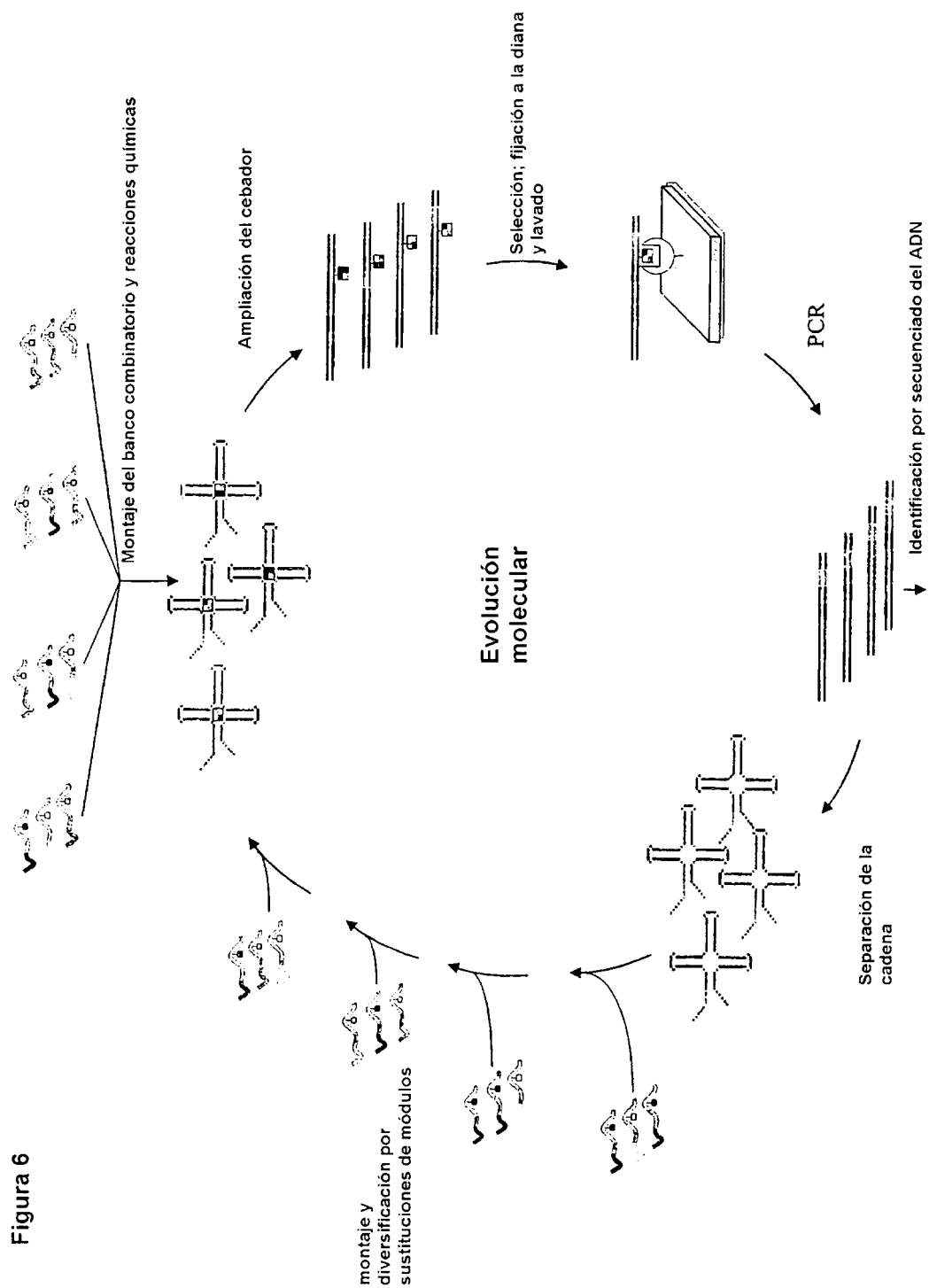


Figura 7

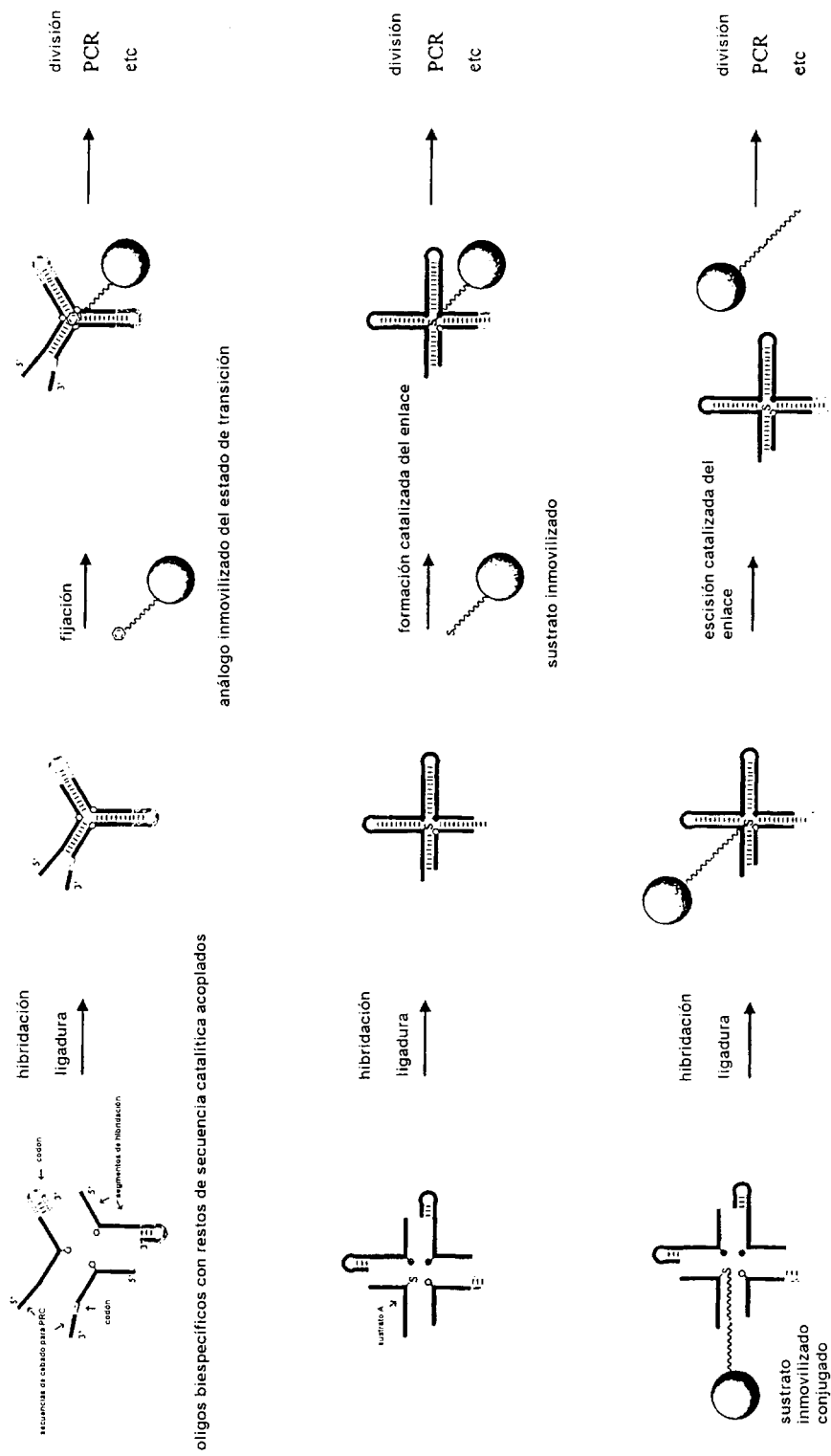


Figura 8

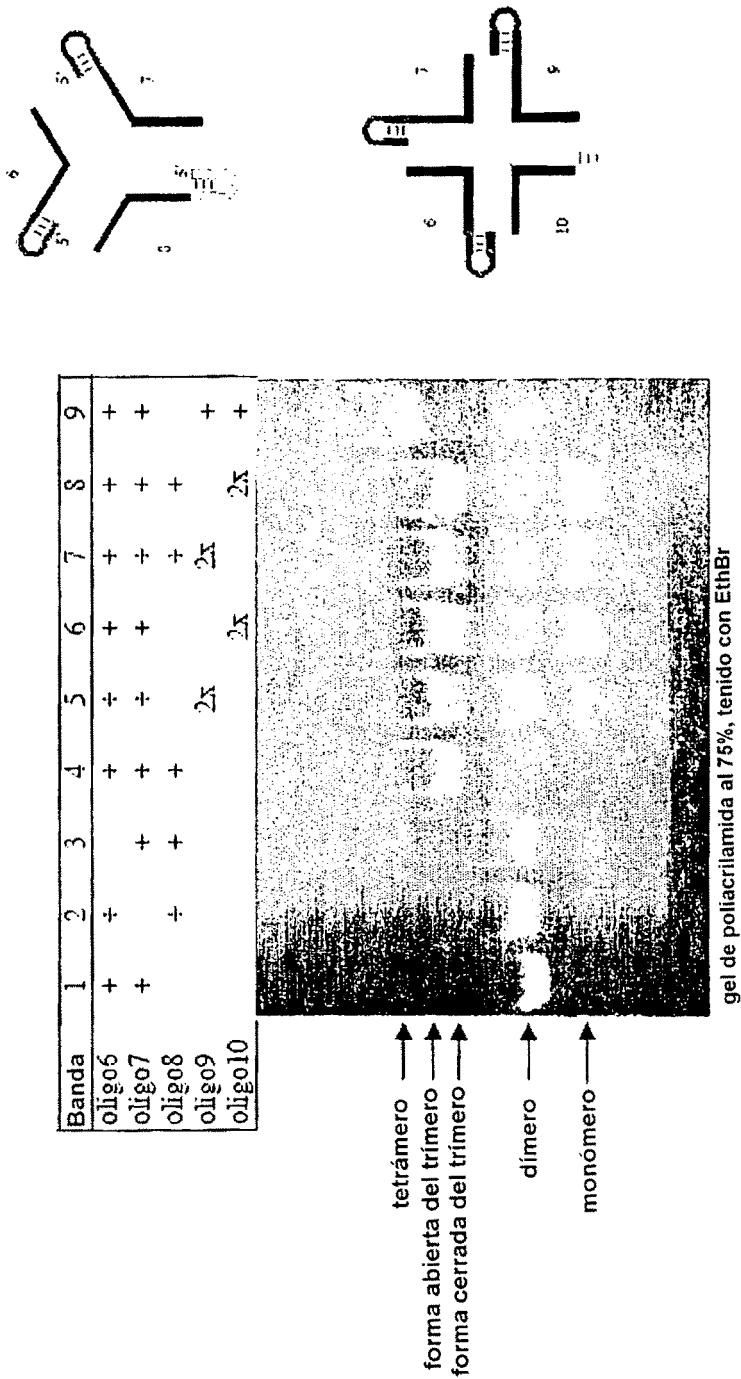


Figura 9

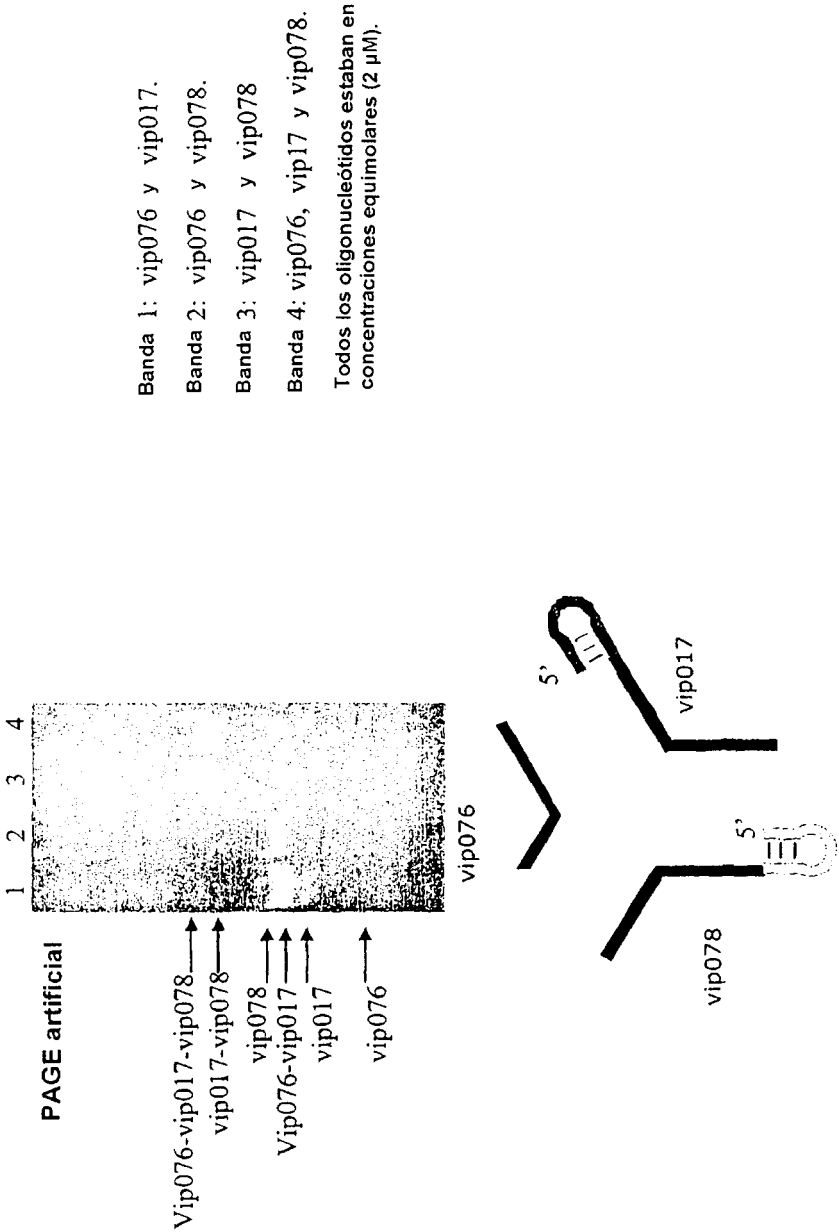


Figura 10

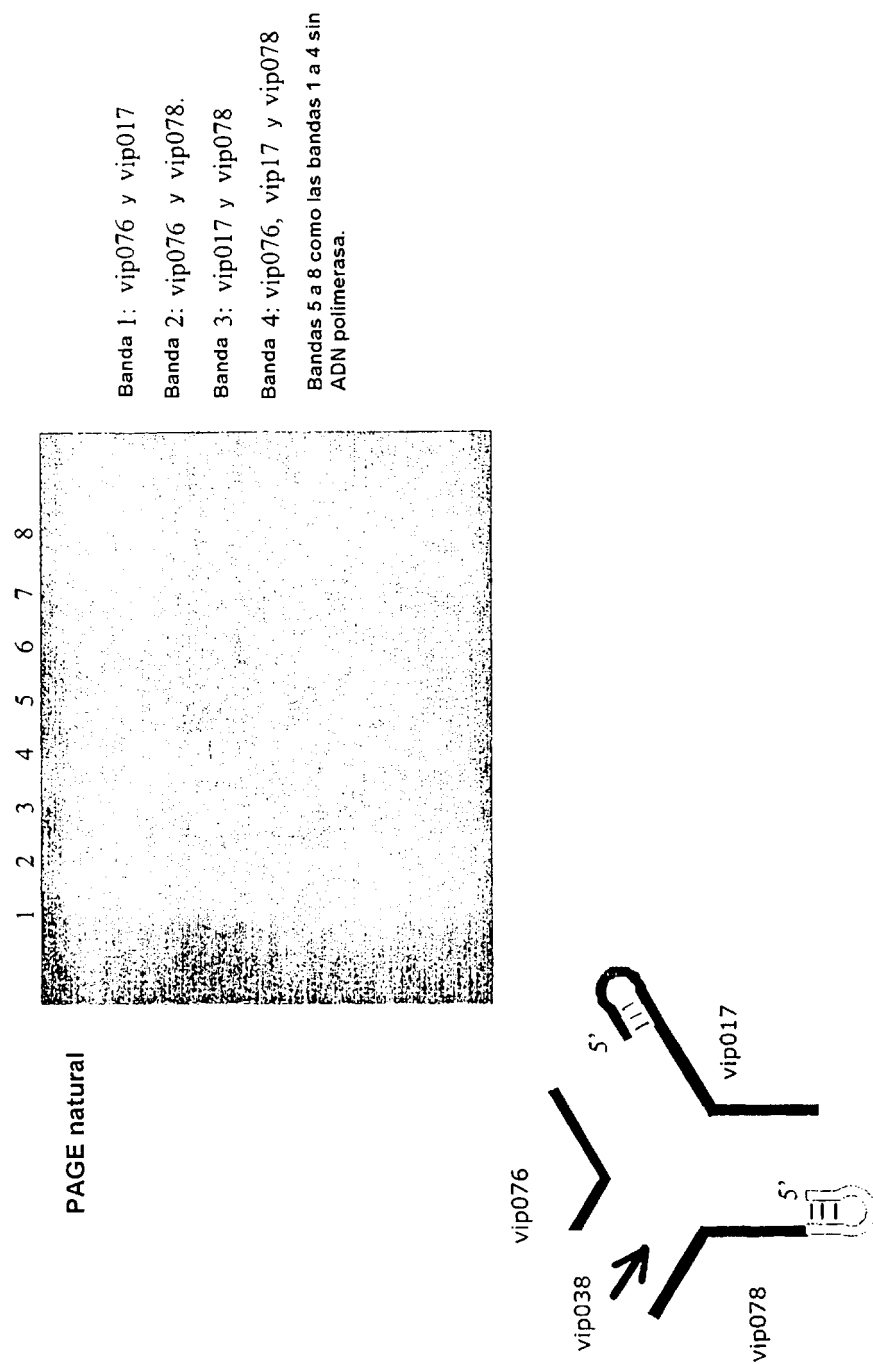


Figura 11

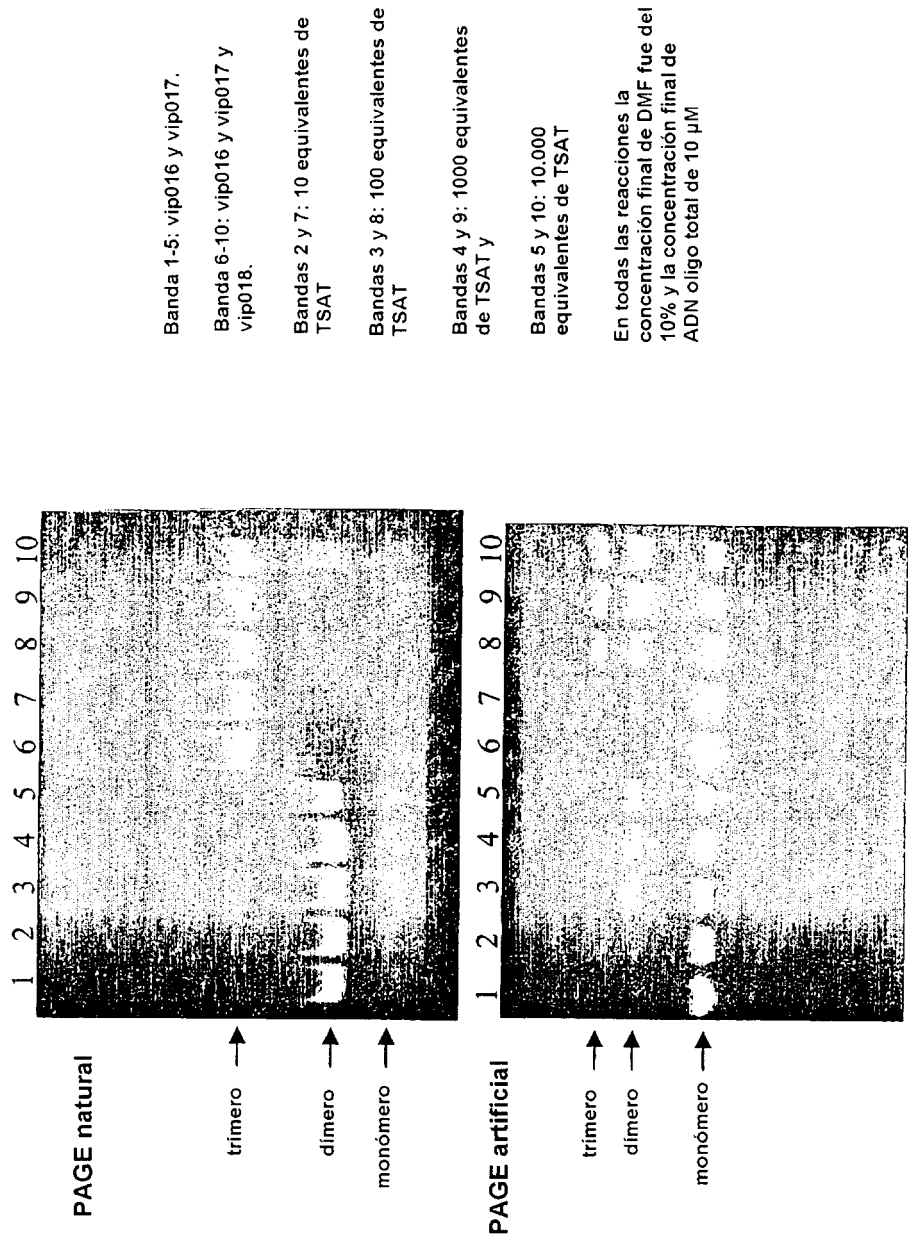


Figura 12

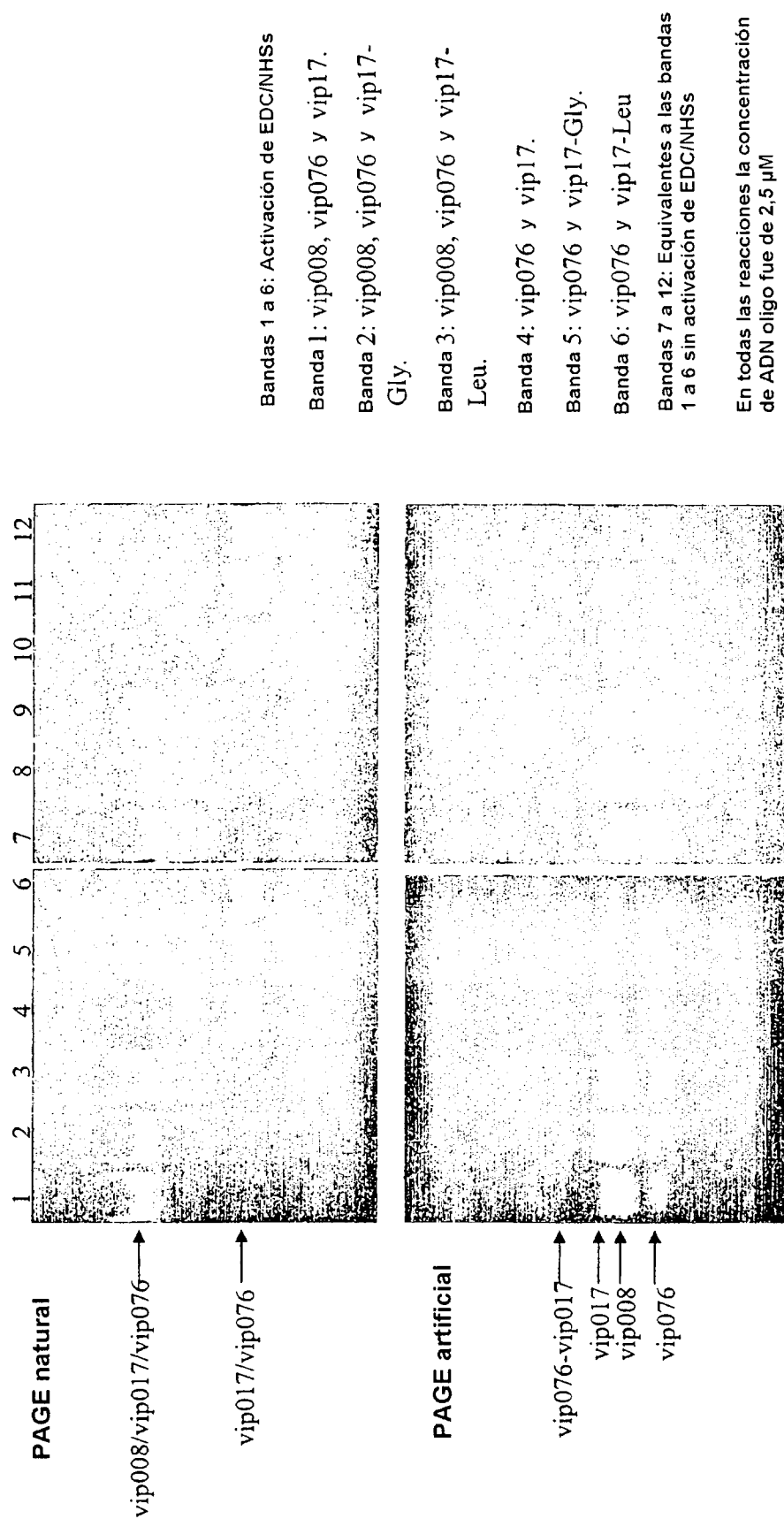


Fig. 13

Montaje y PRC del trímero

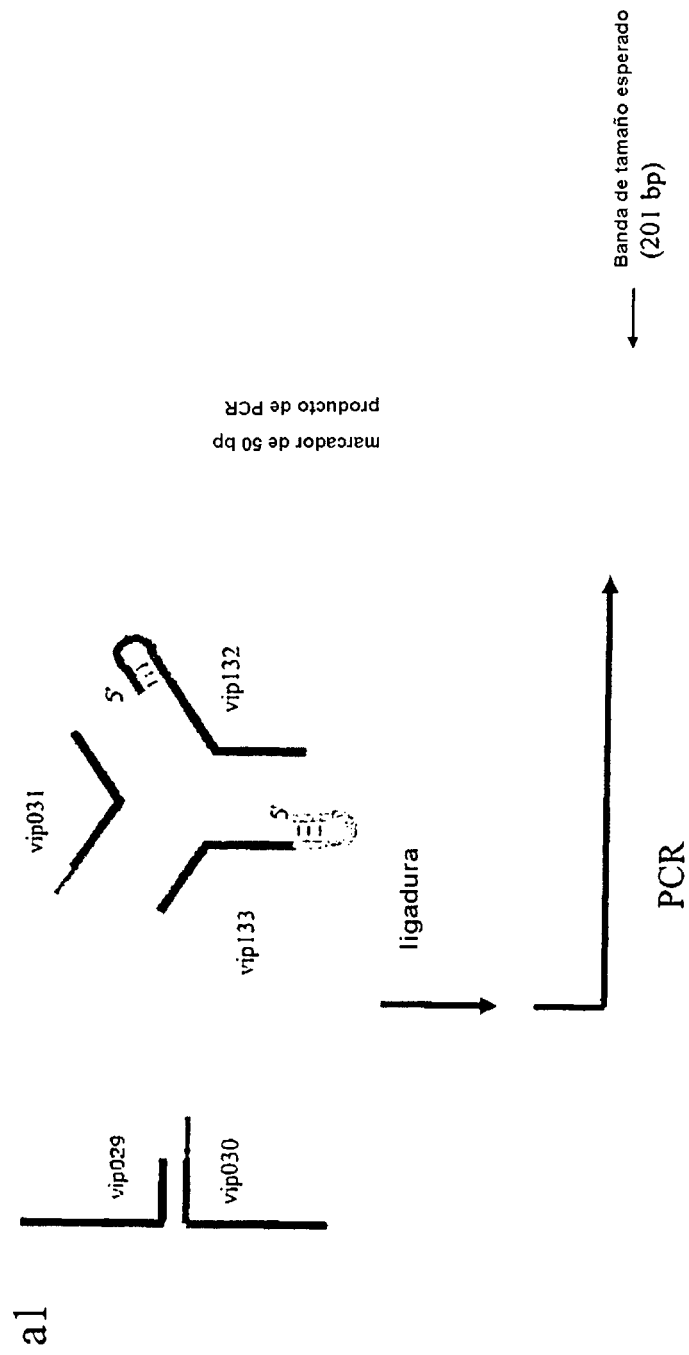


Fig. 14

Plegamiento de estructuras en estrella

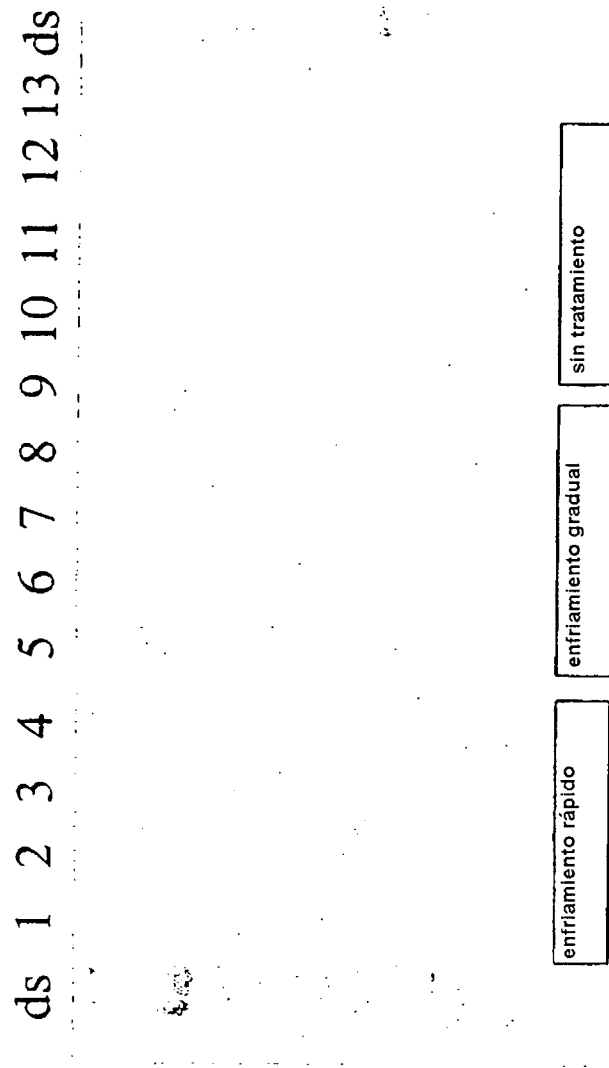


Fig. 15

Plegamiento y digestión de la estructura en estrella

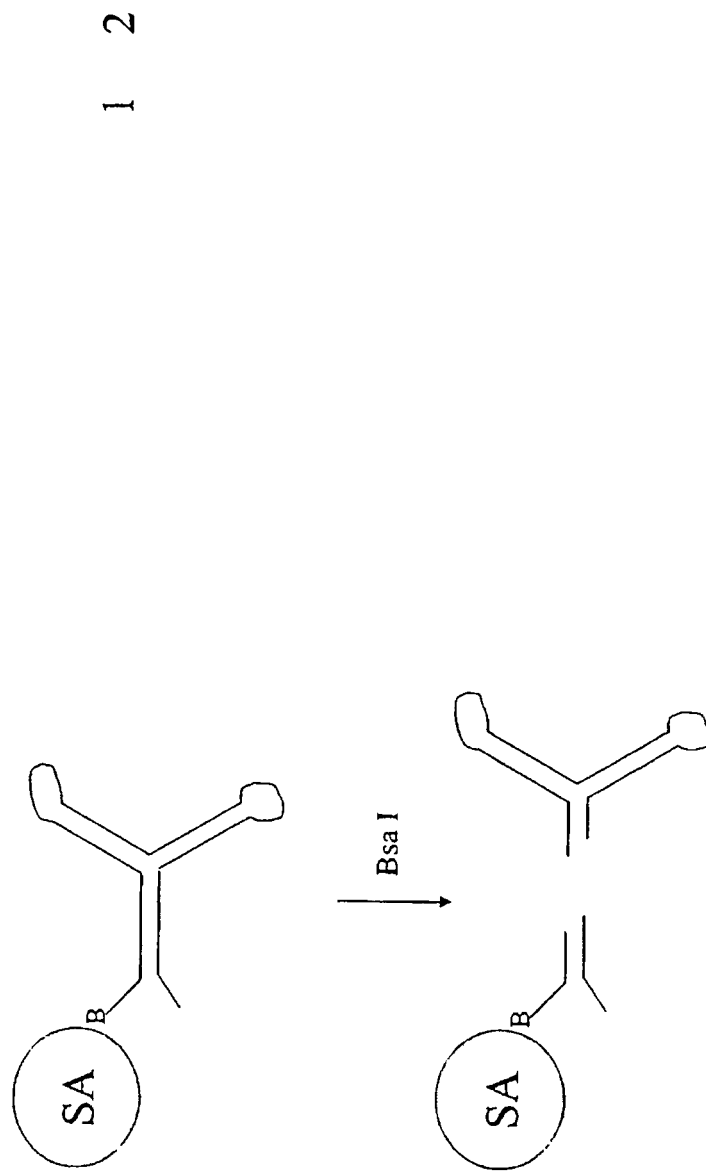


Fig. 16

Digestión de la estructura en estrella en los lazos

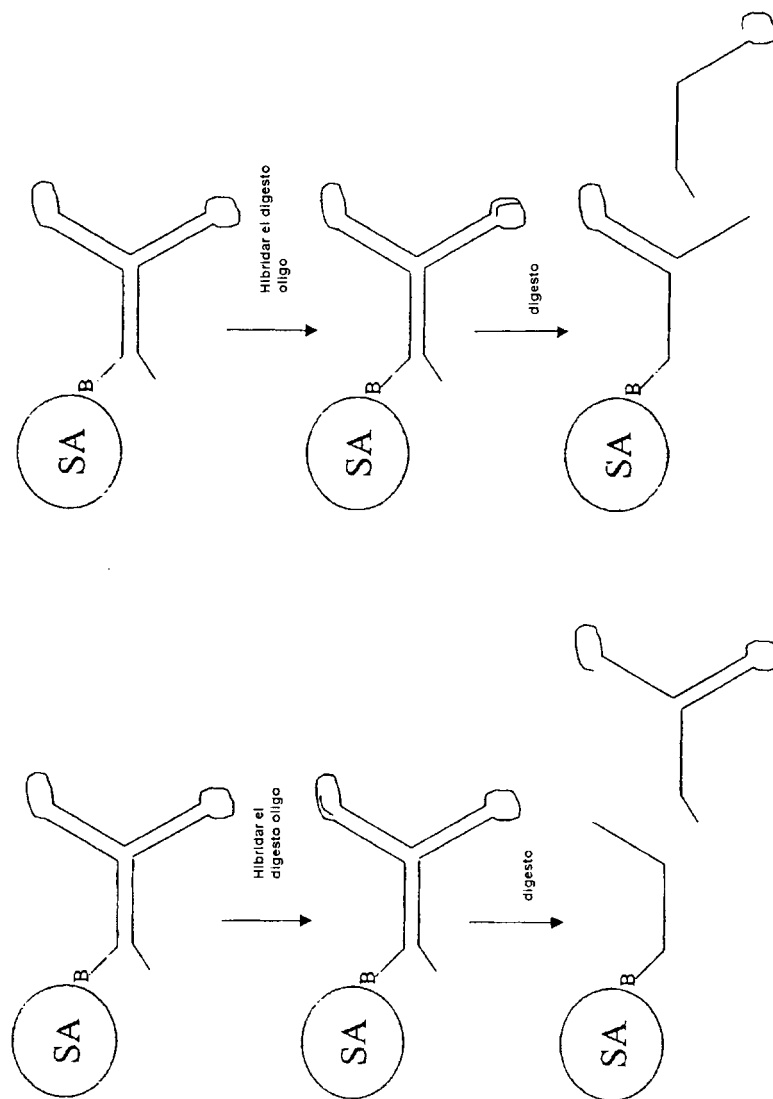


Fig. 17

Montaje y PRC del trímero

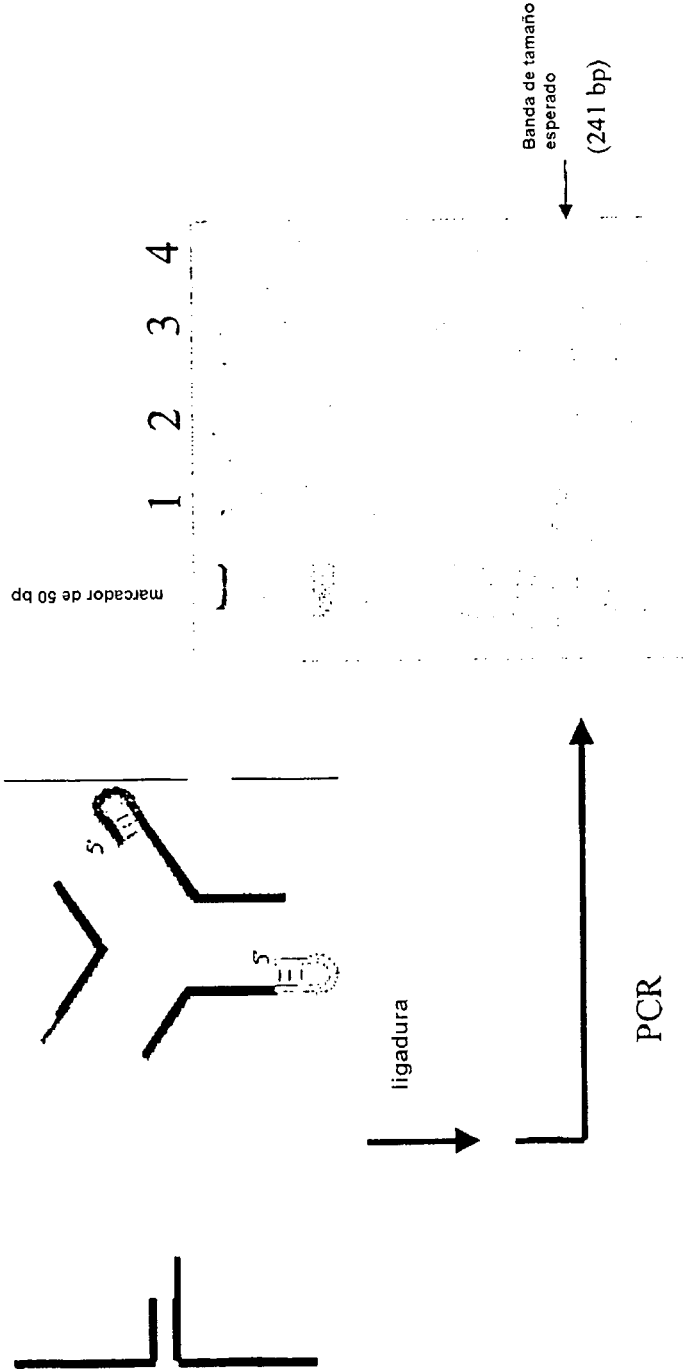
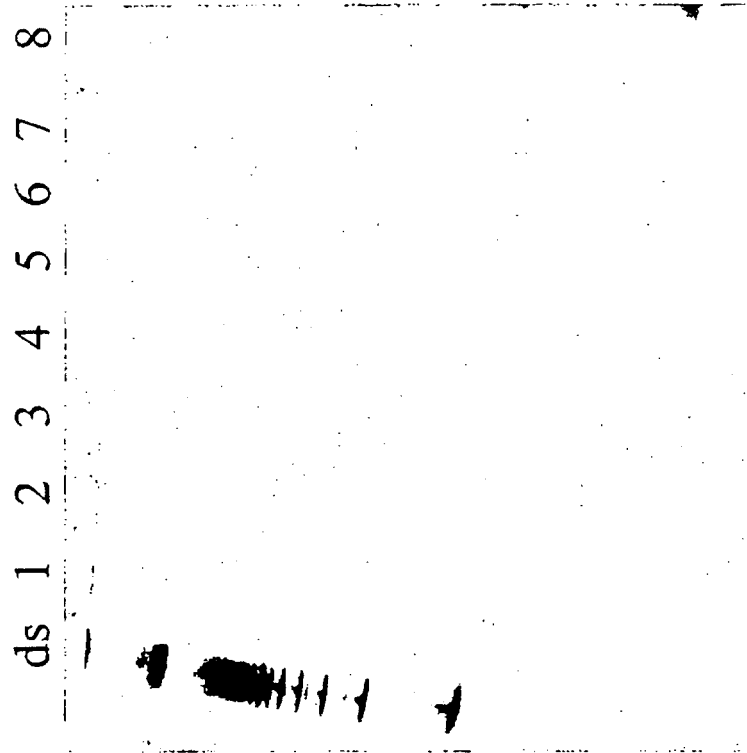


Fig. 18

Digesto en lazos



ES 2 320 361 T3

Fig. 19

Formación del enlace amida
dirigido por ADN nano-reactor

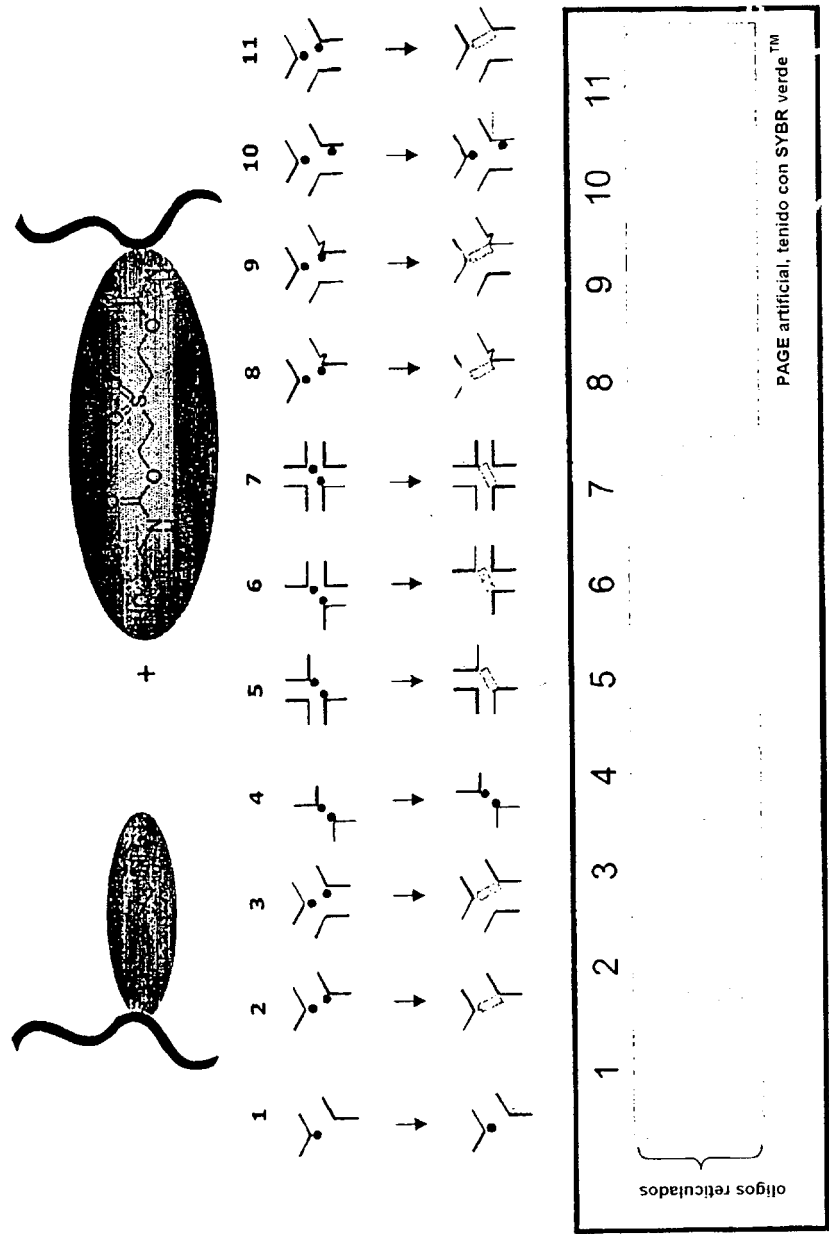


Fig. 20

Reacción	Tiempo de reacción
1	0 min
2	5 min
3	30 min
4	60 min
5	120 min
6	240 min
7	Durante la noche
8	Añadido más activador (DMT-MM) después de 2 h; incubado durante la noche
9	Añadido más activador (DMT-MM) después de 2 h y 4h; incubado durante la noche

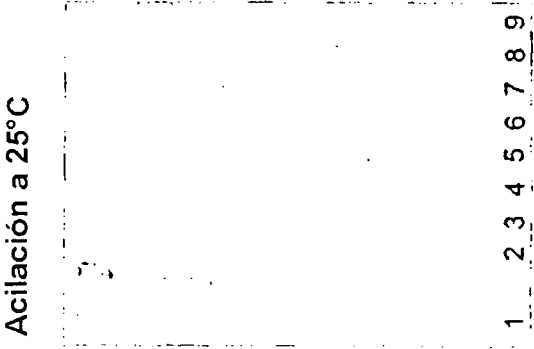
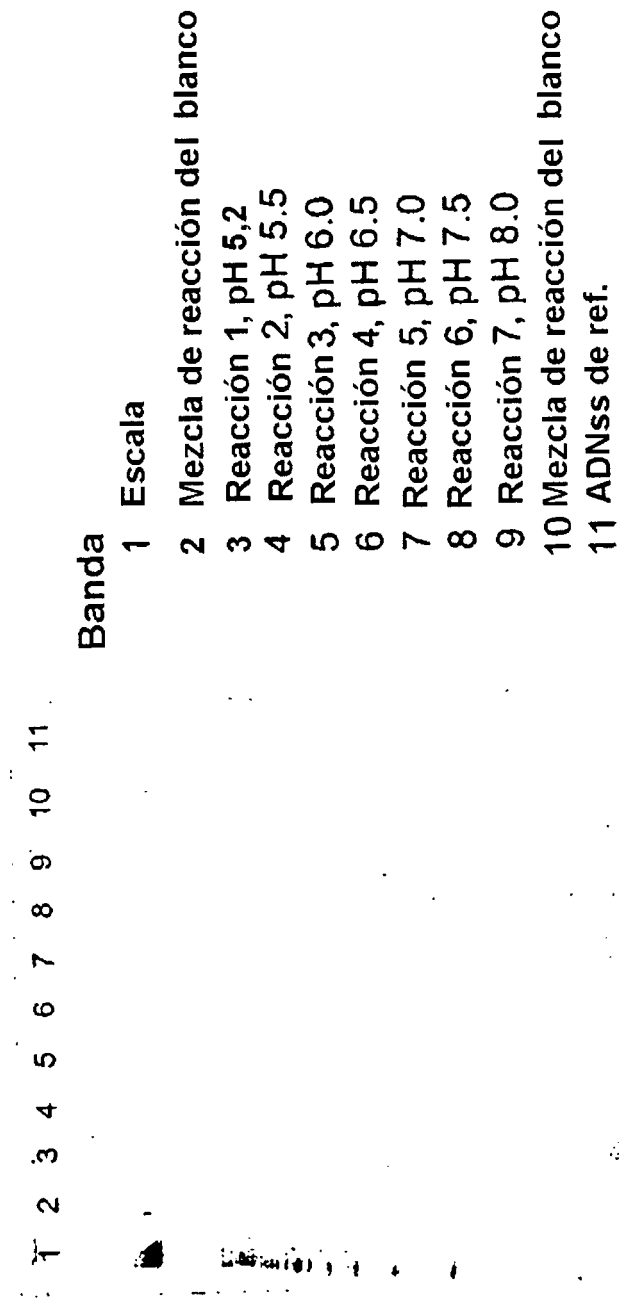


Fig. 21

Mezcla de reacción del blanco



ES 2 320 361 T3

Fig. 22

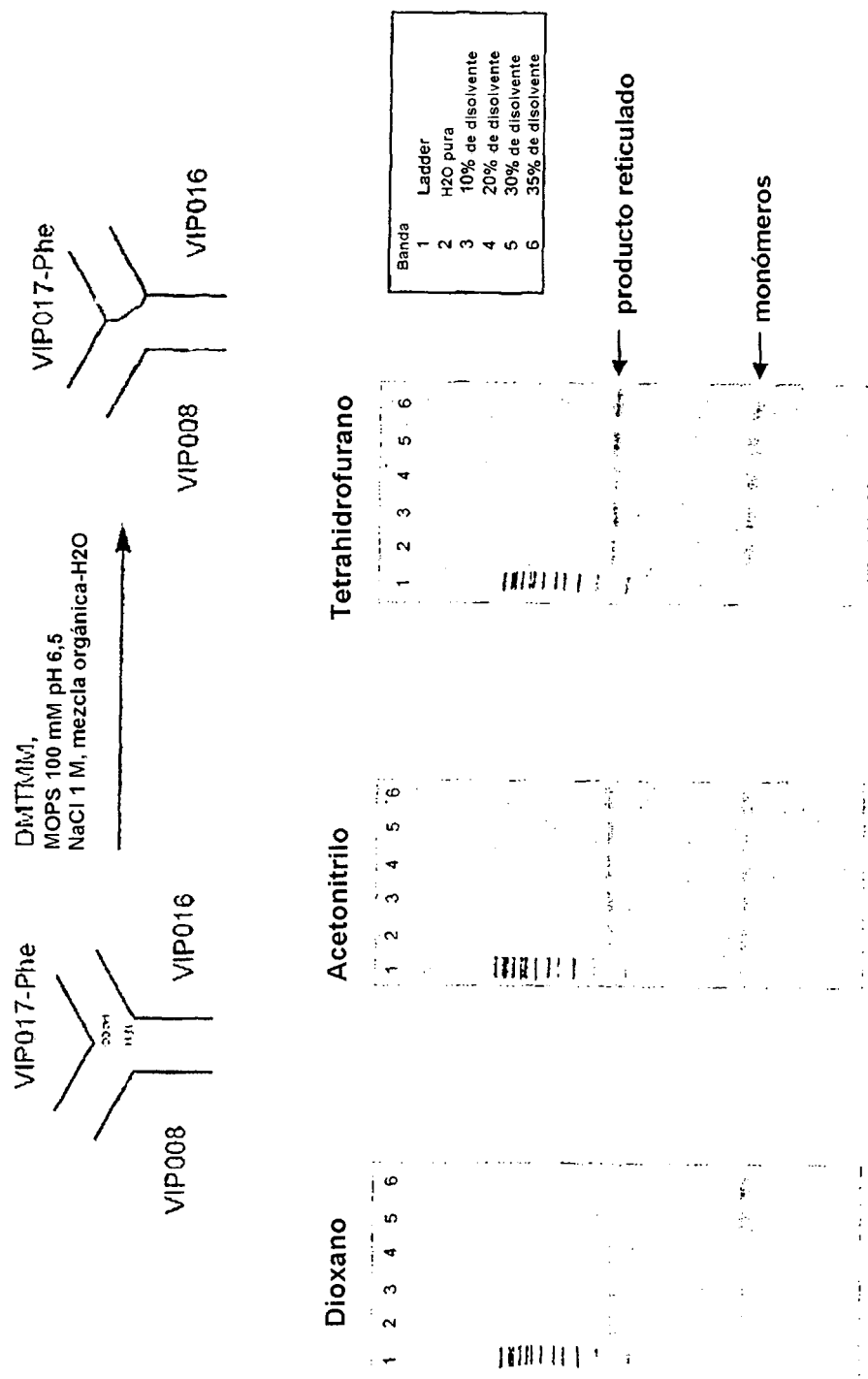


Fig. 23

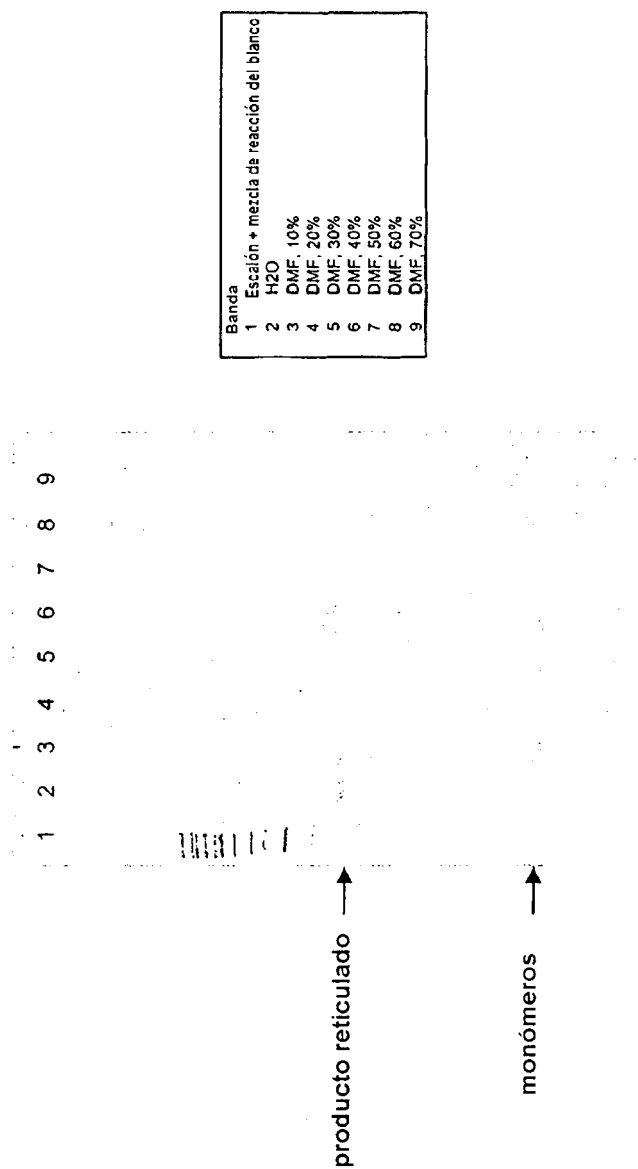
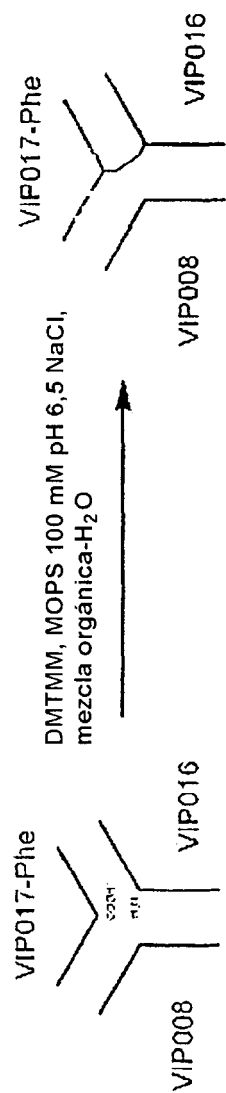


Fig. 24

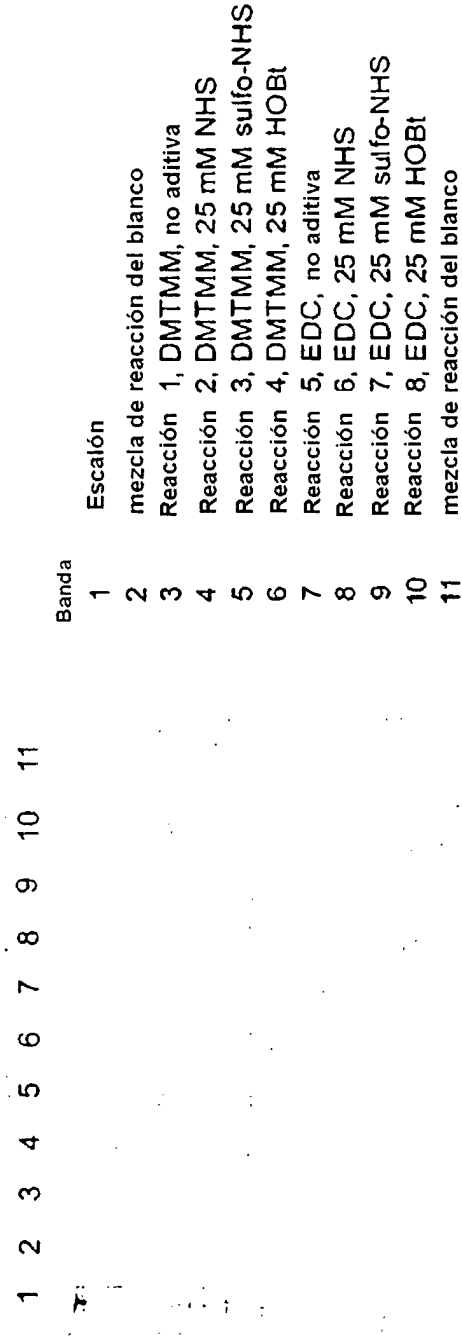
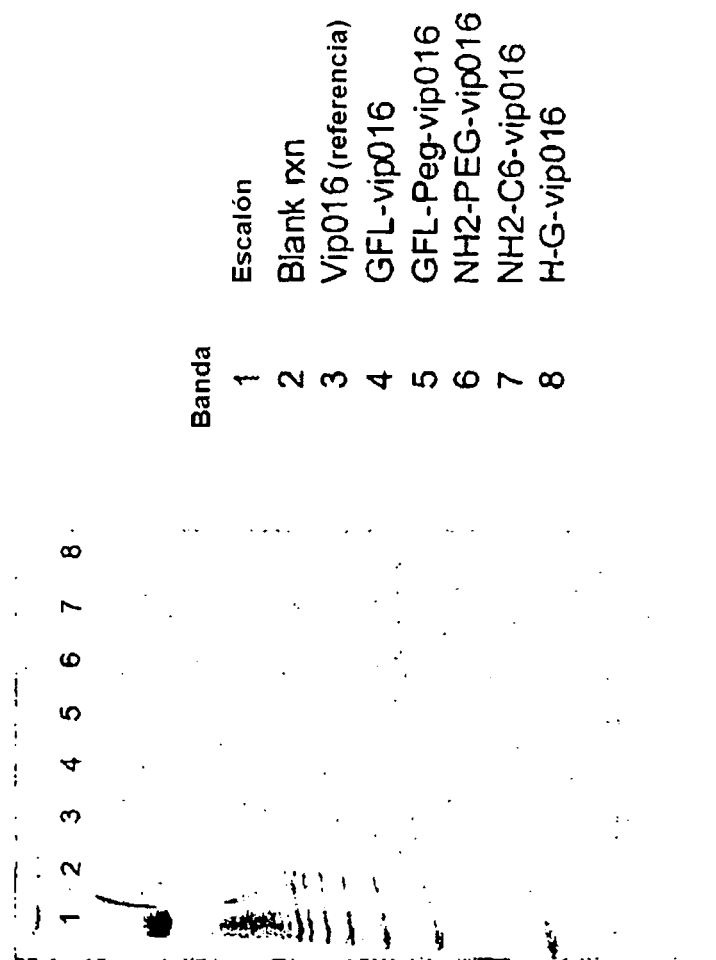
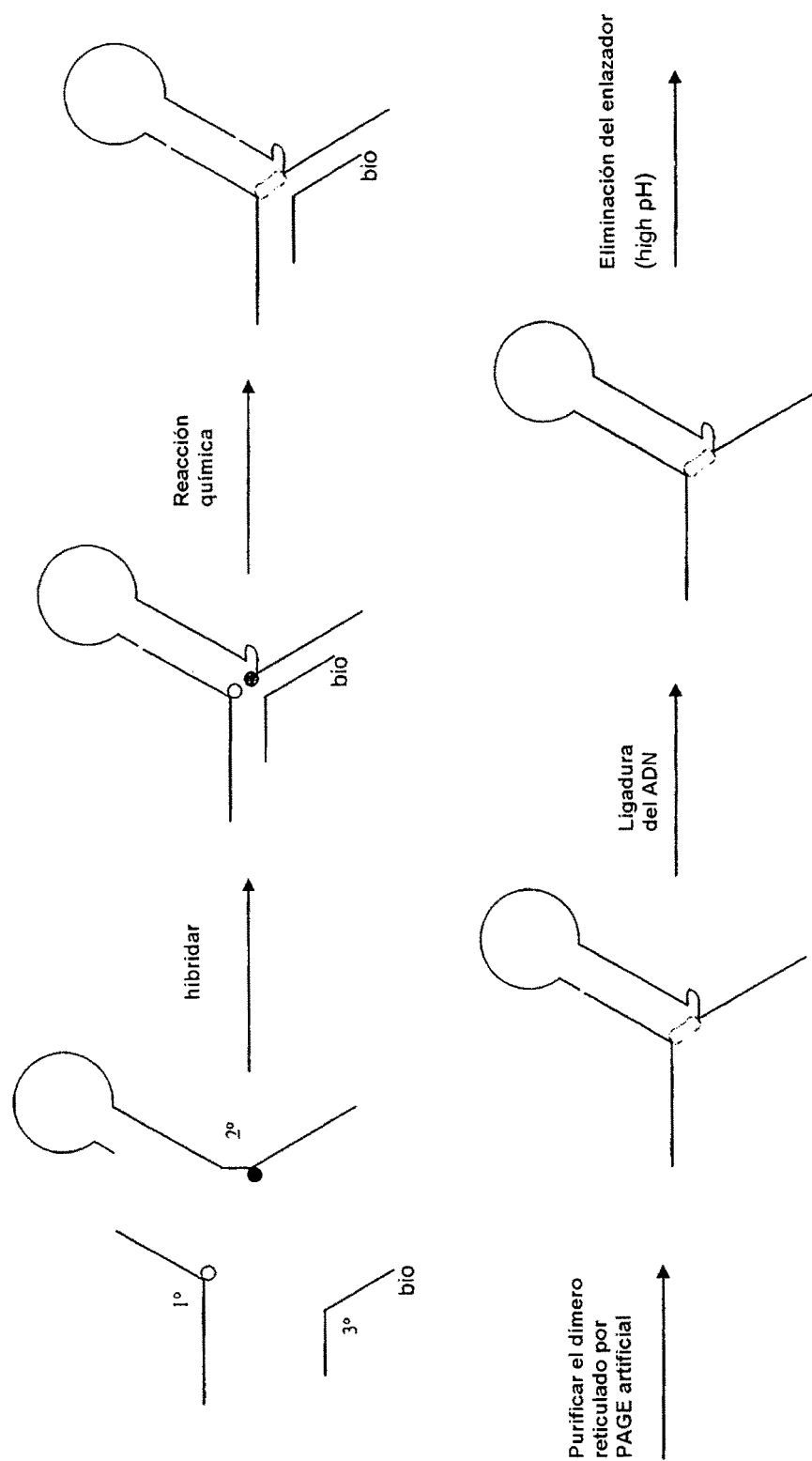


Fig. 25



ES 2 320 361 T3

Figura 26



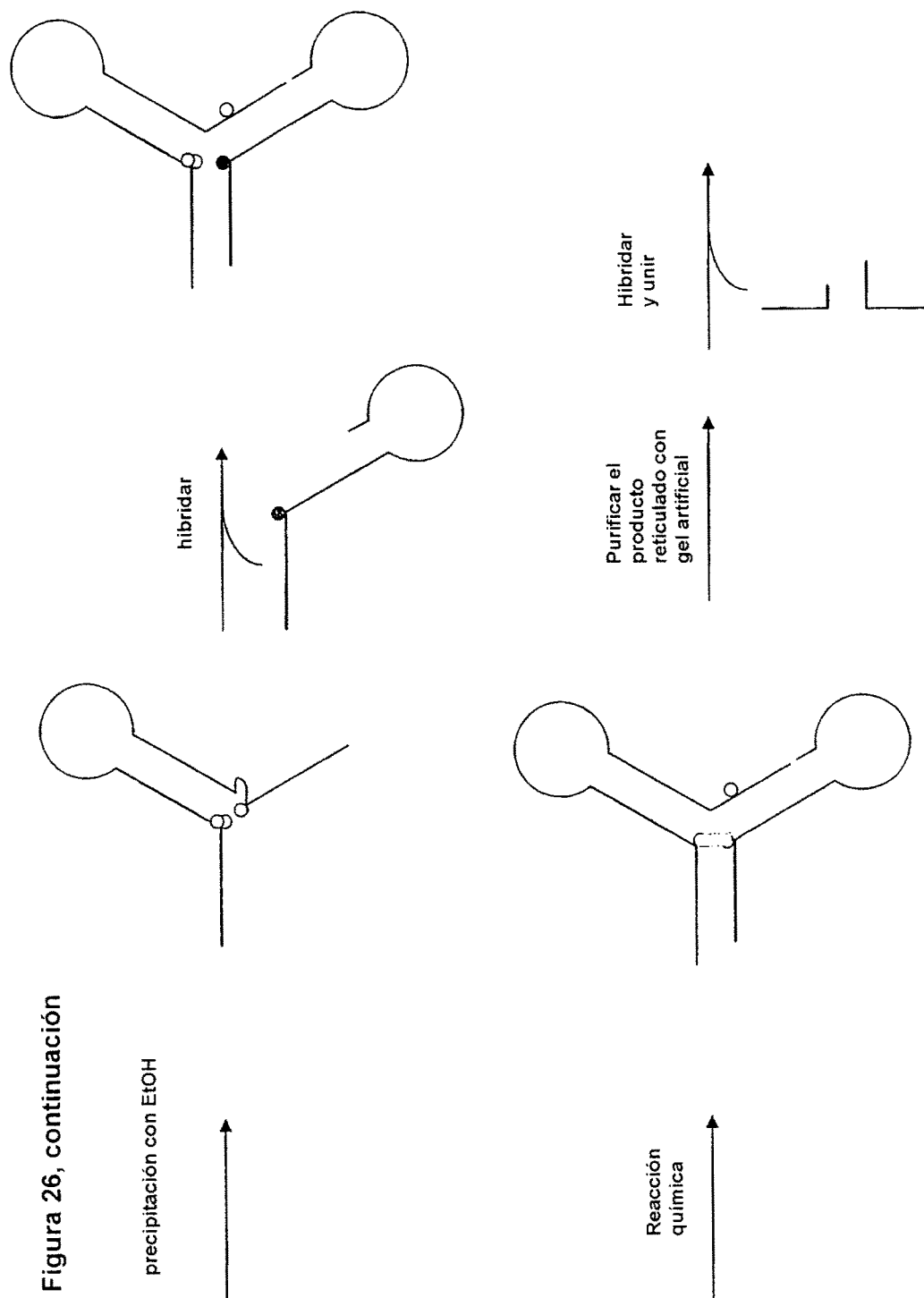


Figura 26, continuación

Fig. 26, continuación

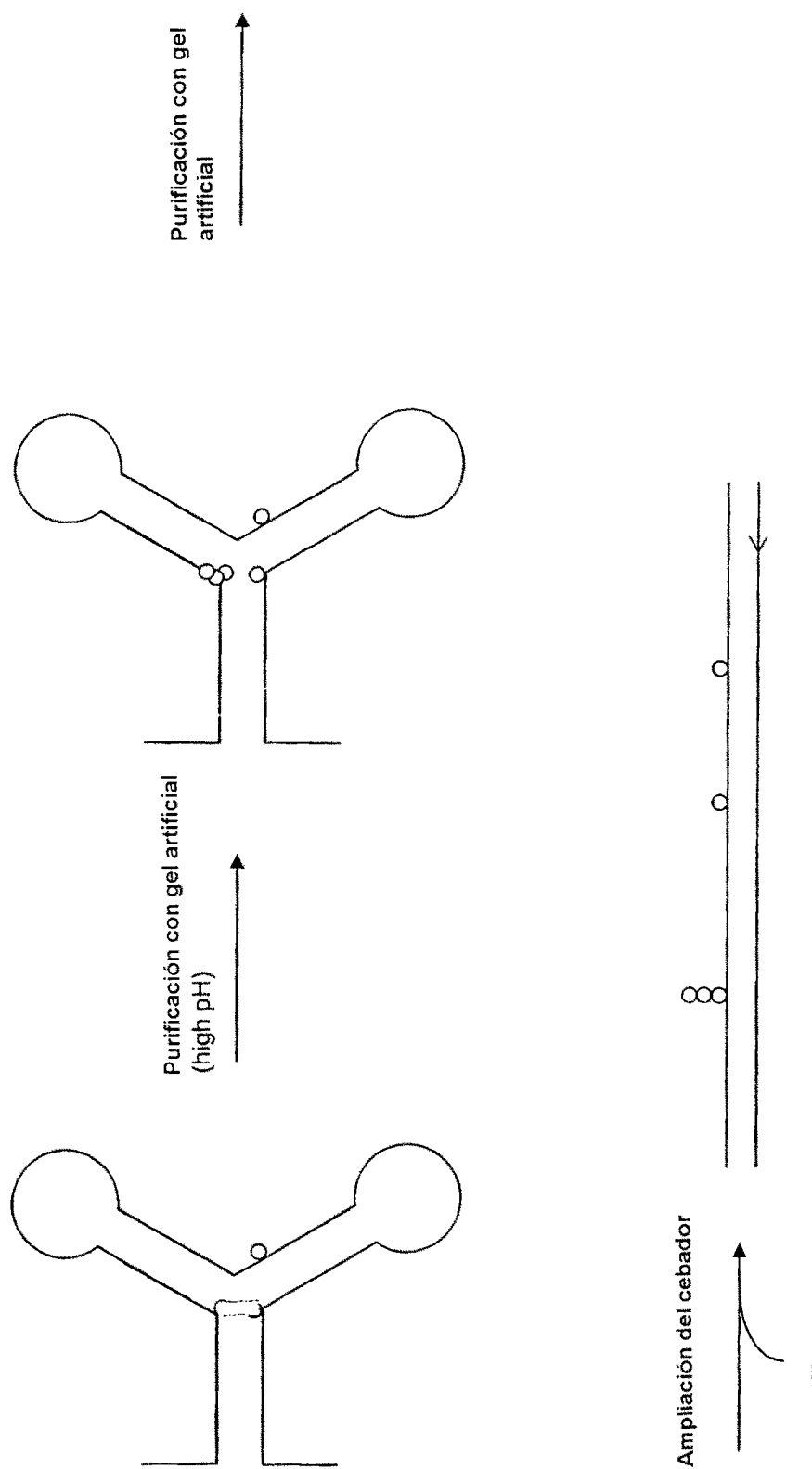


Fig 27

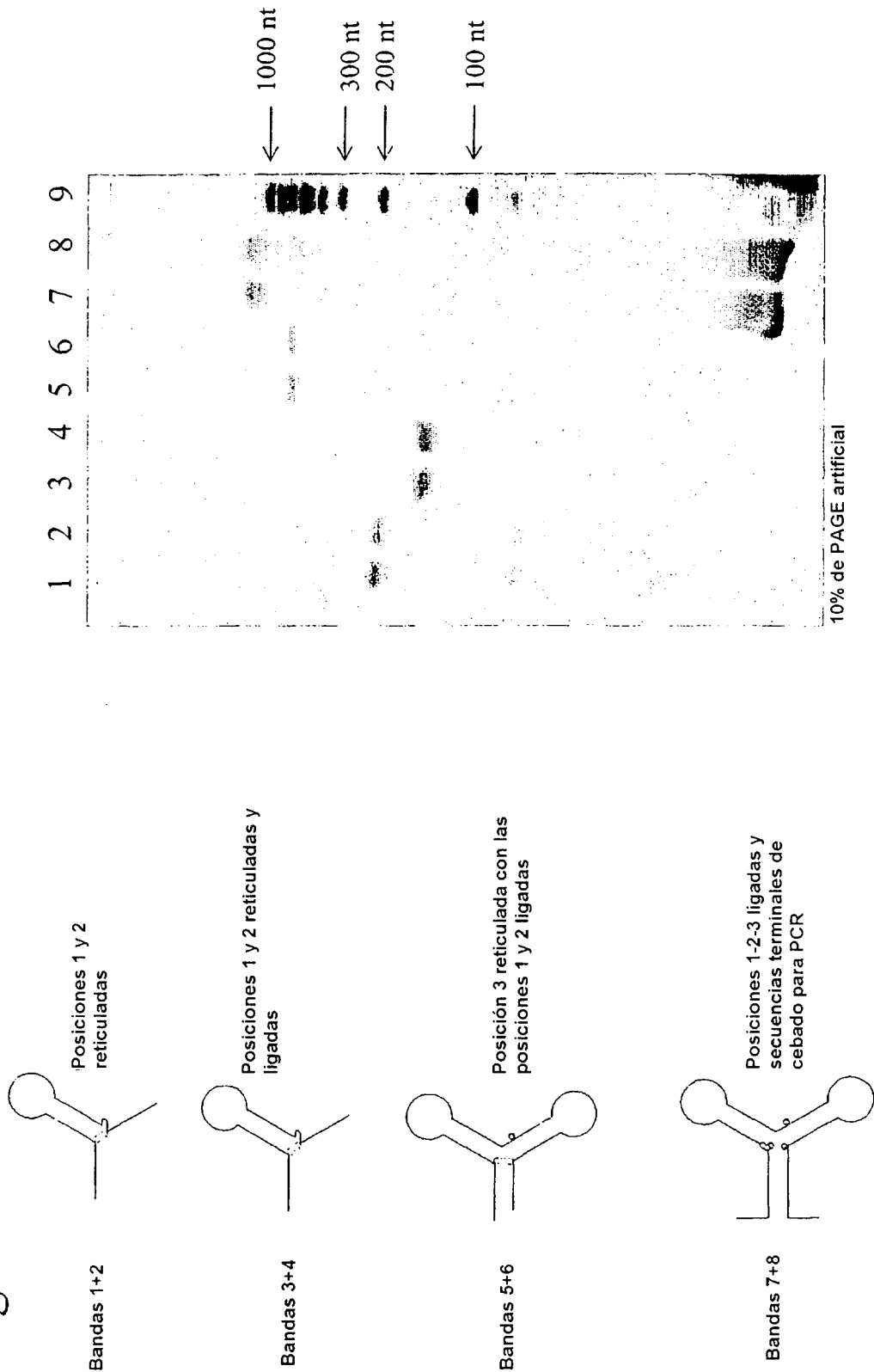
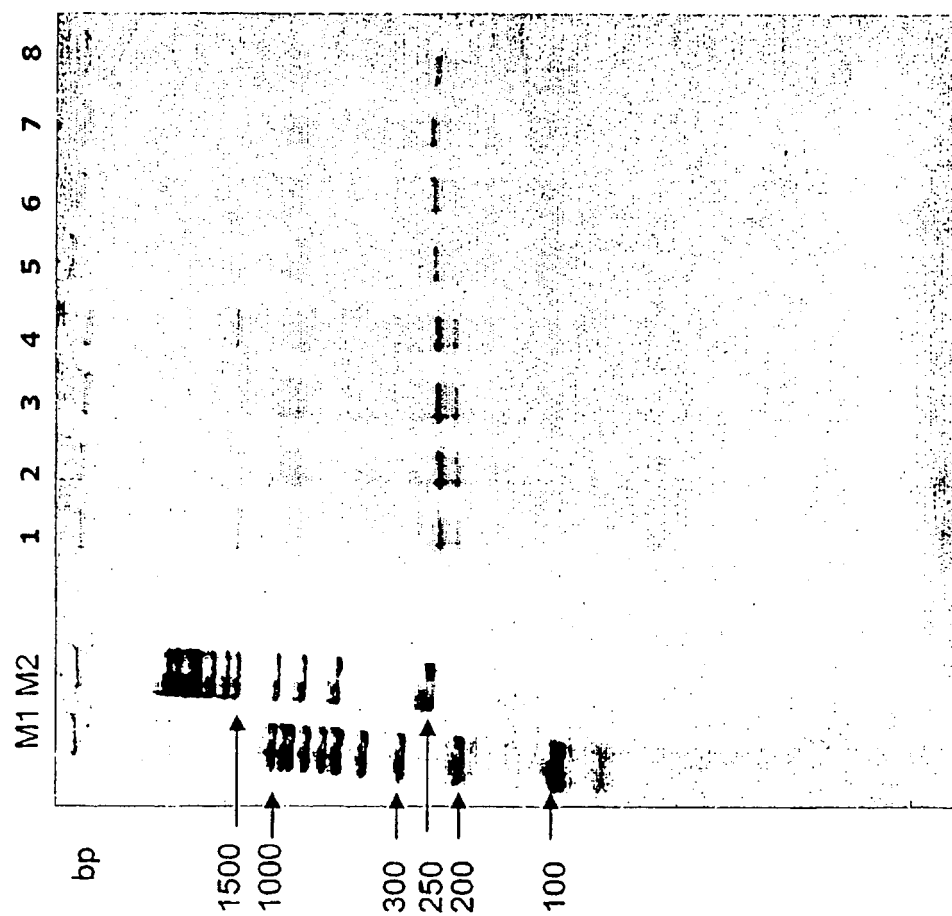
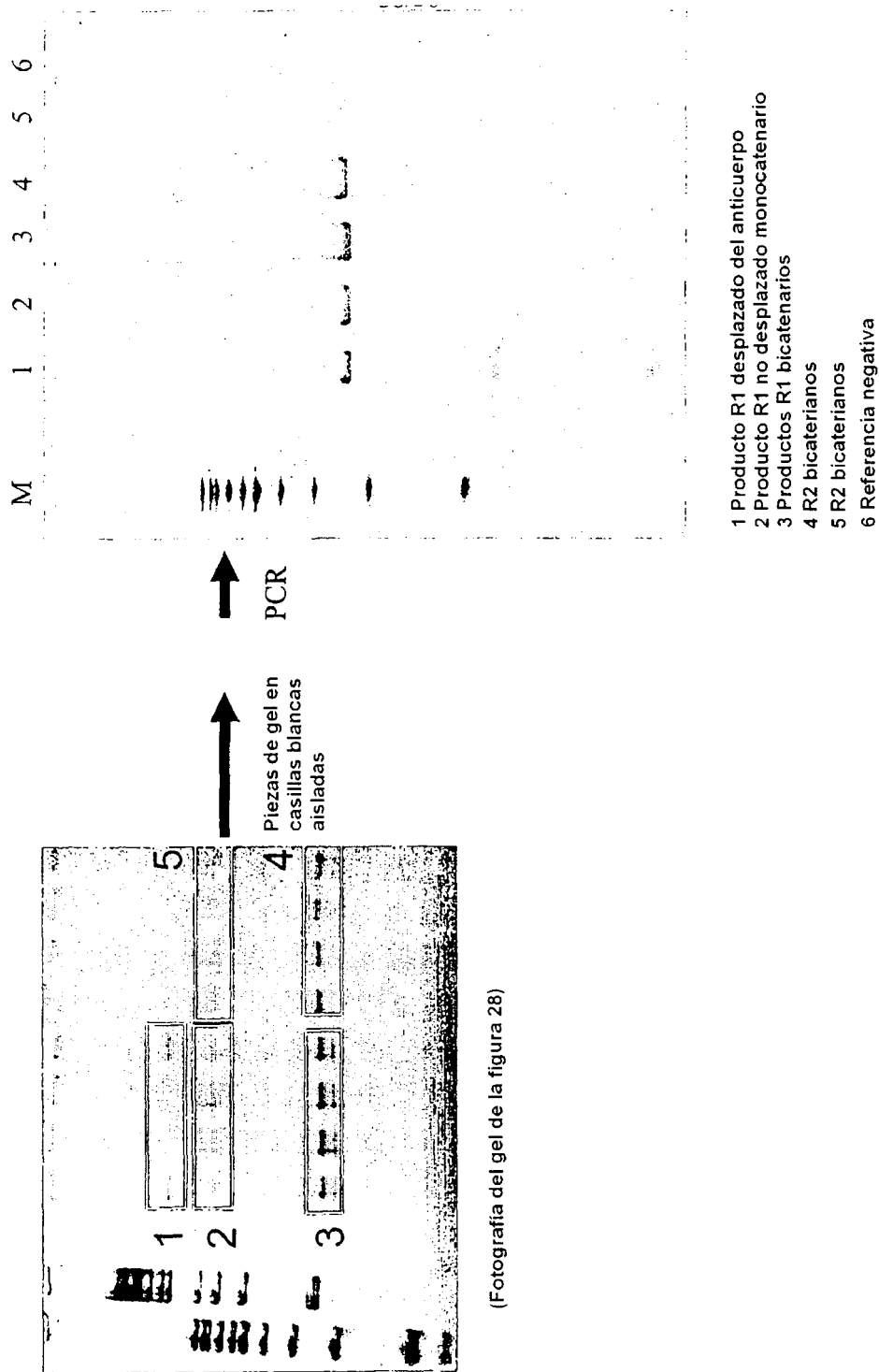


Figura 28



	Bandas							
	1	2	3	4	5	6	7	8
R1 (Leu-encefalina-ADN)	+	+	+	+				
R2 (Leu-encefalina-ADN mezclados)					+	+	+	+
anti Leu-enkephalin mAb (3E7)					+	+	+	+
mAb de referencia negativo compatible con isótopos								
péptido Leu-encefalina libre								
péptido Leu-encefalina mezclado libre								

Figura 29: Ampliación por PROCARIÓTIC de las bandas purificadas en gel en el ensayo EMSA



(Fotografía del gel de la figura 28)

Figura 30 Dirección de aminación reductora con estructura en estrella de ADN

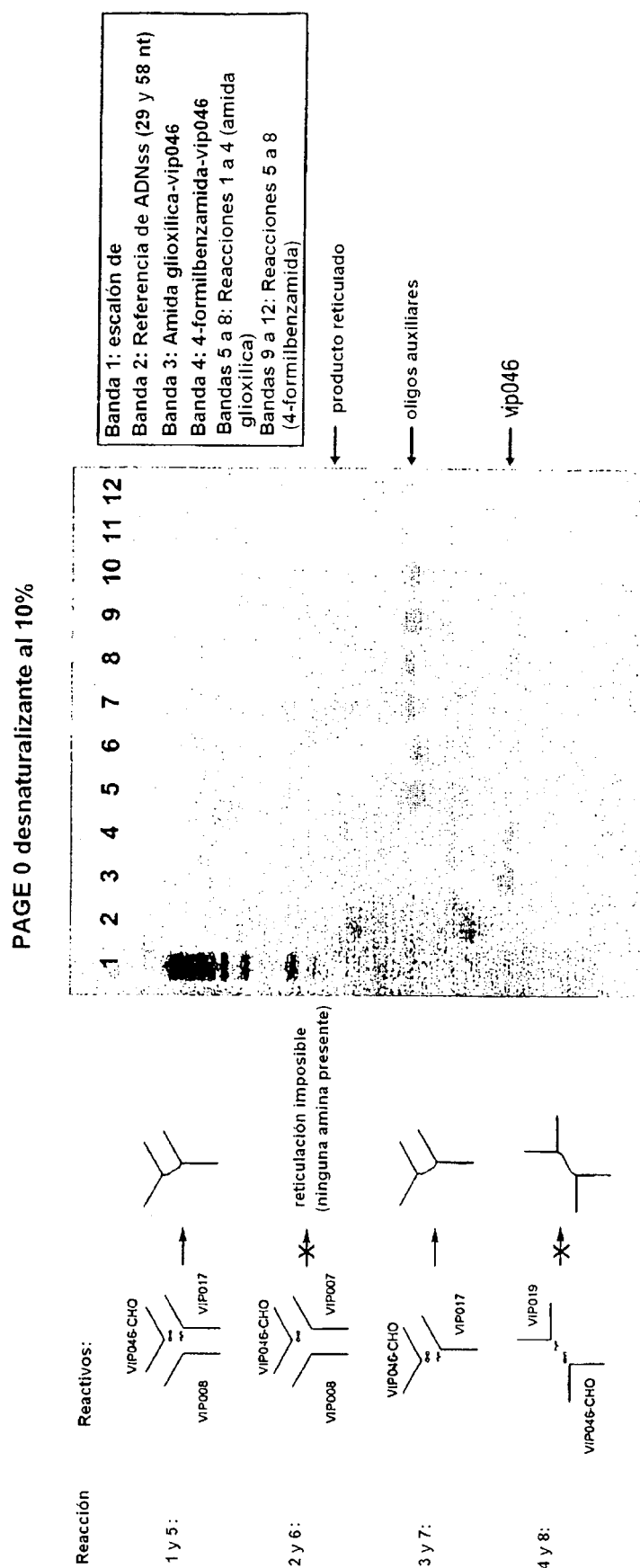


Figura 31 — Formación de urea dirigida por ADN estructural

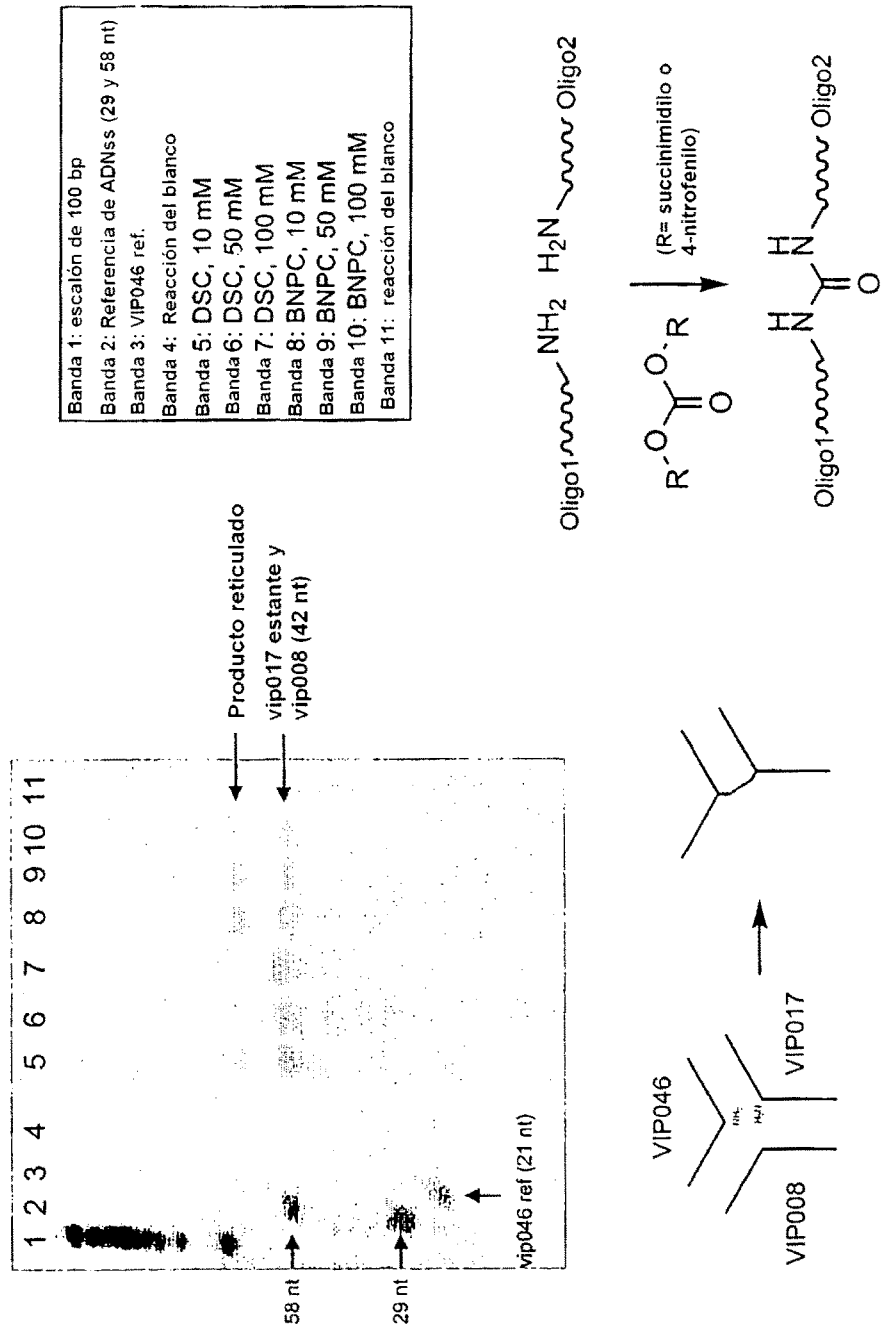
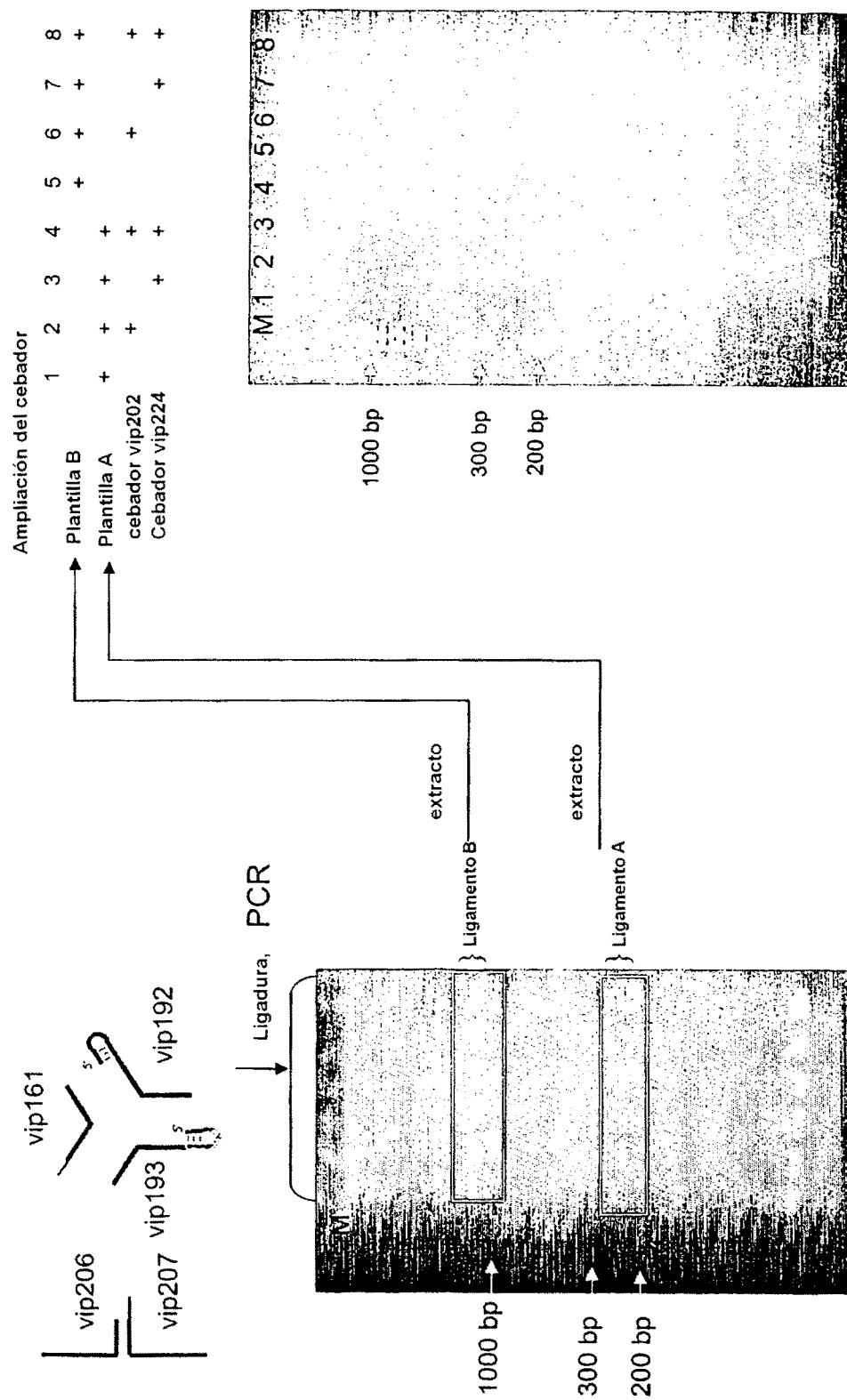
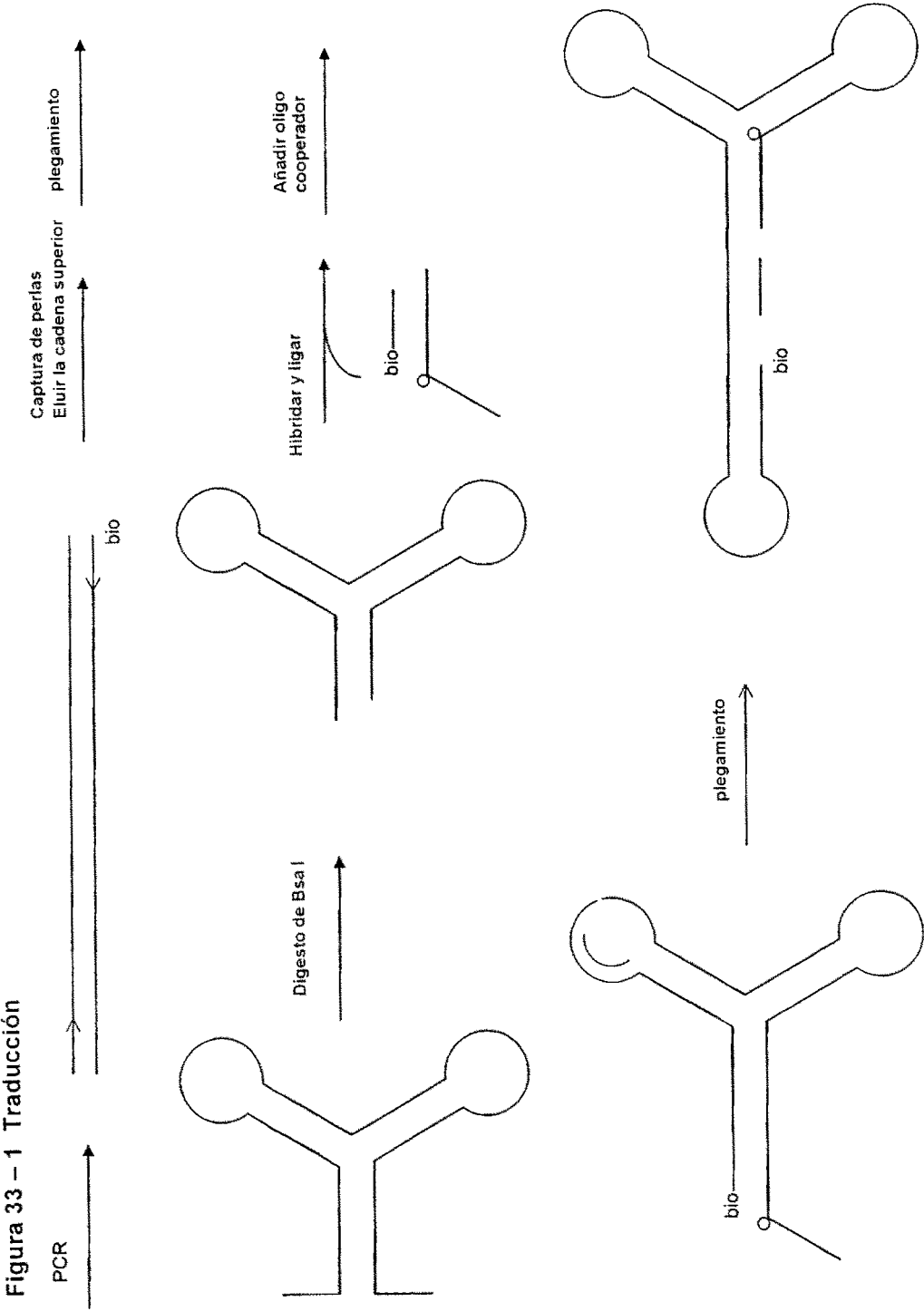
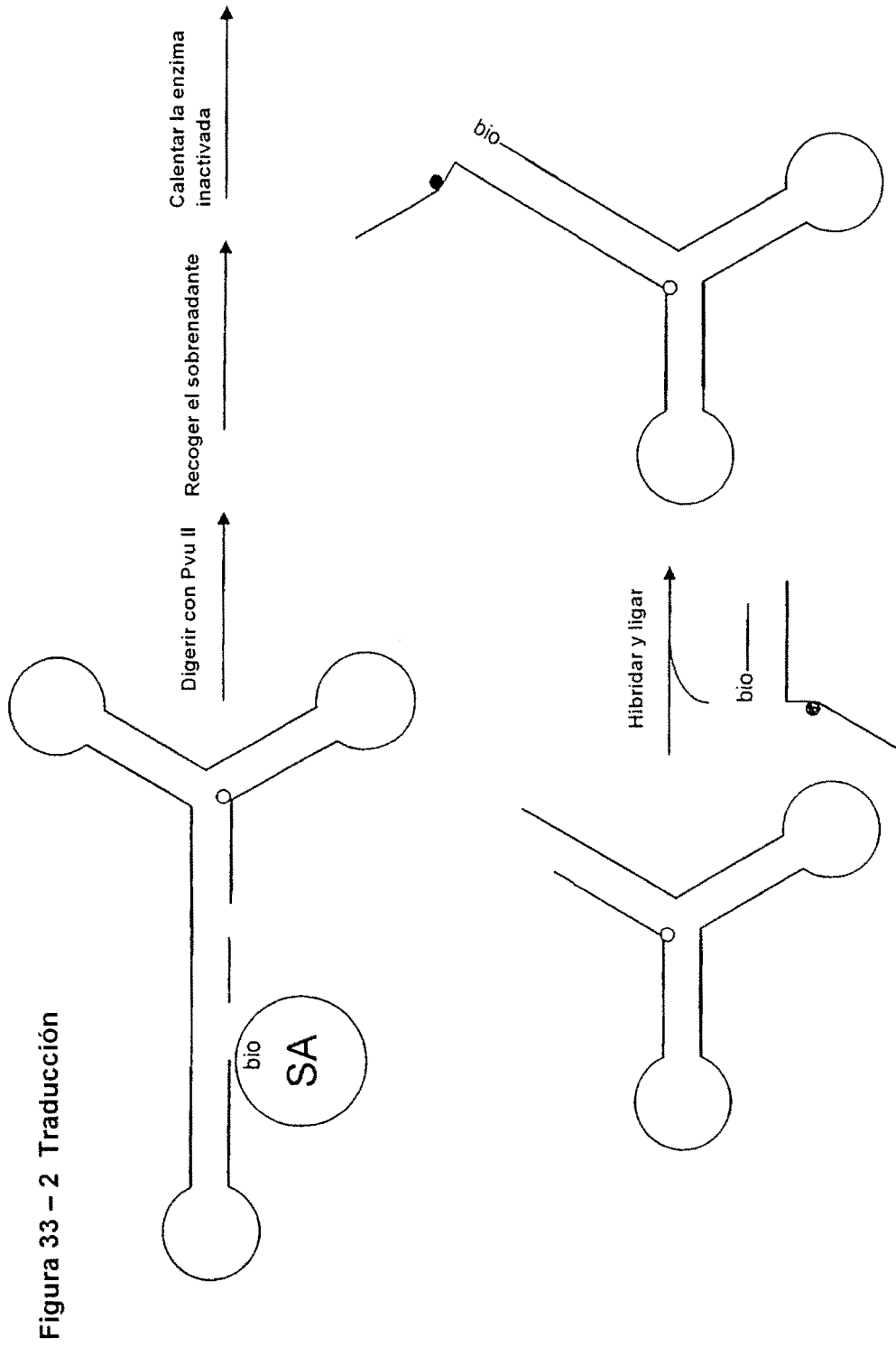


Figura 32







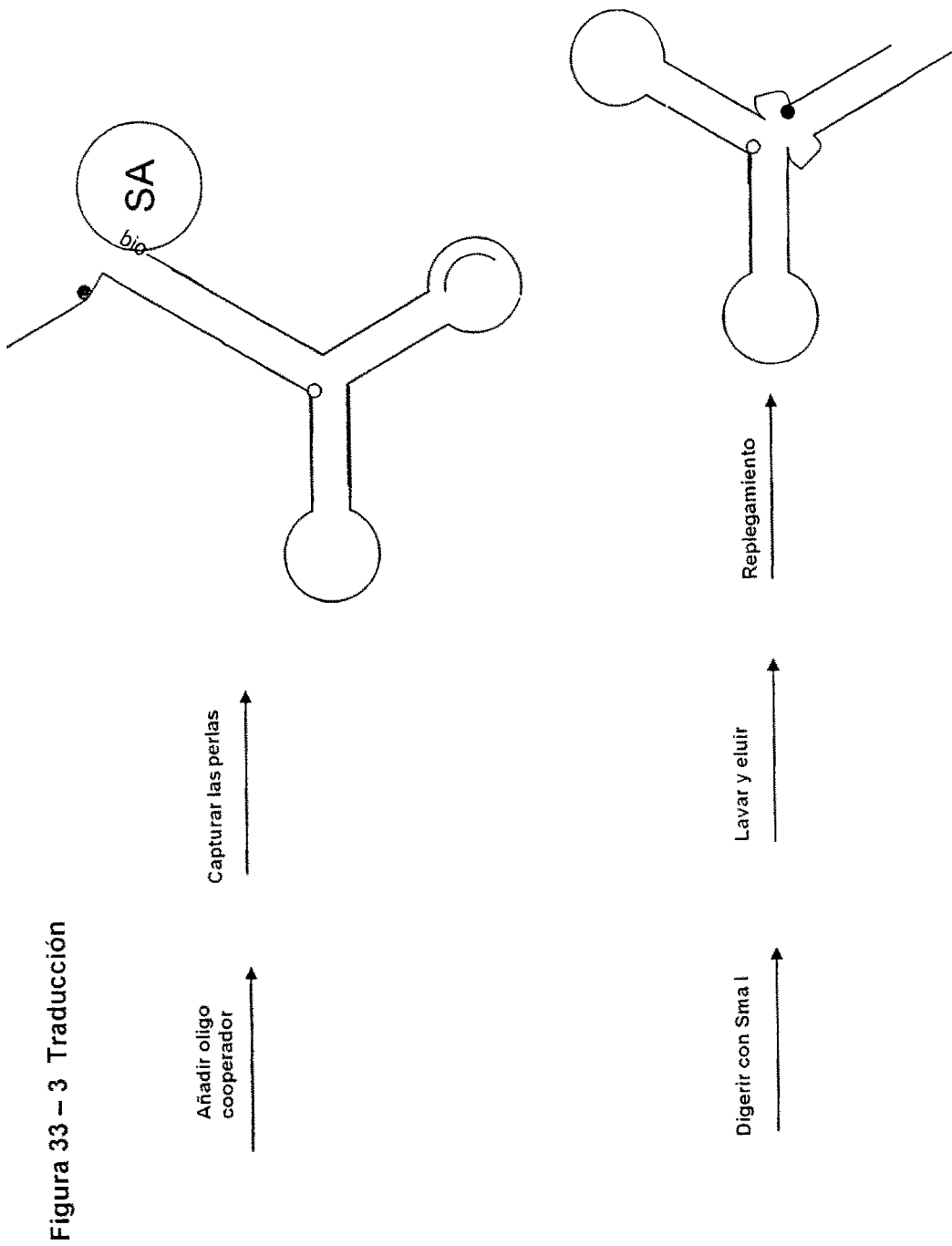
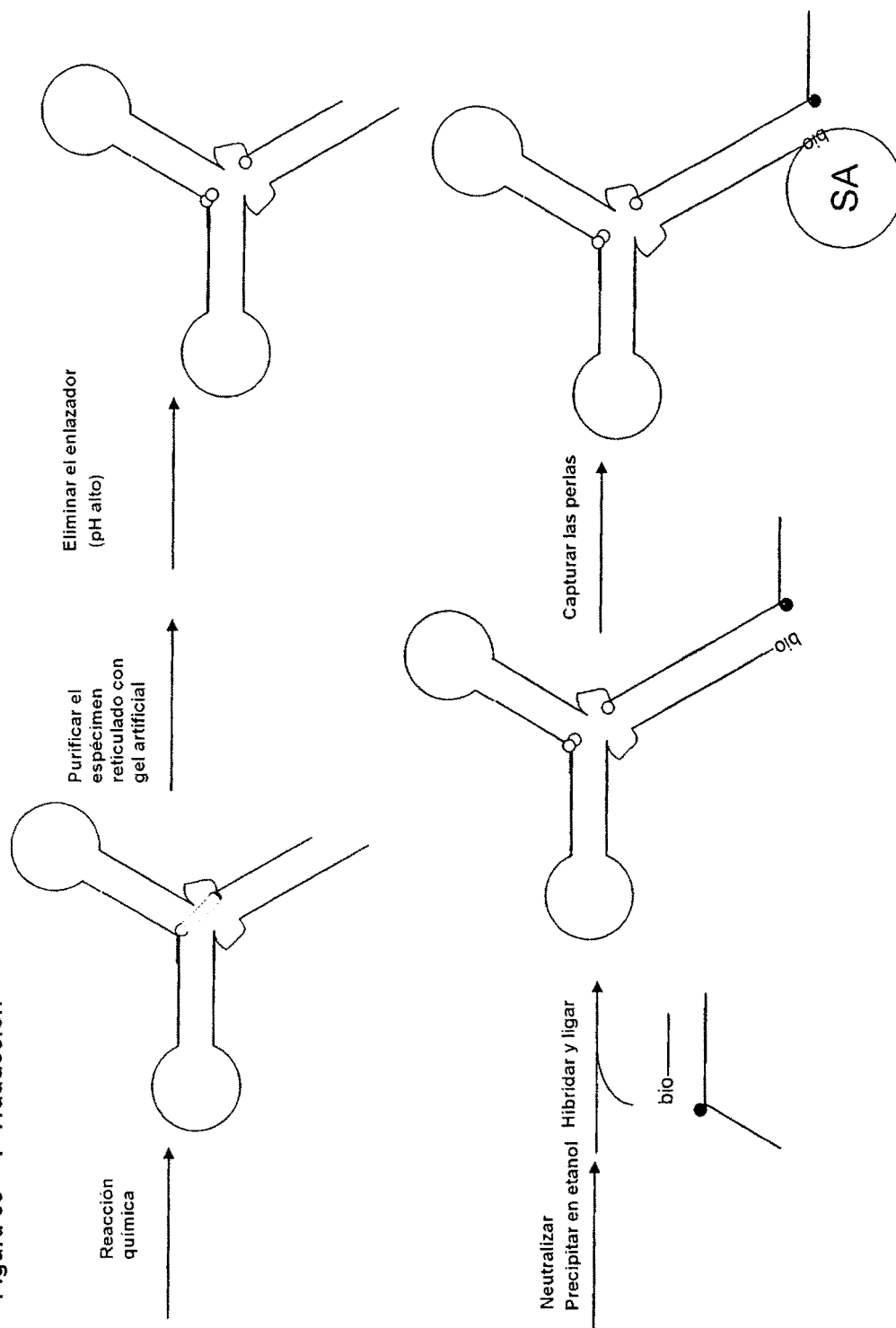


Figura 33 - 4 Traducción



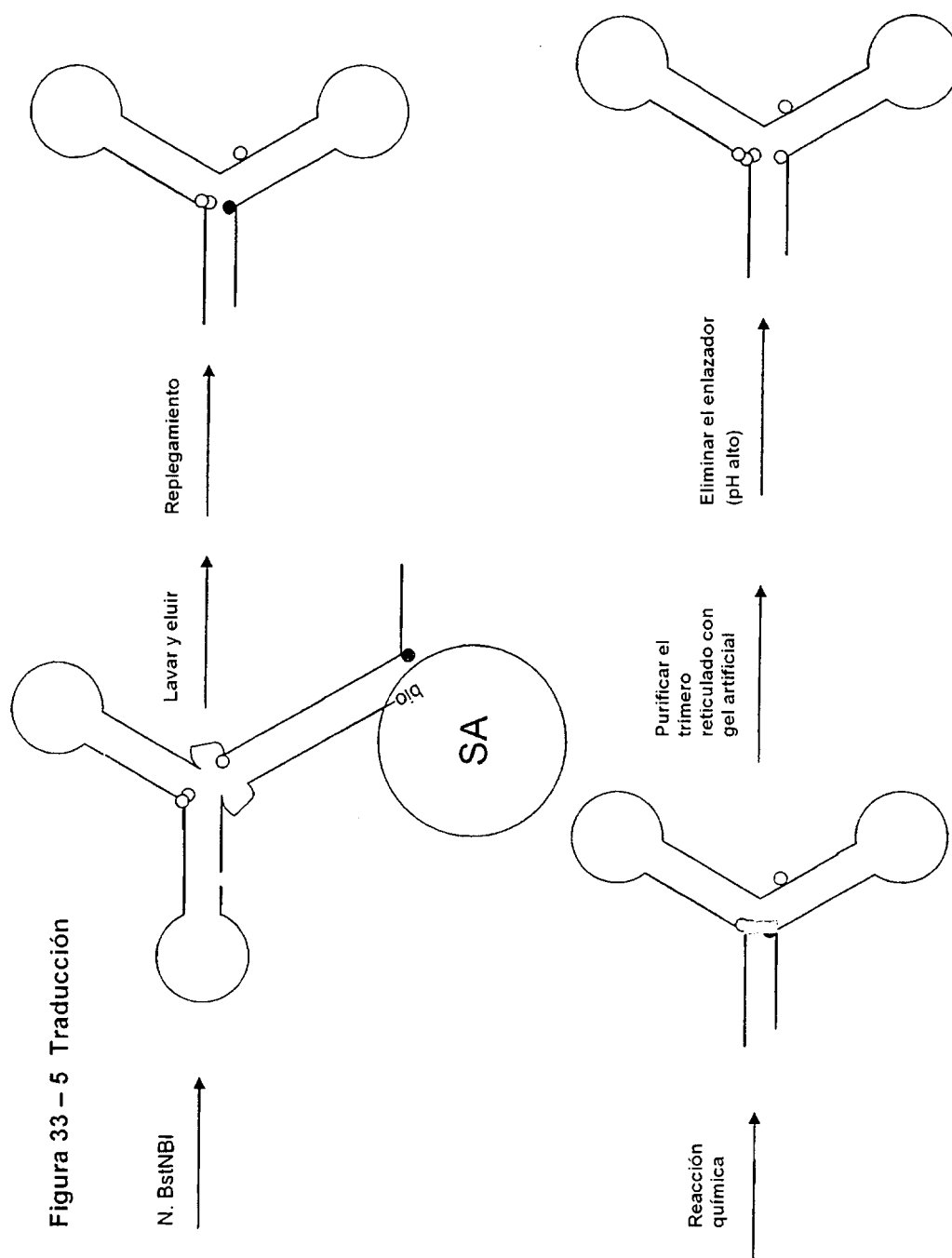


Figura 33 – 5 Traducción

Figura 33 – 6 Traducción

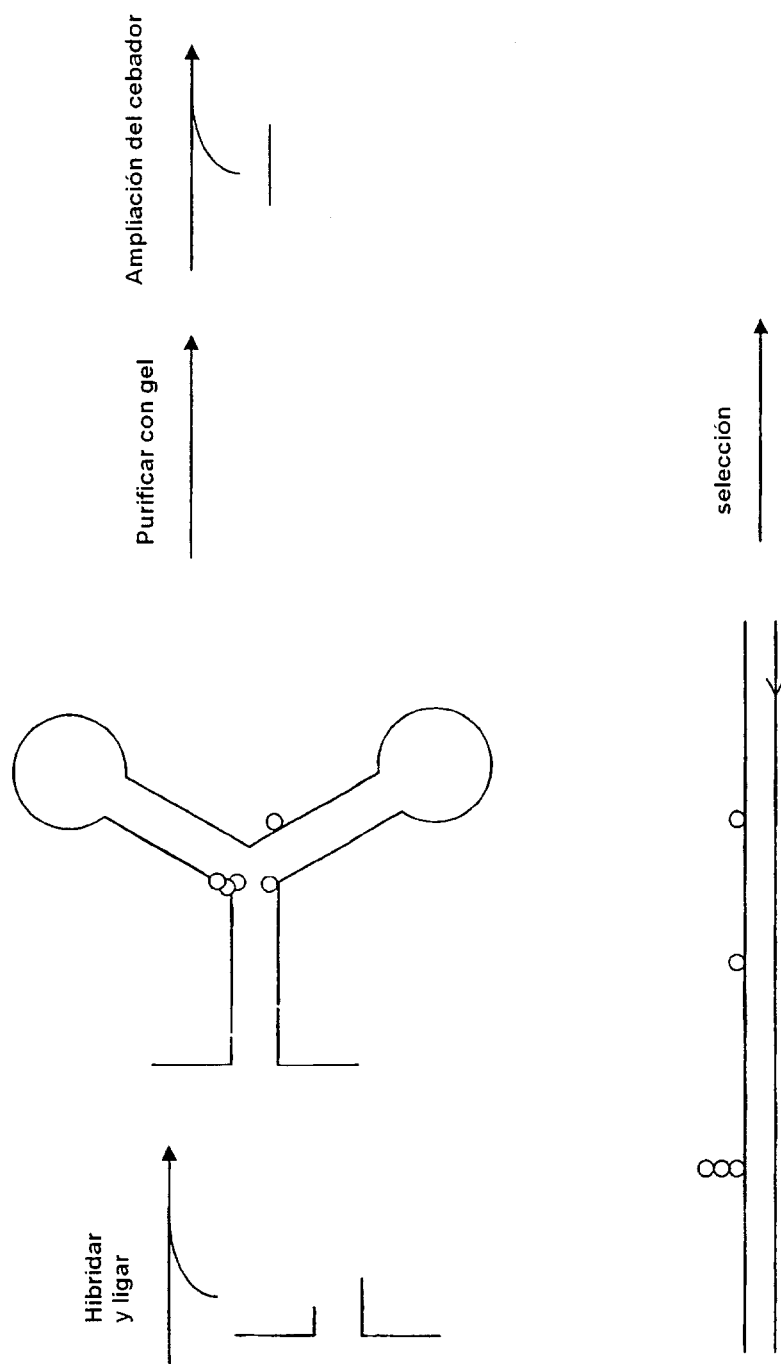


Figura 34

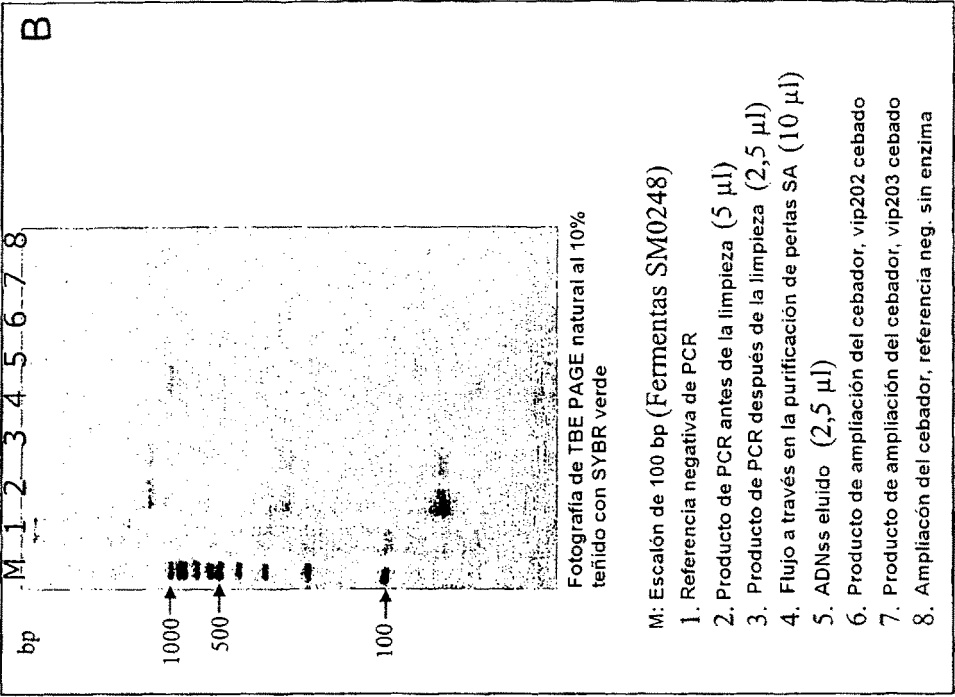
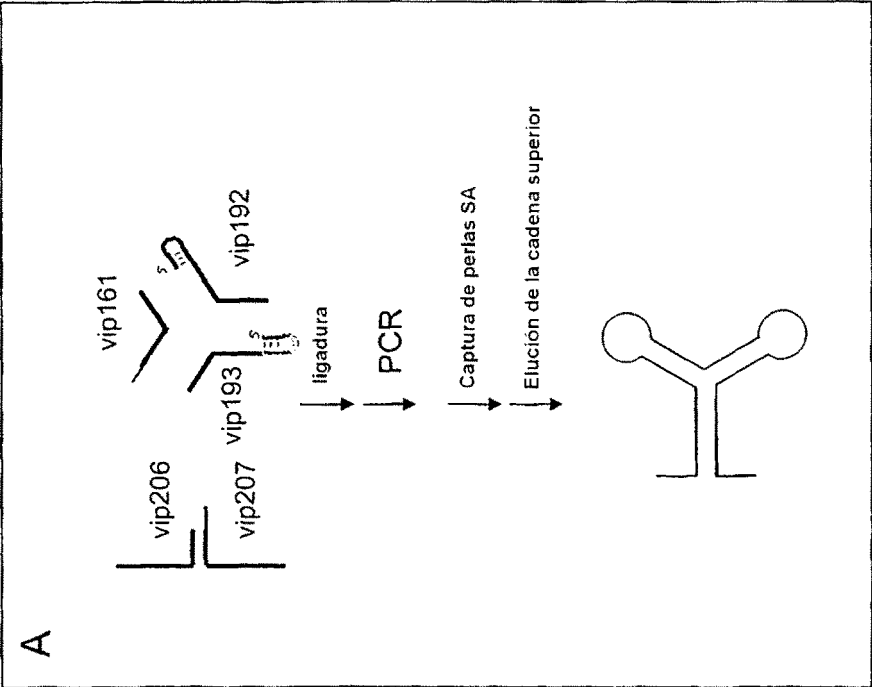
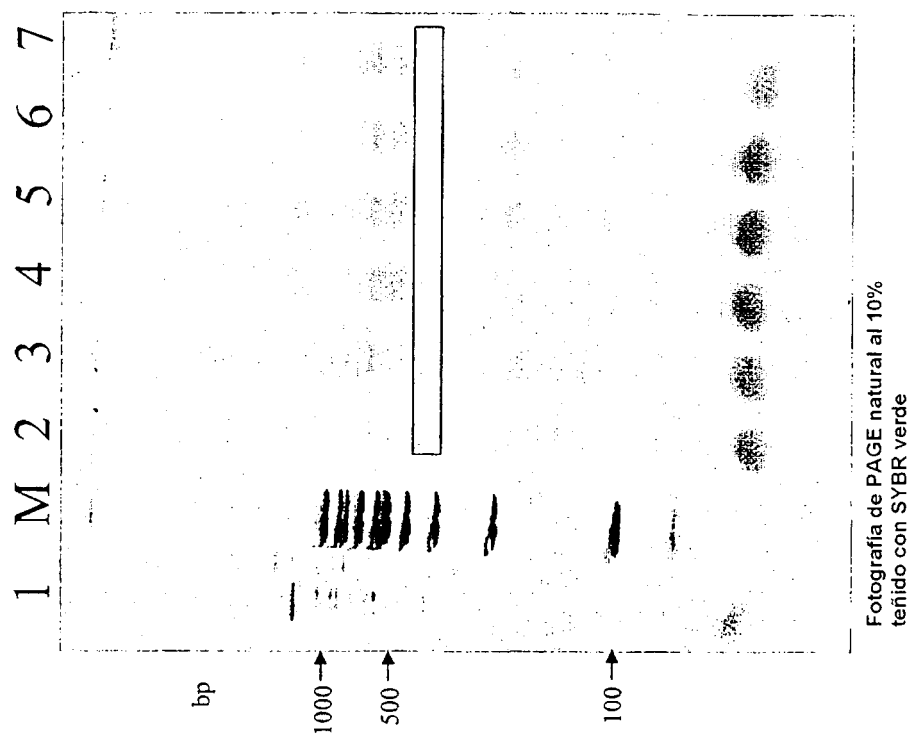


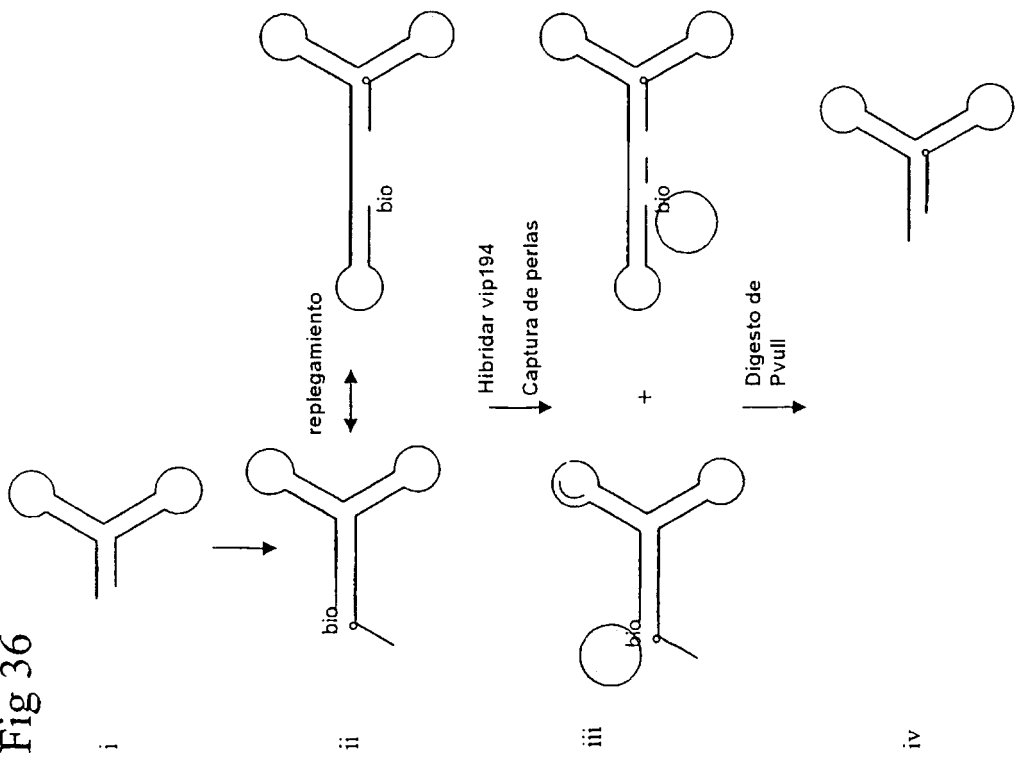
Fig 35

1. material de partida sin cortar
M: Escalón de 100 bp (Fermentas SM0248)
2-7. Bsa I digesto



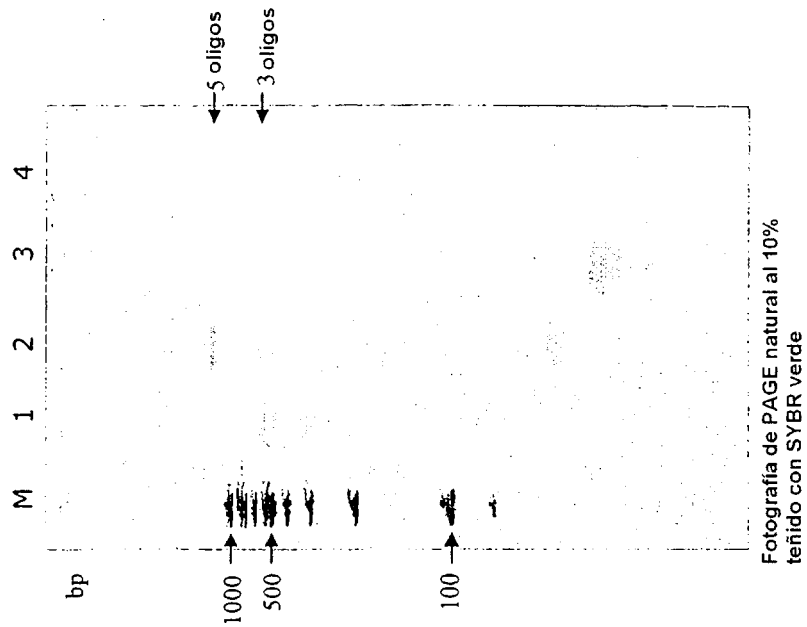
Pieza de gel encasillada aislada

Fig 36



M: Escalón de 100 bp (Fermentas SM0248)

1. Trímico (i)
2. Trímico con nuevo oligo en posición 1 y oligo cooperador ligado (ii)
3. Perlas tras el digesto de Pvu II
4. Sobrenadante procedente del digesto de Pvu II (iv)



Fotografía de PAGE natural al 10%
teñido con SYBR verde

ES 2 320 361 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Vipergen Pharmaceuticals Aps	
5	<120> Síntesis química guiada por el ácido nucleico estructural	
	<130> 130636	
10	<160> 49	
	<170> Versión PatentIn 3.3	
15	<210> 1	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Síntesis artificial	
	<220>	
25	<221> misc_feature	
	<223> 5'P	
30	<400> 1	
	ctcgttttcg agaccgactc tggaagtgc accg gatctg g	41
35	<210> 2	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Síntesis artificial	
45	<220>	
	<221> nisc_feature	
	<223> 5'P	
50	<400> 2	
	ttggaaaaac caaccagatc cggtagctgt caaggctgag gt	42
55	<210> 3	
	<211> 42	
	<212> ADN	
60	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Síntesis artificial	
65	<220>	
	<221> misc_feature	

ES 2 320 361 T3

	<223> 5'P	
	<400> 3	
5	gagggagagc ctcacctcag ccttgactct tccagagtcg gt	42
	<210> 4	
10	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Síntesis artificial	
	<220>	
20	<221> misc_feature	
	<223> 5'P	
	<400> 4	
25	gagggagagc ctcacctcag ccttgactgg agaacgcatt ct	42
	<210> 5	
30	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> Síntesis artificial	
	<220>	
40	<221> misc_feature	
	<223> 5'P	
	<400> 5	
45	acacaagaag tgtagaatgc gttctcctct tccagagtcg gt	42
	<210> 6	
50	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> Síntesis artificial	
	<220>	
60	<221> misc_feature	
	<222> (27)..(27)	
	<223> n=amina-C6-dT	
65		

ES 2 320 361 T3

<400> 6

ctcgttttcg agaccgactc tggaagngtc accggatctg g

41

5

<210> 7

<211> 42

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Síntesis artificial

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (28)..(28)

20

<223> n=amina-C6-dT

<400> 7

25

ttggaaaaac caaccagatc cggtagacngt caaggctgag gt

42

<210> 8

<211> 42

30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35

<223> Síntesis artificial

<220>

40

<221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> n=amina-C6-dT

45

<400> 8

gaggagagac ctcacctcag ccttgacnct tccagagtcg gt

42

50

<210> 9

<211> 42

<212> ADN

<213> Artificial

55

<220>

<223> Síntesis artificial

60

<220>

<221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> n=amina-C6-dT

65

ES 2 320 361 T3

<400> 9		
	gagggagagc ctcacctcag ccttgacngg agaacgcatt ct	42
5	<210> 10	
	<211> 42	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Síntesis artificial	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (28)..(28)	
20	<223> n=amina-C6-dT	
	<400> 10	
25	acacaagaag tgtagaatgc gttctccnct tccagagtcg gt	42
	<210> 11	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> Síntesis artificial	
	<400> 11	
40	actatgaggg ctgtctgtgg	20
	<210> 12	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223> Síntesis artificial	
	<400> 12	
55	tagcaagccc aataggaacc	20
	<210> 13	
	<211> 30	
60	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
65	<223> Síntesis artificial	

ES 2 320 361 T3

<400> 13

actatgaggg ctgtctgtgg cagtcacgag

30

5

<210> 14

<211> 34

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Síntesis artificial

15

<220>

<221> misc_feature

<223> 5' P

20

<400> 14

aaaactcgtg actgggttcc tattgggctt gcta

34

25

<210> 15

<211> 37

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> Síntesis artificial

35

<220>

<221> misc_feature

<223> 5'P

40

<400> 15

tttgcgagac cgactctgga agtgtcaccc gatctgg

37

45

<210> 16

<211> 20

<212> ADN

50 <213> Artificial

<220>

<223> Síntesis artificial

55

<220>

<221> nusc_feature

<223> 5'biotiniladas

60

<400> 16

actatgaggg ctgtctgtgg

20

65

<210> 17

ES 2 320 361 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Síntesis artificial	
10	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 5'biotiniladas	
15	<400> 17	
	tagcaagccc aataggaacc	20
20	<210> 18	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Síntesis artificial	
30	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11)..(11)	
35	<223> n=amina-C6-dT	
	<400> 18	
40	actctggaag ngtcaccgga t	21
	<210> 19	
	<211> 48	
45	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223> Síntesis artificial	
	<220>	
	<221> misc_feature	
55	<223> 5'P	
	<220>	
	<221> misc_feature	
60	<222> (34)..(34)	
	<223> n=amina-C6-dT	
	<400> 19	
65	gagggagagc ctcacctcag ccttgacaca cacnctcca gagtcggt	48

ES 2 320 361 T3

	<210> 20	
	<211> 48	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Síntesis artificial	
10	<400> 20	
	ctcgtttctg agaccgactc tggaagagtg tgtgtcacc ggatctgg	48
15	<210> 21	
	<211> 21	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Síntesis artificial	
25	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11)..(11)	
30	<223> n=amina-C6-dT	
	<400> 21	
35	cagccttgac ncttcagag t	21
	<210> 22	
	<211> 34	
40	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223> Síntesis artificial	
	<400> 22	
50	ctctctcgtg actgggttc tattgggctt gcta	34
	<210> 23	
	<211> 25	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> Síntesis artificial	
	<220>	
65	<221> mise_feature	
	<222> (11)..(11)	
	<223> n=amina-C6-dT	

ES 2 320 361 T3

	<400> 23	
	actctggaag ngtcaccgga tctgg	25
5	<210> 24	
	<211> 58	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Síntesis artificial	
15	<400> 24	
	gaggagagc ctcacctcag ccttgactct tccagagtgg ttctattgg gcttgcta	58
20	<210> 25	
	<211> 48	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Síntesis artificial	
30	<400> 25	
	ttgaaaaac caaccagatc cgggtactgt gtgtgtcaag gctgaggt	48
35	<210> 26	
	<211> 52	
	<212> ADN	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Síntesis artificial	
45	<400> 26	
	gaggagagc ctcacctcag ccttgacaca cactctcca gagtcggtct cg	52
50	<210> 27	
	<211> 35	
	<212> ADN	
55	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Síntesis artificial	
60	<400> 27	
	agagcgagac cgactctgga agtgtcaccg gatct	35
65	<210> 28	
	<211> 68	

ES 2 320 361 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Síntesis artificial	
	<400> 28	
10	ggttggcagg gccactagc tcaggatcca cccaaccaga tccggtgact gtgtgtgtca	60
	aggctgag	68
15	<210> 29	
	<211> 74	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Síntesis artificial	
25	<400> 29	
	gtgaggctga attctctgta cctggtacct ccctcacctc agccttgaca cacactcttc	60
30	cagagtcggt ctcg	74
	<210> 30	
	<211> 10	
35	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> Síntesis artificial	
	<400> 30	
45	gtgggccctg	10
	<210> 31	
	<211> 10	
50	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> Síntesis artificial	
	<400> 31	
60	gtggatcctg	10
	<210> 32	
	<211> 68	
65	<212> ADN	
	<213> Artificial	

ES 2 320 361 T3

	<220>		
	<223> Síntesis artificial		
5	<400> 32		
	ggttggcaca gctgactagc tcagagctca cccaaccaga tccggtgact gtgtgtgtca	60	
	aggctgag	68	
10	<210> 33		
	<211> 74		
	<212> ADN		
15	<213> Artificial		
	<220>		
20	<223> Síntesis artificial		
	<400> 33		
	gtgaggctcc cgggtctgta cctattaatt cctcacctc agccttgaca cacactcttc	60	
25	cagagtcggt ctcg	74	
	<210> 34		
30	<211> 10		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
35	<220>		
	<223> Síntesis artificial		
	<400> 34		
40	gtcagctgtg		10
	<210> 35		
45	<211> 10		
	<212> ADM		
	<213> Artificial		
50	<220>		
	<223> Síntesis artificial		
	<400> 35		
55	gtgagctctg		10
	<210> 36		
60	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
65	<220>		
	<223> Oligonucleótidos derivados opcionalmente sintetizados químicamente		

ES 2 320 361 T3

	<220>	
	<221> 5'biotiniladas	
	<222> (1)..(1)	
5	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1)	
10	<223> n is a, c, g, or t	
	<400> 36	
15	ncttcagag tcggtctcg	19
	<210> 37	
	<211> 22	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótidos derivados opcionalmente sintetizados químicamente	
	<220>	
30	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1)	
	<223> n= 5' biotina	
35	<400> 37	
	ncagccttga ctctccaga gt	22
40	<210> 38	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> Oligonucleótidos derivados opcionalmente sintetizados químicamente	
50	<400> 38	
	caggtcgctg agaggttgac	20
55	<210> 39	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> Oligonucleótidos derivados opcionalmente sintetizados químicamente	
65	<400> 39	
	acgtccgagt cagaagtggtg	20

ES 2 320 361 T3

	<210> 40	
	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótidos derivados opcionalmente sintetizados químicamente	
10	<400> 40	
	caggtcgctg agagggtgac cagtcacgag	30
15	<210> 41	
	<211> 34	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótidos derivados opcionalmente sintetizados químicamente	
25	<400> 41	
	ctctctcgctg actgcacact tctgactcgg acgt	34
30	<210> 42	
	<211> 21	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótidos derivados opcionalmente sintetizados químicamente	
40	<220>	
	<221> misc_feature	
45	<222> (1)..(1)	
	<223> n= 5' biotina	
	<400> 42	
50	nacgtccgag tcagaagtgt g	21
	<210> 43	
55	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> Oligonucleótidos derivados opcionalmente sintetizados químicamente	
	<220>	
65	<221> misc_feature	
	<222> (23)..(23)	
	<223> n=NH2-C6-dT	

ES 2 320 361 T3

<400> 43

agagcgagac cgactctgga agngtcaccg gatct

35

5

<210> 44

<211> 35

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótidos derivados opcionalmente sintetizados químicamente

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)..(23)

20 <223> n=NH2-C6-dT

<400> 44

25

tttcgagac cgactctgga agngtcaccg gatct

35

<210> 45

<211> 68

30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35

<223> Oligonucleótidos derivados opcionalmente sintetizados químicamente

<220>

40

<221> misc_feature

<222> (56)..(56)

<223> n=NH2-C6-dT

45

<400> 45

ggttggcaca gctgactagc tcagagctca cccaaccaga tccggtgact gtgtgngtca

60

aggctgag

68

50

<210> 46

<211> 74

<212> ADN

55

<213> Artificial

<220>

60

<223> Oligonucleótidos derivados opcionalmente sintetizados químicamente

<220>

<221> misc_feature

65

<222> (56)..(56)

<223> n=NH2-C6-dT

ES 2 320 361 T3

	<400> 46	
	gtgaggtccc cgggtctgta cctattaatt ccctcacctc agccttgaca cacacncttc	60
5	cagagtcggt ctcg	74
	<210> 47	
	<211> 68	
10	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> Oligonucleótidos derivados opcionalmente sintetizados químicamente	
	<220>	
	<221> misc_feature	
20	<222> (56)..(56)	
	<223> n=NH2-C6-dT	
	<400> 47	
25	gggtggcaca gctgacaaaa acagagctca cccaaccaga tccggtgact gtgtgngtca	60
	aggctgag	68
30	<210> 48	
	<211> 74	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótidos derivados opcionalmente sintetizados químicamente	
40	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (56)..(56)	
45	<223> n=NH2-C6-dT	
	<400> 48	
50	gtgaggtccc cgggtcgaga gctattaatt ccctcacctc agccttgaca cacacncttc	60
	cagagtcggt ctcg	74
55	<210> 49	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> Oligonucleótidos derivados opcionalmente sintetizados químicamente	
65	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (23)..(23)	

ES 2 320 361 T3

<223> n=NH2-C6-dT

<400> 49

5 ctctcgagac cgactctgga agngtcaccg gatctggttg ggtgagctct g

51

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65