



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 365 534**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C07B 61/00 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06784718 .6**

(96) Fecha de presentación : **09.06.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1910538**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2008**

(54) Título: **Procedimientos para la síntesis de bibliotecas codificadas.**

(30) Prioridad: **09.06.2005 US 689466 P**
28.10.2005 US 731041 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.10.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.10.2011

(73) Titular/es: **Praecis Pharmaceuticals Inc.**
830 Winter Street
Waltham, Massachusetts 02451-1420, US

(72) Inventor/es: **Morgan, Barry;**
Hale, Stephen;
Arico-Muendel, Christopher C.;
Clark, Matthew;
Wagner, Richard;
Kavarana, Malcolm J.;
Creaser, Steffen, Phillip;
Franklin, George J.;
Centrella, Paolo A.;
Israel, David I.;
Gefter, Malcolm L.;
Benjamin, Dennis;
Hansen, Nils Jakob Vest y
Acharya, Raksha A.

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Procedimientos para la síntesis de bibliotecas codificadas

Antecedentes de la invención

- La búsqueda de procedimientos más eficientes para identificar compuestos que tienen actividades biológicas útiles ha llevado al desarrollo de procedimientos para la selección de vastas cantidades de compuestos distintos, presentes en las colecciones denominadas como bibliotecas combinatorias. Tales bibliotecas pueden incluir 105 o más compuestos distintos. Existe una variedad de procedimientos para producir bibliotecas combinatorias, y se ha informado la síntesis combinatoria de péptidos, peptidomiméticos y moléculas orgánicas pequeñas.
- El documento WO 2004/039825 se refiere a codificación enzimática. El documento describe un procedimiento para obtener un complejo bifuncional que comprende un parte de molécula de despliegue y una parte codificadora, en el que un complejo bifuncional naciente que comprende un sitio de reacción químico y un sitio de activación para la adición enzimática de una marca reacciona en el sitio de reacción química con uno o más reactivos, y siempre que las marcas respectivas identifiquen los reactantes en el sitio de activación por medio de una o más enzimas. En una variedad de pocillos, se dispensa un complejo bifuncional naciente que tiene un grupo reactivo (Rx) unido a un oligonucleótido (línea horizontal). En una primera etapa, el grupo reactivo de cada compartimiento reacciona con un reactante, en una segunda etapa un oligonucleótido del codón y una férula se añaden juntos con una ligasa para ligar de modo covalente el oligonucleótido del codón al complejo bifuncional naciente reaccionado, y en una tercera etapa se recupera el producto de ligamiento. El contenido de los pocillos se puede combinar posteriormente y usar como una biblioteca de complejos bifuncionales o se recicla para otra ronda de reacción y adición de marca. Opcionalmente, el ligamiento se produce entre dos oligonucleótidos de cadena doble, es decir, un oligonucleótido del armazón de cadena doble con una proyección ("extremo adhesivo") se liga a un oligonucleótido bicatenario del codón provisto con una proyección complementaria. El tipo de ligamiento depende de la enzima seleccionada. El ligamiento de la cadena doble es más rápido debido al efecto guía del oligonucleótido que complementan los extremos. El oligonucleótido de complementación también se denomina como la férula oligonucleótido. Después, antes o en forma simultánea con el ligamiento del oligonucleótido del codón al oligonucleótido del armazón ocurre una reacción entre el reactivo libre y el armazón. Se puede usar ligamiento enzimático o químico único (sin un oligonucleótido férula o formador de puente) o bicatenario (usando T4 ligasa).
- El documento WO 93/20242 se refiere a bibliotecas químicas combinatorias codificadas. El documento describe un procedimiento para sintetizar el complejo bifuncional que tiene una molécula codificada y un polinucleótido identificador capaz de identificar entidades químicas que participan en la síntesis de la molécula codificada, donde la molécula codificada se genera por la reacción de al menos dos de varias entidades químicas asociadas con un polinucleótido identificador, y las entidades químicas se proporcionan por bloques de construcción separados. La biblioteca de complejos bifuncionales comprende 1.000 o más miembros diferentes, tales como 105 o 1012 miembros diferentes.
- El documento WO 2004/083427 se refiere a la codificación por ligamiento de moléculas pequeñas. El documento describe una biblioteca de moléculas bifuncionales que proporciona un repertorio de diversidad química tal que cada resto químico se liga a una marca genética que facilita la identificación de una estructura química. La biblioteca se puede usar para identificar una estructura química que participa en una unión preseleccionada o reacción de catálisis con una molécula biológicamente activa.
- Li Xiaoyu et al., J. American Chemical Soc., 126, 5090-5092, (2004) se refiere a la traducción del ADN en N-aciloxazolidinas sintéticas. El documento describe la traducción del ADN en N-aciloxazolidinas sintéticas, en que se sintetizan moléculas químicas intermedias de fórmula (YCF)(DAX)(ZBE)S.
- Gartner Zev et al., Science, 305, 1601-1605, (2004) se refiere a la síntesis orgánica templada por ADN y la selección de una biblioteca de macrociclos. El documento describe la síntesis orgánica templada por ADN para traducir bibliotecas de secuencias de ADN, cada una contiene tres "codones", en bibliotecas de macrociclos de molécula pequeña sintética programada por la secuencia. Los conjugados de ADN-macrocielo resultantes se sometieron a selecciones in vitro para la afinidad de proteínas.
- Kanan et al., Nature, 431, 545-549, (2004) se refiere al descubrimiento de la reacción permitida por la síntesis templada por ADN y selección in vitro. El documento describe un método de descubrimiento de reacción que usa la síntesis orgánica templada por ADN y la selección in vitro para evaluar simultáneamente muchas combinaciones de sustratos diferentes para las reacciones de formación de enlaces en una solución única.
- Calderone et al., Current Opinion in Chemical Biology, 8, 645-653, (2004) se refiere a la síntesis templada con ácido nucleico como sistema modelo para traducción antigua. El documento describe la traducción de ácidos nucleicos en estructuras sintéticas con potencial funcional expandido.
- Calderone et al., Angewandte Chemie Int Ed., 41, 4104-4108, (2002) [ilegible] que dirige de otro modo reacciones incompatibles en una solución única por medio de la síntesis orgánica templada con ADN.

El documento WO 2004/016767 se refiere al desarrollo de la nueva función molecular. El documento describe procedimientos para realizar síntesis templada por ácidos nucleicos (NAT), aumentar la selectividad de las reacciones NAT, realizar reacciones NAT estereoselectivas, seleccionar productos de reacción resultantes de la síntesis de NAT e identificar nuevas reacciones químicas basadas en la síntesis de NAT.

- 5 Gryaznov et al., J. Amer. Chem. Soc., 115, 3808-3809, (1993) y Czlapinski et al., 123, 8618-8619, (2001) describe el ligamiento químico de los oligonucleótidos en presencia y ausencia de un molde.

El documento WO 2005/026387 se refiere a un procedimiento para obtener información estructural concerniente a una molécula codificada. El documento describe un procedimiento para identificar (MI) la molécula de despliegue que tiene afinidad con el blanco molecular, por la mezcla del blanco molecular asociado con los oligonucleótidos blanco, con una biblioteca de complejo bifuncionales que tiene moléculas de despliegue unido a los oligonucleótidos del identificador, acoplamiento de identificadores de complejos, con oligonucleótidos blanco, y deducir la identidad de las moléculas de despliegue y/o blancos moleculares de unión a partir de productos acoplados de identificadores y oligonucleótidos blanco.

Los dos mayores desafíos en el uso de métodos combinatorios para el descubrimiento de fármaco son la síntesis de bibliotecas de suficiente complejidad y la identificación de moléculas que son activas en las pruebas usadas. En general se reconoce que a mayor grado de complejidad de una biblioteca, es decir, el número de estructuras distintas presentes en la biblioteca, mayor probabilidad de que la biblioteca contenga moléculas con la actividad de interés. En consecuencia, las reacciones químicas empleadas en la síntesis de la biblioteca deben ser capaces de producir grandes cantidades de compuestos en un marco de tiempo razonable. Sin embargo, para una concentración formal o global determinada, el aumento de la cantidad de miembros diferentes dentro de la biblioteca reduce la concentración de cualquier miembro de biblioteca particular. Esto complica la identificación de moléculas activas de las bibliotecas de alta complejidad.

Un método para vencer estos obstáculos ha sido el desarrollo de bibliotecas codificadas, y en particular bibliotecas en las que cada compuesto incluye una marca amplificable. Tales bibliotecas incluyen bibliotecas codificadas por ADN, en las que una marca de ADN que identifica un miembro de la biblioteca se puede amplificar por medio de técnicas de biología molecular, tales como la reacción en cadena de polimerasa. Sin embargo, el uso de tales procedimientos para producir bibliotecas muy grandes ya está demostrado, y es claro que se requieren mejores procedimientos para producir tales bibliotecas para la realización del potencial de este método para el descubrimiento del fármaco.

30 **Compendio de la invención**

La presente invención proporciona un procedimiento de sintetizar moléculas definidas en las reivindicaciones anexas. El procedimiento utiliza un abordaje "dividir y mezclar" en el que una solución que comprende un iniciador, que comprende un primer bloque de construcción ligado a un oligonucleótido codificador, se reparte ("dividir") en múltiples fracciones. En cada fracción, el iniciador se hace reaccionar con un segundo bloque de construcción único y un segundo oligonucleótido único que identifica el segundo bloque de construcción. Estas reacciones pueden ser simultáneas o secuenciales y, si es secuencial, cualquier reacción puede preceder a la otra. Las moléculas dimericas producidas en cada una de las fracciones se combinan ("mezclar") y posteriormente se dividen otra vez en múltiples fracciones. Cada una de estas fracciones posteriormente se hacen reaccionar con un tercer bloque de construcción único (específico de fracción) y un tercer oligonucleótido único que codifica el bloque de construcción. La cantidad de moléculas únicas presentes en la biblioteca producto es una función de (1) la cantidad de diferentes bloques de construcción usados en cada etapa de síntesis, y (2) la cantidad de veces que se repite el proceso de mezcla y división.

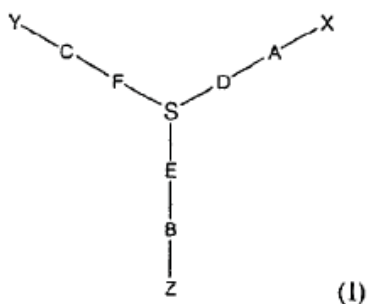
En una realización, la invención proporciona un procedimiento de sintetizar una molécula que comprende o que consiste en un resto funcional que está unido operativamente a un oligonucleótido codificador. El procedimiento incluye las etapas de: (a) proporcionar un compuesto iniciador que consiste en un resto funcional inicial que comprende n bloques de construcción, donde n es un número entero de 1 o mayor, en el que el resto funcional inicial comprende al menos un grupo reactivo, y está unido operativamente a un oligonucleótido inicial, en el que el resto funcional inicial comprende al menos un grupo reactivo, y está unido operativamente a un oligonucleótido inicial; en el que el resto funcional inicial y el oligonucleótido inicial se unen con a resto ligador y en el que el oligonucleótido inicial es bicatenario y el resto ligador se acopla covalentemente al resto funcional inicial y a ambas cadenas del oligonucleótido inicial; (b) hacer reaccionar el compuesto iniciador con un bloque de construcción deseado que comprende al menos un grupo reactivo complementario, en el que al menos un grupo reactivo complementario es complementario con el grupo reactivo de la etapa (a), en condiciones adecuadas para la reacción del grupo reactivo complementario para formar un enlace covalente; (c) hacer reaccionar el oligonucleótido inicial con un oligonucleótido entrante que identifica el bloque de construcción de la etapa (b) en presencia de una enzima que cataliza el ligamiento del oligonucleótido inicial y el oligonucleótido entrante, en condiciones adecuadas para el ligamiento del oligonucleótido entrante y el oligonucleótido inicial para formar un oligonucleótido codificador, en el que el último de dichos oligonucleótidos entrantes comprenden una secuencia capuchón, dicha secuencia capuchón que comprende una secuencia de nucleótidos que contiene nucleótidos degenerados; de este modo se produce una molécula que comprende un resto funcional que comprende n+1 bloques de construcción que están unidos

operativamente a un oligonucleótido codificador que identifica la estructura de el resto funcional. El resto funcional de la etapa (c) comprende un grupo reactivo, las etapas (a)-(c) se repiten una o más veces, de este modo forman los ciclos 1 a i, donde i es un número entero de 2 o mayor, con el producto de la etapa (c) de un ciclo s, donde s es un número entero de i-1 o menos, que es el compuesto iniciador del ciclo s + 1.

5 En una realización, la invención proporciona un procedimiento de sintetizar una biblioteca de compuestos, en la que los compuestos comprenden un resto funcional que comprende dos o más bloques de construcción que están unidos operativamente a un oligonucleótido que identifica la estructura del resto funcional. El procedimiento comprende las etapas de (a) proporcionar una solución que comprende m iniciadores del compuesto de la reivindicación 1, en el que m es un número entero de 1 o mayor; (b) dividir la solución de la etapa (a) en r recipientes de reacción, en el que r es un número entero de 2 o mayor, de este modo se producen r alícuotas de la solución; (c) hacer reaccionar los iniciadores del compuesto en cada recipiente de reacción con uno de los r bloques de construcción, dichos bloques de construcción que comprenden al menos un grupo reactivo complementario, en el que al menos un grupo reactivo complementario es complementario con el grupo reactivo de la etapa (a), en condiciones adecuadas para reacción del grupo reactivo complementario para formar un enlace covalente, de este modo se producen r alícuotas que comprenden compuestos que consiste en a resto funcional que comprende n+1 bloques de construcción unido operativamente al oligonucleótido inicial; y (d) hacer reaccionar el oligonucleótido inicial en cada alícuota con uno de un conjunto de r oligonucleótidos entrantes distintos correspondientes al bloque de construcción de la etapa (c) en presencia de una enzima que cataliza el ligamiento del oligonucleótido entrante y el oligonucleótido inicial, en condiciones adecuadas para el ligamiento enzimático del oligonucleótido entrante y el oligonucleótido inicial para formar un oligonucleótido codificador, en el que el último de dichos r oligonucleótidos entrantes distintos comprende una secuencia capuchón, dicha secuencia capuchón que comprende una secuencia de nucleótidos que contiene nucleótidos degenerados; de este modo se producen r alícuotas que comprenden moléculas que consiste en un resto funcional que comprende n+1 bloques de construcción unidos operativamente a un oligonucleótido codificador que identifica la estructura de el resto funcional que comprende los n+1 bloques de construcción. Opcionalmente, el procedimiento también puede incluir la etapa de (e) recombinar las r fracciones producidas en la etapa (d), de este modo se produce una solución que comprende compuestos que consisten en un resto funcional que comprende n + 1 bloques de construcción, que están unidos operativamente a un oligonucleótidos alargado. Las etapas (a) a (e) se pueden realizar una o más veces para producir los ciclos 1 a i, donde i es un número entero de 2 o mayor. En el ciclo s+1, donde s es un número entero de i-1 o menor, la solución que comprende m iniciadores del compuesto de la etapa (a) es la solución de la etapa (e) del ciclo s. Asimismo, los iniciadores del compuesto de la etapa (a) del ciclo s+1 son los compuestos de la etapa (e) del ciclo s.

En una realización preferida, los bloques de construcción se acoplan en cada etapa por medio del uso de reacciones químicas convencionales. Los bloques de construcción se pueden acoplar para producir polímeros u oligómeros lineales o ramificados, tales como péptidos, peptidomiméticos, y peptoides, o moléculas no oligoméricas, tales como moléculas que comprenden una estructura del armazón la que se que unen uno o más restos químicos adicionales. Por ejemplo, si los bloques de construcción son residuos de aminoácidos, los bloques de construcción se pueden acoplar por medio de abordajes de síntesis de péptidos estándar, tales como síntesis en fase de solución o fase sólida por medio de abordajes de protección/desprotección adecuadas que son conocidos en el campo. Preferiblemente, los bloques de construcción se acoplan por medio de reacciones químicas que usan reacciones químicas en fase de solución. Los oligonucleótidos codificadores son oligonucleótidos de monocatenarios o bicatenarios, preferiblemente oligonucleótidos bicatenario. Los oligonucleótidos codificadores son preferiblemente oligonucleótidos de 4 a 12 bases o pares de bases por bloque de construcción; los oligonucleótidos codificadores se pueden acoplar por medio de metodología estándar de síntesis de oligonucleótidos fase en solución y fase sólida, pero preferiblemente se acoplan por medio de un proceso enzimático en fase de solución. Por ejemplo, los oligonucleótidos se pueden acoplar por medio de una topoisomerasa, una ligasa, o una ADN polimerasa, si la secuencia de oligonucleótidos codificadores incluye una secuencia de iniciación para el ligamiento con una de estas enzimas. El acoplamiento enzimático de los oligonucleótidos codificadores ofrece las ventajas de (1) mayor precisión de la adición en comparación con el acoplamiento de síntesis estándar (no enzimático); y (2) el uso de un abordaje más simple de protección/desprotección.

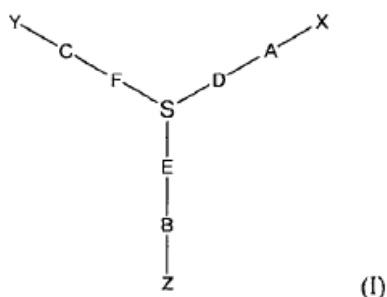
50 Los compuestos que tiene la Fórmula I se describen en la presente memoria.



donde X es un resto funcional que comprende uno o más bloques de construcción; Z es un oligonucleótido unido a su extremo 3' terminal a B; Y es un oligonucleótido unido a su extremo 5' terminal a C; A es un grupo funcional que forma un enlace covalente con X; B es un grupo funcional que forma un enlace con el extremo 3' de Z; C es un grupo funcional que forma un enlace con el extremo 5' de Y; D, F y E son cada uno, de modo independiente, un grupo de unión bifuncional; y S un átomo o un armazón molecular. Tales compuestos incluyen los que se sintetizan por medio de los procedimientos de la invención.

En la presente memoria se describe una biblioteca de compuestos que comprende compuestos que comprenden un resto funcional que comprende dos o más bloques de construcción que están unidos operativamente a un oligonucleótido que codifica la estructura del resto funcional. Tales bibliotecas pueden comprender de aproximadamente 102 a aproximadamente 1012 o más miembros distintos, por ejemplo, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 1010, 1011, 1012 o más miembros distintos, es decir, distintas estructuras moleculares.

La biblioteca de compuestos puede comprender compuestos que son de modo independiente de Fórmula I:



donde X es un resto funcional que comprende uno o más bloques de construcción; Z es un oligonucleótido unido a su extremo 3' terminal a B; Y es un oligonucleótido unido a su extremo 5' terminal a C; A es un grupo funcional que forma un enlace covalente con X; B es un grupo funcional que forma un enlace con el extremo 3' de Z; C es un grupo funcional que forma un enlace con el extremo 5' de Y; D, F y E son cada uno de modo independiente, un grupo de unión bifuncional; y S un átomo o un armazón molecular. Tales bibliotecas incluyen las que se sintetizan por medio de los procedimientos de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para identificar un compuesto que se une a un blanco biológico, dicho procedimiento que comprende las etapas de: (a) poner en contacto con el blanco biológico con una biblioteca de compuestos preparada por el procedimiento de la invención, donde la biblioteca de compuestos incluye compuestos que comprenden un resto funcional que comprende dos o más bloques de construcción que están unidos operativamente a un oligonucleótido que codifica la estructura del resto funcional. Esta etapa se realiza en condiciones adecuadas para al menos un miembro de la biblioteca de compuestos que une al blanco; (2) eliminar miembros de la biblioteca que no se unen al blanco; (3) amplificar los oligonucleótidos codificadores del al menos un miembro de la biblioteca de compuestos que se une al blanco; (4) secuenciar los oligonucleótidos codificadores de la etapa (3); y usar las secuencias determinadas en la etapa (5) para determinar la estructura de los restos funcionales de los miembros de la biblioteca de compuestos que se unen al blanco biológico.

La presente invención proporciona varias ventajas en la identificación de moléculas que tienen una propiedad deseada. Por ejemplo, los procedimientos de la invención permiten el uso de una variedad de reacciones químicas para construir las moléculas en presencia de la marca del oligonucleótido. Los procedimientos de la invención también proporcionan un medio de alta fidelidad para incorporar marcas de oligonucleótido en las estructuras químicas así producidas. Además, ellos permiten la síntesis de bibliotecas que tienen una gran cantidad de copias de cada miembro, de este modo permiten múltiples rondas de selección contra un blanco biológico mientras que deja una cantidad suficiente de moléculas después de la ronda final de amplificación y secuencia de las marcas de oligonucleótido.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática del ligamiento de oligonucleótidos bicatenarios, en los que el oligonucleótido inicial tiene una proyección que es complementaria con la proyección del oligonucleótido entrante. La cadena inicial se representa como libre, conjugada con un ligador aminohexilo o conjugada con un residuo de fenilalanina por medio de un ligador aminohexilo.

La Figura 2 es una representación esquemática del ligamiento de oligonucleótido por medio de la cadena férula. En esta realización, la férula es un oligonucleótido de 12-mer con secuencias complementarias con el oligonucleótidos monocatenario inicial y el oligonucleótido entrante.

La Figura 3 es una representación esquemática del ligamiento de un oligonucleótido inicial y un oligonucleótido entrante, cuando el oligonucleótido inicial es bicatenario con cadenas unidas en forma covalente, y el oligonucleótido entrante es bicatenario.

La Figura 4 es una representación esquemática de la elongación del oligonucleótido por medio de una polimerasa. La cadena inicial está representada como libre, conjugada con un ligador aminohexilo o conjugada con un residuo de fenilalanina por medio de un ligador aminohexilo.

La Figura 5 es una representación esquemática del ciclo de síntesis de una realización de la invención.

- 5 La Figura 6 es una representación esquemática de un proceso de selección de múltiples rondas por medio del uso de las bibliotecas de la invención.

La Figura 7 es un gel resultante de la electroforesis de los productos de cada uno de los ciclos 1 a 5 descritos en el Ejemplo 1 y el posterior ligamiento del cebador de cierre. Los estándares de peso molecular se muestran en la calle 1, y las cantidades indicadas de un marcador hyperladder, para la cuantificación de ADN se muestran en las calles 9 a 12.

La Figura 8 es una representación esquemática del acoplamiento de los bloques de construcción por medio de la cicloadición de azida-alquino.

Las Figuras 9 y 10 ilustran el acoplamiento de los bloques de construcción por medio de la sustitución aromática nucleófila en una triazina clorada.

- 15 La Figura 11 muestra estructuras heteroaromáticas cloradas representativas adecuadas para usar en la síntesis de restos funcionales.

La Figura 12 ilustra la ciclación de un péptido lineal por medio de la reacción de cicloadición de azida/alquino.

La Figura 13a es un cromatograma de la biblioteca producida como se describe en el Ejemplo 2 siguiendo el I Ciclo 4.

- 20 La Figura 13b es un espectro de masa de la biblioteca producida como se describe en el Ejemplo 2 siguiendo el Ciclo 4.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos de producir compuestos y bibliotecas combinatorias de compuestos y procedimientos de uso de las bibliotecas para identificar compuestos que tienen una propiedad deseada, tal como una actividad biológica deseada.

Se ha adoptado una variedad de abordajes para producir y seleccionar bibliotecas químicas combinatorias. Los ejemplos incluyen procedimientos en los que los miembros individuales de la biblioteca están separados físicamente entre sí, tales como cuando se sintetiza un compuesto individual en cada uno de una multitud de recipientes de reacción. Sin embargo, estas bibliotecas normalmente seleccionan un compuesto por vez o a lo sumo, varios compuestos por vez y en consecuencia, no producen el proceso de selección más eficiente. En otros procedimientos, los compuestos se sintetizan en soportes sólidos. Tales soportes sólidos incluyen chip en los que los compuestos específicos ocupan regiones específicas del chip o membrana ("posición accesible"). En otros procedimientos, los compuestos se sintetizan en microesferas, cada microesfera contiene una estructura química diferente.

35 Dos dificultades que surgen del análisis de las bibliotecas grandes son (1) el número de compuestos distintos que se pueden analizar; y (2) la identificación de compuestos que son activos en la prueba. En un procedimiento, los compuestos que son activos en la prueba se identifican por la reducción de la biblioteca original en fracciones y subfracciones más pequeñas, en cada caso la selección de la fracción o subfracción que contiene compuestos activos y la posterior subdivisión hasta obtener una subfracción activa que contiene un conjunto de compuestos que es suficientemente pequeño para que todos los miembros del subconjunto se puedan sintetizar y evaluar individualmente en cuanto a la actividad deseada. Esta es una actividad tediosa y que lleva mucho tiempo.

Otro procedimiento de dilucidar los resultados de una prueba de biblioteca combinatoria es utilizar bibliotecas en la que los miembros de la biblioteca estén marcados con una marca identificatoria, es decir, cada marca presente en la biblioteca se asocia con una estructura del compuesto discreta presente en la biblioteca, de modo que la identificación de la marca indique la estructura de la molécula marcada. Un abordaje de las bibliotecas marcadas utiliza marcas de oligonucleótidos, como se describe, por ejemplo, en Patentes US Núm. 5.573.905; 5.708.153; 5.723.598, 6.060.596 solicitudes PCT publicadas WO 93/06121; WO 93/20242; WO 94/13623; WO 00/23458; WO 02/074929 y WO 02/103008, y por Brenner y Lerner (Prot. Nall. Acad. Sci. USA 89, 5381-5383 (1992); Nielsen y Janda (Procedimientos: A Companion to Methods in Enzymology 6, 361-371 (1994); y Nielsen, Brenner y Janda (J. Am. Chem. Soc. 115, 9812-9813 (1993)). Tales marcas se pueden amplificar, por medio del uso de, por ejemplo, la reacción en cadena de polimerasa, para producir cualquier copia de la marca e identificar la marca por secuenciación. La secuencia de la marca por lo tanto identifica la estructura de la molécula de unión, que se puede sintetizar en forma pura y analizar. La presente invención proporciona una mejora en los procedimientos para producir bibliotecas codificadas por ADN, así como los primeros ejemplos de bibliotecas grandes (105 miembros o

más) de moléculas codificadas por ADN en el que el resto funcional se sintetiza por medio de procedimientos de síntesis en fase de solución.

La presente invención proporciona procedimientos que permiten la síntesis fácil de las bibliotecas combinatorias codificadas por oligonucleótidos, y permiten una medio eficiente y de alta fidelidad de añadir tal marca de oligonucleótido a cada miembro de una vasta colección de moléculas.

Los procedimientos de la invención incluyen procedimientos para sintetizar moléculas bifuncionales que comprenden un primer resto ("resto funcional") que está constituido de bloques de construcción, y un segundo resto unido operativamente al primer resto, que comprende una marca de oligonucleótido que identifica la estructura del primer resto, es decir, la marca de oligonucleótido indica cuáles bloques de construcción se usaron en la construcción del primer resto, así como el orden en que se ligaron los bloques de construcción. En general, la información provista por la marca de oligonucleótido es suficiente para determinar los bloques de construcción usados para construir el resto activo. En ciertas realizaciones, la secuencia de la marca de oligonucleótido es suficiente para determinar la disposición de los bloques de construcción en el resto funcional, por ejemplo, para los restos peptídicos, la secuencia de aminoácidos.

El término "resto funcional" como se usa en la presente memoria, se refiere a un resto químico que comprende uno o más bloques de construcción. Preferiblemente, los bloques de construcción del resto funcional no son ácidos nucleicos. El resto funcional puede ser un polímero u oligómero lineal o ramificado o cíclico o una molécula orgánica pequeña.

El término "bloque de construcción", como se usa en la presente memoria, es una unidad estructural química que está ligada a otras unidades estructurales químicas o se puede ligar a otras de estas unidades. Cuando el resto funcional es polimérico u oligomérico, los bloques de construcción son las unidades monoméricas del polímero u oligómero. Los bloques de construcción también pueden incluir una estructura de armazón ("bloque de construcción del armazón") al que se une o puede unir una o más estructuras adicionales ("bloques de construcción periféricos").

Se entiende que el término "bloque de construcción" se usa en la presente memoria para referirse una unidad estructural química ya que existe en un resto funcional y también en la forma reactiva usada para la síntesis del resto funcional. Dentro del resto funcional, un bloque de construcción existirá sin que se pierda ninguna porción del bloque de construcción como consecuencia de la incorporación del bloque de construcción en el resto funcional. Por ejemplo, en casos en que la reacción formadora de enlace libera una molécula pequeña (ver a continuación), el bloque de construcción que existe en el resto funcional es un "residuo del bloque de construcción", es decir, el resto del bloque de construcción usado en la síntesis después de la pérdida de los átomos que contribuye a la molécula liberada.

Los bloques de construcción pueden ser compuestos químicos que son complementarios, es decir, los bloques de construcción deben poder reaccionar entre sí para formar una estructura que comprende dos o más bloques de construcción. Normalmente, el total de los bloques de construcción usados tendrán al menos dos grupo reactivos, si bien es posible que algunos de los bloques de construcción (por ejemplo, el último bloque de construcción es un resto funcional oligomérico) usados tengan solo un grupo reactivo cada uno. Los grupos reactivos en dos bloques de construcción diferentes deben ser complementarios, es decir, capaces de reaccionar entre sí para formar un enlace covalente, opcionalmente con la pérdida concomitante de una molécula pequeña, tal como agua, HCl, HF, y demás.

Para los presentes propósitos, dos grupo reactivos son complementarios si ellos son capaces de reaccionar entre sí para formar un enlace covalente. En una realización preferida, las reacciones formadoras de enlace ocurren rápidamente en las condiciones ambientales sin sustancial formación de productos secundarios. Preferiblemente, un grupo reactivo determinado reaccionará con un grupo reactivo complementario dado exactamente una vez. En una realización, los grupos reactivos complementarios de dos bloques de construcción reaccionan, por ejemplo, por medio de sustitución nucleófila, para formar un enlace covalente. En una realización, un miembro de un par de los grupos reactivos complementarios es un grupo electrófilo y el otro miembro del par es un grupo nucleófilo.

Los grupos electrófilos y nucleófilos complementarios incluyen dos grupos que reaccionan por medio de la sustitución nucleófila en condiciones adecuadas para formar en condiciones adecuadas para formar un enlace covalente. Una variedad de reacciones formadoras de enlace adecuadas son conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, March, *Advanced Organic Chemistry*, cuarta edición, New York: John Wiley y Sons (1992), Chapters 10 a 16; Carey y Sundberg, *Advanced Organic Chemistry, Part B*, Plenum (1990), Chapters 1-11; y Collman et al., *Principles and Applications of Organotransition Metal Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, Calif (1987), Capítulos 13 a 20. Los ejemplos de grupos electrófilos adecuados incluyen grupos carbonilo reactivos, tales como grupos cloruro de acilos, grupos éster, que incluye ésteres de carbonil pentafluorofenilo y ésteres de succinimida, grupos de cetona y grupos aldehído; grupos reactivo sulfonilo, tales como grupos cloruro de sulfonilo y grupos fosfonilo reactivos. Otros grupos electrófilos incluyen grupos epóxidos terminales, grupos isocianatos y grupos haluro de alquilo. Los grupos nucleófilos adecuados incluyen grupos amino primarios y secundarios y grupos hidroxilo y grupos carboxilo.

Los grupos reactivos complementarios adecuados se exponen más adelante. Los expertos en la técnica pueden

determinar fácilmente otros pares de grupo reactivo que se pueden usar en el presente procedimiento, y los ejemplos provistos en la presente memoria no se consideran una limitación.

En una primera realización, los grupos reactivos complementarios incluyen grupos carboxilo activados, grupos sulfonilo reactivos o grupos fosfonilo reactivos, o una combinación de estos, y grupos amino primario o secundario. En esta realización, los grupos reactivos complementarios reaccionan en condiciones adecuadas para formar un enlace amida, sulfonamida o fosfonamido.

En una segunda realización, los grupos reactivos complementarios incluyen grupos epóxidos y grupos amino primario o secundario. Un bloque de construcción que contiene epóxido reacciona con un bloque de construcción que contiene amina en condiciones adecuadas para formar un enlace carbono-nitrógeno, lo que produce un β -amino alcohol.

En otra realización, los grupos reactivos complementarios incluyen grupos aziridinas y grupos amino primario o secundario. En condiciones adecuadas, un bloque de construcción que contiene aziridina reacciona con un bloque de construcción que contiene amina para formar un enlace carbono-nitrógeno, lo que origina 1,2-diamina. En una tercera realización, los grupos reactivos complementarios incluyen grupos isocianato y grupos amino primario o secundario. Un bloque de construcción que contiene isocianato reaccionará con un bloque de construcción que contiene amino en condiciones adecuadas para formar un enlace carbono-nitrógeno, lo que da origen a un grupo urea.

En una cuarta realización, los grupos reactivos complementarios incluyen grupos isocianato y grupos hidroxilo. Un bloque de construcción que contiene isocianato reaccionará con un bloque de construcción que contiene hidroxilo en condiciones adecuadas para formar un enlace carbono-oxígeno, lo que da origen a un grupo carbamato.

En una quinta realización, los grupos reactivos complementarios incluyen grupos amino y grupos que contiene carbonilo, tales como grupos aldehído o cetona. Las aminas reaccionan con tales grupos por medio de la aminación reductora para formar un nuevo enlace carbono-nitrógeno.

En una sexta realización, los grupos reactivos complementarios incluyen grupo iluros de fósforo y grupos aldehído o cetona. Un bloque de construcción que contiene iluro de fósforo reaccionará con un bloque de construcción que contiene aldehído o cetona en condiciones adecuadas para formar un enlace doble de carbono-carbono, lo que da origen un alqueno.

En una séptima realización, los grupos reactivos complementarios reaccionan por medio de cicloadición para formar una estructura cíclica. Un ejemplo de tales grupos reactivos complementarios son alquinos y azidas orgánicas, que reaccionan en condiciones adecuadas para formar una estructura anular de triazol. Un ejemplo del uso de esta reacción para ligar dos bloques de construcción se ilustra en la Figura 8. Las condiciones adecuadas para tales reacciones son conocidas en la técnica e incluyen las que se describen en WO 03/101972, cuyos contenidos completos se incorporan por referencia en la presente memoria.

En una octava realización, los grupos reactivos complementarios son un haluro de alquilo y un nucleófilo, tales como un grupo amino, un grupo hidroxilo o un grupo carboxilo. Tales grupos reaccionan en condiciones adecuadas para formar un carbono-nitrógeno (haluro de alquilo más amina) o carbono oxígeno (haluro de alquilo más grupo hidroxilo o carboxilo).

En una novena realización, los grupos funcionales complementarios son un grupo heteroaromático halogenado y un nucleófilo, y los bloques de construcción se ligan en condiciones adecuadas por medio de sustitución nucleófila aromática. Los grupos heteroaromáticos halogenados incluyen pirimidinas, triazinas y purinas cloradas, que reaccionan con nucleófilos, tales como aminas, en condiciones moderadas en solución acuosa. Los ejemplos representativos de la reacción de una triclorotriazina marcada con oligonucleótido con aminas se muestran en las Figuras 9 y 10. Los ejemplos de grupos heteroaromáticos clorados adecuados se muestran en la Figura 11.

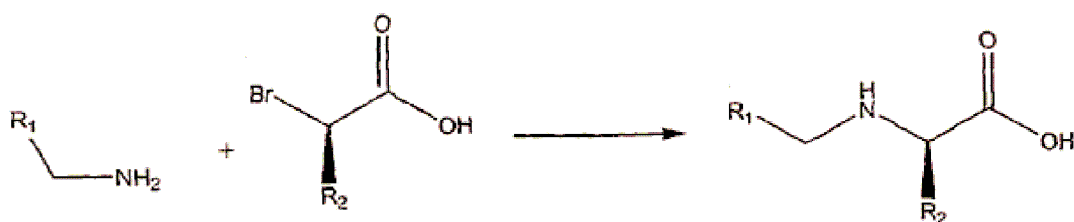
Las reacciones formadoras de enlace adicionales que se pueden usar para unir los bloques de construcción en la síntesis de moléculas y bibliotecas por medio de los procedimientos de la invención incluyen los que se muestran a continuación. Las reacciones mostradas más adelante destacan los grupos funcionales reactivos. Varios sustituyentes pueden estar presentes en los reactantes, que incluyen los R1, R2, R3 y R4 marcados. Las posiciones posibles que se puede sustituir incluyen, pero sin limitación, a los indicados por R1, R2, R3 y R4. Estos sustituyentes pueden incluir cualquier resto químico adecuado, pero preferiblemente limitados a los que no interferirán o inhibirán significativamente la reacción indicada, y, a menos que se especifique de otro modo, pueden incluir hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcoxi, ariloxi, arilalquilo, arilalquilo sustituido, amino, amino sustituido y otros son conocidos en la técnica.

Los sustituyentes adecuados en estos grupos incluyen alquilo, arilo, heteroarilo, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, amino, mercapto, carboxilo, y carboxamida. Cuando se especifica, los grupos aceptores de electrones incluyen nitro, carboxilo, haloalquilo, tales como trifluorometilo y otros son conocidos en la técnica. Los ejemplos de grupos dadores de electrones adecuados incluyen alquilo, alcoxi, hidroxilo, amino, halógeno, acetamido y otros son conocidos en la técnica.

Adición de una amina primaria en un alqueno:

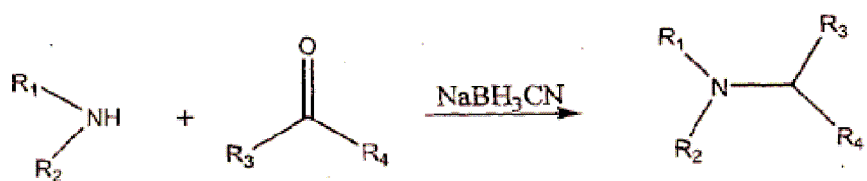
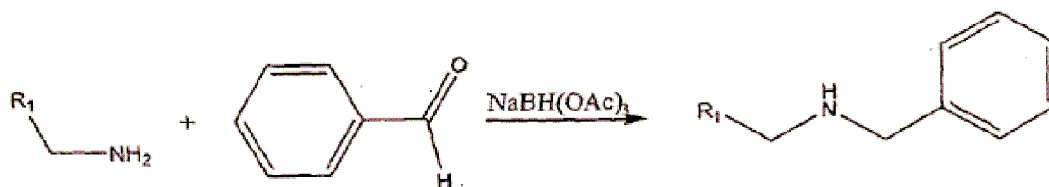


Sustitución nucleófila:

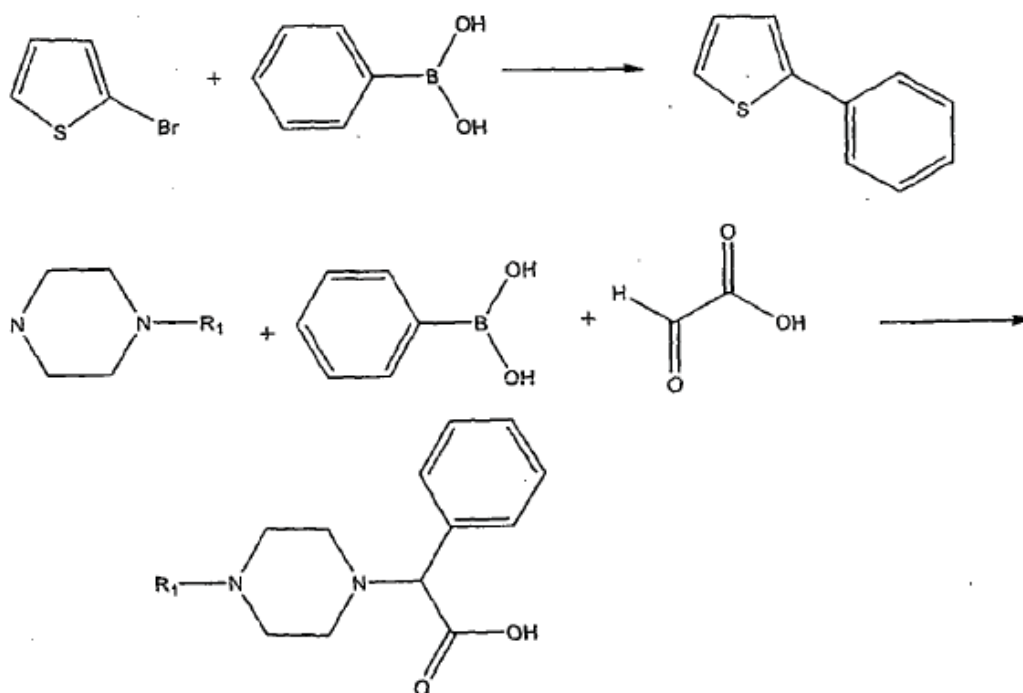


5

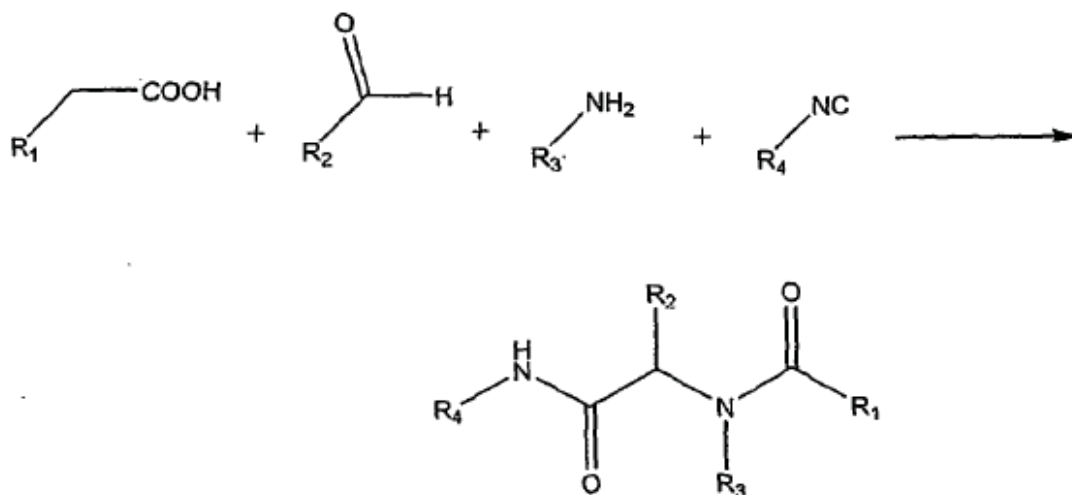
Alquilación reductora de una amina:



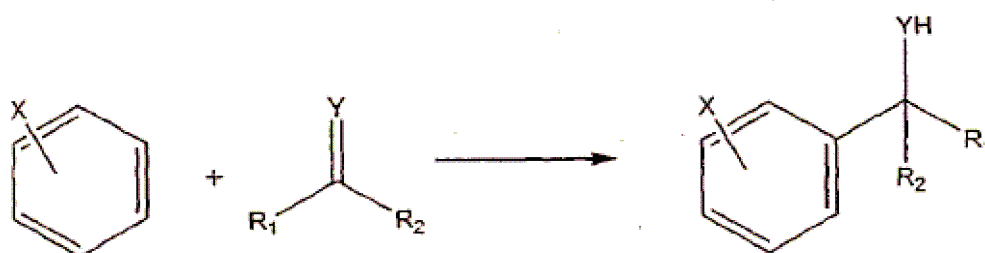
Reacciones formadoras de enlace carbono-carbono catalizado por paladio:



Reacciones de condensación de Ugi:

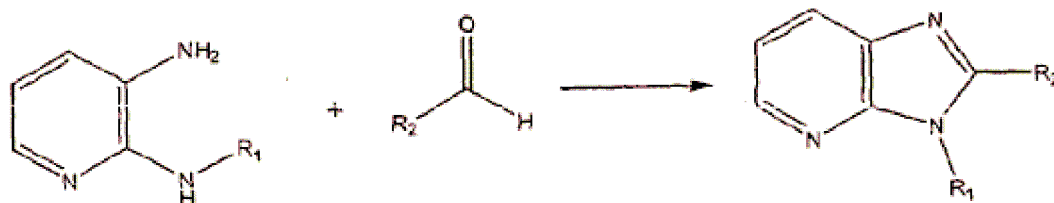
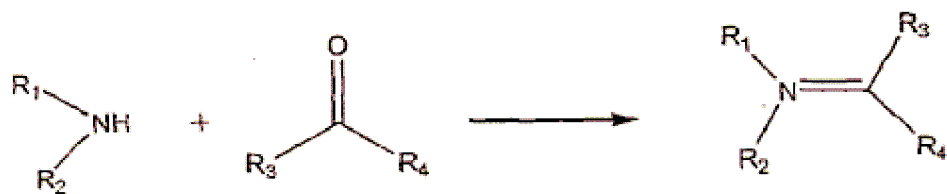


5 Reacciones de sustitución aromática electrófila:



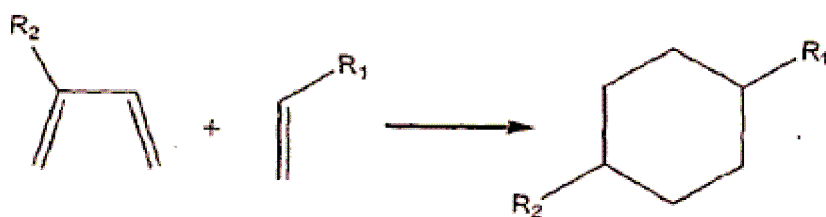
X es un grupo dador de electrones.

Reacciones formadoras de imina/iminio/enamina:

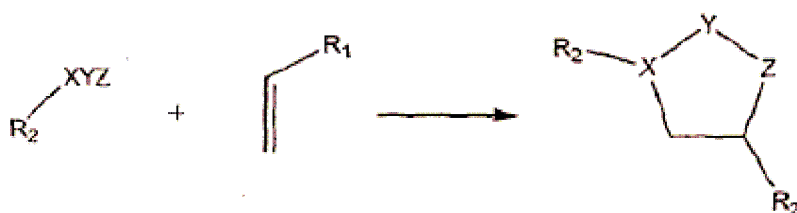


5 Reacciones de cicloadición:

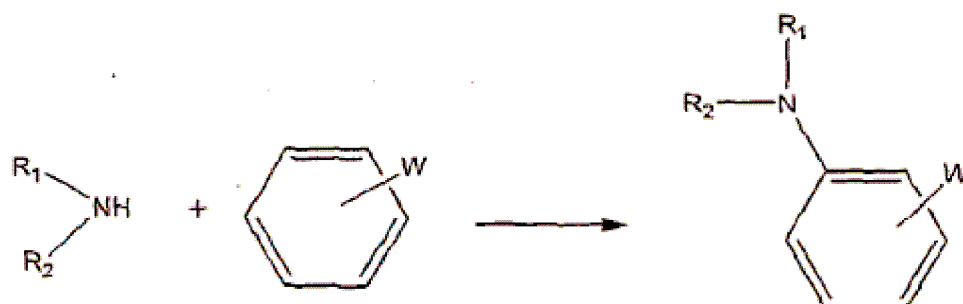
Cicloadición de Diels-Alder



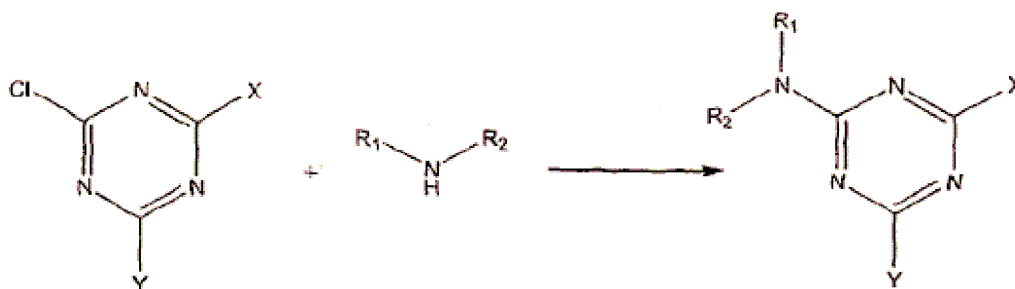
Cicloadición 1,3-dipolar, X-Y-Z = C-N-O, C-N-S, N_3 ,



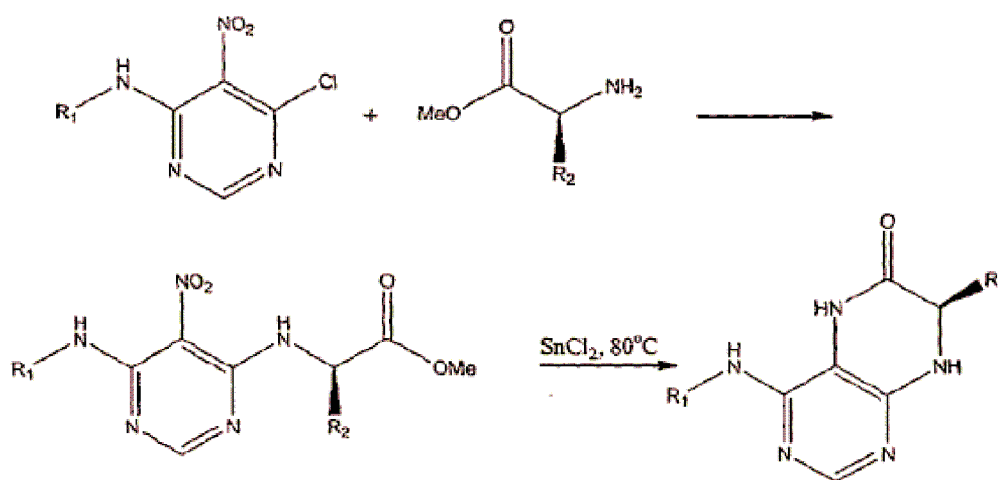
10 Reacciones de sustitución aromática nucleófila:



W es un grupo aceptor de electrones

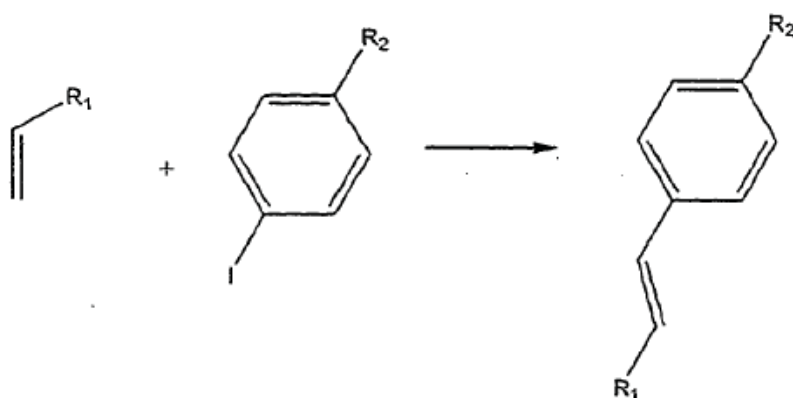


Los ejemplos de sustituyentes X e Y adecuados incluyen amino sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, tioalcoxi sustituido o no sustituido, ariloxi sustituido o no sustituido y tioariloxi sustituido o no sustituido

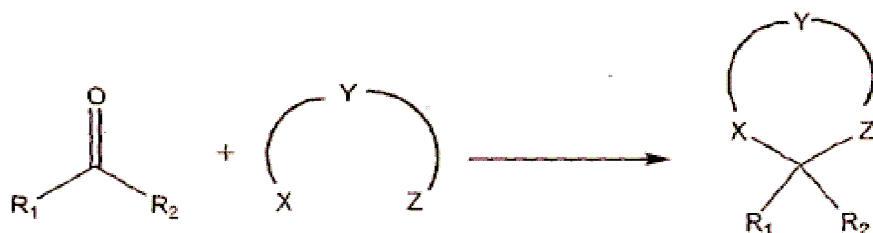


5

Reacción de Heck:

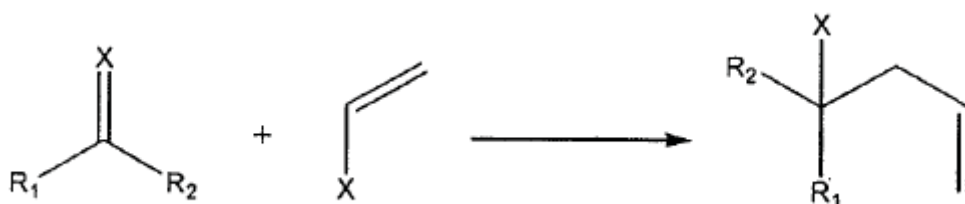


Formación de acetal:



Los ejemplos de sustituyentes X e Y adecuados incluyen amino, hidroxilo y sulfhidrido sustituido o no sustituido; Y es un ligador que conecta X e Y y es adecuada para formar la estructura anular hallada en el producto de la reacción

5 Reacciones de aldol:



Los ejemplos de sustituyentes X adecuados incluyen O, S y NR₃.

Los bloques de construcción del armazón que se pueden usar para formar las moléculas y bibliotecas descritas en la presente memoria incluyen los que tienen dos o más grupos funcionales que pueden participar en las reacciones formadoras de enlace con precursores del bloque de construcción periférico, por ejemplo, usando una o más reacciones formadoras de enlace descritas antes. Los restos del armazón también se pueden sintetizar durante la construcción de las bibliotecas y moléculas de la invención, por ejemplo, por medio de precursores del bloque de construcción que pueden reaccionar de maneras específicas para formar moléculas que comprenden un resto molecular central al que se anexan los grupos funcionales periféricos. En una realización, una biblioteca producida por los procedimientos de la invención comprende moléculas que comprenden un resto del armazón constante, pero restos periféricos diferentes o diferentes disposiciones de restos periféricos. En ciertas bibliotecas, todos los miembros de biblioteca comprenden un resto de armazón constante; otras bibliotecas pueden comprender moléculas que tienen dos o más restos del armazón diferentes. Los ejemplos de reacciones formadoras de armazón que se pueden usar en la construcción de las moléculas y bibliotecas de la invención se exponen en la Tabla 8. Los grupos R₁, R₂, R₃ y R₄ se limitan solo a que no puedan interferir, o inhibir significativamente, la reacción indicada, y pueden incluir hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, heteroarilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, halógeno, alcoxi, ariloxi, amino, amino sustituido y otros que son conocidos en la técnica. Los sustituyentes adecuados incluyen, pero sin limitación, alquilo, alcoxi, tioalcoxi, nitro, hidroxilo, sulfhidrido, ariloxi, aril-S-, halógeno, carboxi, amino, alquilamino, dialquilamino, arilamino, ciano, cianato, nitrilo, isocianato, tiocianato, carbamilo, y carbamilo sustituido.

Se entiende que la síntesis de un resto funcional puede proceder por medio de un tipo particular de reacción de acoplamiento, tales como, pero sin limitación, a una de las reacciones descritas antes, o por medio de una combinación de dos o más reacciones de acoplamiento, tales como dos o más de las reacciones de acoplamiento descritas anteriormente. Por ejemplo, en una realización, los bloques de construcción se unen por una combinación de la formación del enlace amida (grupos complementarios amino y ácido carboxílico) y afinación reductora (grupos complementarios amino y aldehído o cetona). Se puede usar cualquier reacción química de acoplamiento, con la condición de que sea compatible con la presencia de un oligonucleótido. Las marcas de oligonucleótidos bicatenario (duplex), como se usa en ciertas realizaciones de la presente invención, son químicamente más robustas que las marcas de cadena simple, y, en consecuencia, toleran una variedad más amplia de condiciones de reacción y permiten el uso de reacciones formadoras de enlace que no serían posibles con las marcas de cadena simple.

Un bloque de construcción puede incluir uno o más grupos funcionales además del grupo o grupos reactivos empleados para formar el resto funcional. Uno o más de estos grupos funcionales adicionales se puede proteger para evitar reacciones no deseadas de estos grupos funcionales. Los grupos protectores adecuados son conocidos en la técnica para una variedad de grupos funcionales (Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, segunda edición, New York: John Wiley y Sons (1991)). Los grupos protectores particularmente útiles incluyen ésteres y éteres t-butilicos, acetales, éteres tritilicos y aminas, ésteres acetilicos, éteres trimetilsilílicos, éteres y ésteres y carbamatos de tricloroetilo.

En una realización, cada bloque de construcción comprende dos grupos reactivos, que pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, cada bloque de construcción adicionado en el ciclo s puede comprender dos grupos reactivos que son iguales, pero que son complementarios con los grupos reactivos de los bloques de construcción añadidos a las etapas $s-1$ y $s+1$. En otra realización, cada bloque de construcción comprende dos grupos reactivos que son complementarios por sí mismos. Por ejemplo, una biblioteca que comprende moléculas de poliamida se puede producir por medio de reacciones entre los bloques de construcción que comprenden dos grupos amino primario y los bloques de construcción que comprenden dos grupos carboxilo activados. En los compuestos resultantes no existen extremos N- o C-terminal, ya que los grupos amida alternativos tienen direccionalidad opuesta. De modo alternativo, se puede producir una biblioteca de poliamida por medio de bloques de construcción que comprenden un grupo amino y un grupo carboxilo activado. En esta realización, los bloques de construcción añadidos en la etapa n del ciclo tendrán un grupo reactivo libre que es complementario con el grupo reactivo disponible en $n-1$ bloques de construcción, mientras, preferiblemente, se protege el otro grupo reactivo en el enésimo bloque de construcción. Por ejemplo, si los miembros de la biblioteca se sintetizan en la dirección de C a N, los bloques de construcción añadidos comprenderán un grupo carboxilo activado y un grupo amino protegido.

Los restos funcionales pueden ser poliméricos o oligoméricos, tales como péptidos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos de péptidos o peptoides, o ellos pueden ser moléculas no poliméricas pequeñas, por ejemplo, las moléculas que tienen una estructura que comprende un armazón central y las estructuras dispuestas aproximadamente de la periferia del armazón. Las bibliotecas poliméricas u oligoméricas lineales resultarán del uso de bloques de construcción que tienen dos grupos reactivos, mientras que las bibliotecas poliméricas u oligoméricas ramificadas resultarán del uso de bloques de construcción que tienen tres o más grupos reactivos, opcionalmente en combinación con bloques de construcción que tienen solo dos grupos reactivos. Tales moléculas pueden estar representadas por la fórmula general $X_1X_2...X$, donde cada X es un unidad monomérica de un polímero que comprende n unidades monoméricas, donde n es un número entero mayor de 1. En el caso de compuestos oligoméricos o poliméricos, los bloques de construcción terminales no necesitan comprender dos grupos funcionales. Por ejemplo, en el caso de una biblioteca de poliamida, el bloque de construcción C-terminal puede comprender un grupo amino, pero la presencia de un grupo carboxilo es opcional. De modo similar, el bloque de construcción en el extremo N-terminal puede comprender un grupo carboxilo, pero no necesita contener un grupo amino.

Los compuestos oligoméricos o poliméricos ramificados también se pueden sintetizar con la condición de que al menos un bloque de construcción comprenda tres grupos funcionales que son reactivos con otros bloques de construcción. Una biblioteca de la invención puede comprender moléculas lineales, moléculas ramificadas o una combinación de estos.

Las bibliotecas también se pueden construir por medio de, por ejemplo, un bloque de construcción del armazón que tiene dos o más grupos reactivos, en combinación con otros bloques de construcción que tienen solo un grupo reactivo disponible, por ejemplo, cuando cualquier grupo reactivo adicional está protegido o no reactivo con los otros grupos reactivos presentes en el bloque de construcción del armazón. En una realización, por ejemplo, las moléculas sintetizadas se pueden representar con la fórmula general $X(Y)_n$, donde X es un bloque de construcción del armazón; cada Y es un bloque de construcción ligado a X y n es un número entero de al menos dos, y preferiblemente un número entero de 2 a aproximadamente 6. En una realización preferida, el bloque de construcción inicial del ciclo 1 es un bloque de construcción del armazón. En las moléculas de la fórmula $X(Y)_n$, cada Y puede ser igual o diferente, pero en la mayoría de los miembros de una biblioteca típica, cada Y será diferente.

En una realización, las bibliotecas de la invención comprenden compuestos de poliamida. Los compuestos de poliamida se pueden componer de bloques de construcción derivados de cualquier aminoácido, que incluyen los veinte α -aminoácidos naturales, tales como alanina (Ala; A), glicina (Gly; G), asparagina (Asn; N), ácido aspártico (Asp; I), ácido glutámico (Glu; E), histidina (His; H), leucina (Leu; L), lisina (Lys; K), fenilalanina (Phe; F), tirosina (Tyr; Y), treonina (Thr; T), serina (Ser; S), arginina (Arg; R), valina (Val; V), glutamina (Gln; Q), isoleucina (Ile; I), cisteína (Cys; C), metionina (Met; M), prolina (Pro; P) y triptófano (Trp; W), donde se dan los códigos de tres letras y una letra para cada aminoácido. En su forma natural, cada uno de los aminoácidos precedentes existe en la L-configuración, que se asume en la presente memoria a menos que se indique lo contrario. En el presente procedimiento, sin embargo, también se pueden usar las formas de configuración D de estos aminoácidos. Estos D-aminoácidos están indicados en la presente memoria por el código de tres o una letra minúscula, es decir, ala (a), gly (g), leu (l), gln (q), thr (t), ser (s), y demás. Los bloques de construcción también se pueden derivar de otros α -aminoácidos, que incluyen, pero sin limitación, 3-arilalaninas, tales como naftilalanina, fenilalaninas sustituidas con fenilo, que incluyen 4-fluoro-, 4-cloro, 4-bromo y 4-metilfenilalanina; 3-heteroarilalaninas, tales como 3-piridilalanina, 3-tienilalanina, 3-quinolilalanina, y 3-imidazolilalanina; ornitina; citrulina; homocitrulina; sarcosina; homoprolina; homocisteína; prolina sustituida, tal como hidroxiprolina y fluoroprolina; dehidroprolina; norleucina; O-metil tirosina; O-metilserina; O-metiltreonina y 3-ciclohexilalanina. Cada uno de los aminoácidos precedentes se puede utilizar en la configuración D o L.

Los bloques de construcción también pueden ser aminoácidos que no son α -aminoácidos, tales como α -azaaminoácidos; β , γ , δ , ϵ , -aminoácidos, y aminoácidos N-sustituidos, tales como glicina N-sustituida, donde el N-sustituyente pueden ser, por ejemplo, un grupo alquilo sustituido o no sustituido, arilo, heteroarilo, arilalquilo o heteroarilalquilo. En una realización, el N-sustituyente es una cadena lateral de un α -aminoácido.

El bloque de construcción también puede ser una estructura peptidomimética, tales como un mimético de dipéptido, tripéptido, tetrapéptido o pentapéptido. Tales bloques de construcción peptidomiméticos preferiblemente se derivan de compuestos aminoácido, de modo que la química de adición de estos bloques de construcción al grupo de poli(aminoácido) creciente es el mismo, o similar a, la química usada para los otros bloques de construcción. Los bloques de construcción también pueden ser moléculas que son capaces de formar enlaces que son isostéricos con un enlace peptídico, para formar restos funcionales peptidomiméticos que comprenden una modificación del esqueleto peptídico, tales como $\psi[\text{CH}_2\text{S}]$, $\psi[\text{CH}_2\text{NH}]$, $\psi[\text{CSNH}_2]$, $\psi[\text{NHCO}]$, $\psi[\text{COCH}_2]$, y $\psi(\text{E})$ o $(\text{Z})\text{CH}=\text{CH}$. En la nomenclatura usada antes, ψ indica la ausencia de un enlace amida. La estructura que reemplaza el grupo amida se especifica entre paréntesis.

En una realización, la invención proporciona un procedimiento de sintetizar un compuesto que comprende o que consiste en un resto funcional que está unido operativamente a un oligonucleótido codificador que identifica la estructura del resto funcional, dicho procedimiento que comprende las etapas de: (a) proporcionar un compuesto iniciador que consiste en un resto funcional inicial que comprende n bloques de construcción, donde n es un número entero de 1 o mayor, en el que el resto funcional inicial comprende al menos un grupo reactivo, y está unido operativamente a un oligonucleótido inicial, en el que el resto funcional inicial comprende al menos un grupo reactivo, y está unido operativamente a un oligonucleótido inicial; en el que el resto funcional inicial y el oligonucleótido inicial se unen con a resto ligador y en el que el oligonucleótido inicial es bicatenario y el resto ligador se acopla covalentemente al resto funcional inicial y a ambas cadenas del oligonucleótido inicial; (b) hacer reaccionar el compuesto iniciador con un bloque de construcción deseado que comprende al menos un grupo reactivo complementario, en el que al menos un grupo reactivo complementario es complementario con el grupo reactivo de la etapa (a), en condiciones adecuadas para la reacción del grupo reactivo complementario para formar un enlace covalente; (c) hacer reaccionar el oligonucleótido inicial con un oligonucleótido entrante que identifica el bloque de construcción de la etapa (b) en presencia de una enzima que cataliza el ligamiento del oligonucleótido inicial y el oligonucleótido entrante, en condiciones adecuadas para el ligamiento del oligonucleótido entrante y el oligonucleótido inicial para formar un oligonucleótido codificador, en el que el último de dichos oligonucleótidos entrantes comprende una secuencia capuchón, dicha secuencia capuchón que comprende una secuencia de nucleótidos que contiene nucleótidos degenerados; de este modo se produce una molécula que comprende un resto funcional que comprende $n+1$ bloques de construcción que están unidos operativamente a un oligonucleótido codificador que identifica la estructura del resto funcional.

Si el resto funcional de la etapa (c) comprende un grupo reactivo, las etapas 1-3 se pueden repetir una o más veces, de este modo forman ciclos 1 a i , donde i es un número entero de 2 o mayor, con el producto de la etapa (c) de un ciclo $s-1$, donde s es un número entero de i o menor, que es el compuesto iniciador de la etapa (a) de los ciclos. En cada ciclo, un bloque de construcción se añade al resto funcional en crecimiento y una secuencia de oligonucleótidos, que codifica el nuevo bloque de construcción, se añade al oligonucleótido codificador.

En una realización, el compuesto iniciador inicial se genera por la reacción de un primer bloque de construcción con un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido que incluye las secuencias del cebador de PCR o un oligonucleótido inicial) o con un ligador al que se une tal oligonucleótido. En la realización expuesta en la Figura 5, los compuestos ligadores comprenden un grupo reactivo para la unión de un primer bloque de construcción y se une a un oligonucleótido inicial. En esta realización, la reacción de un bloque de construcción, o en cada una de múltiples alícuotas, una de una colección de bloques de construcción, con el grupo reactivo del ligador y la adición de un oligonucleótido que codifica el bloque de construcción para el oligonucleótido inicial produce el uno o más iniciadores del compuesto iniciales del proceso expuesto anteriormente.

En una realización preferida, cada bloque de construcción individual se asocia con un oligonucleótidos distinto, de modo que la secuencia de nucleótidos en el oligonucleótido añadido en un ciclo dado identifica el bloque de construcción añadido en el mismo ciclo.

El acoplamiento de los bloques de construcción y el ligamiento de los oligonucleótidos generalmente se producirá con concentraciones similares de materiales de partida y reactivos. Por ejemplo, se prefieren las concentraciones de reactivos en el orden de micromolar a milimolar, por ejemplo de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 10 mM, a fin de tener el acoplamiento eficiente de los bloques de construcción.

En ciertas realizaciones, el procedimiento también comprende, después de la etapa (b), la etapa de depurar cualquier resto funcional inicial sin reaccionar. La eliminación de cualquier resto funcional inicial sin reaccionar en un ciclo particular evita la reacción del resto funcional inicial del ciclo con un bloque de construcción añadido en un ciclo posterior. Tales reacciones pueden llevar a la generación de restos funcionales que pierden uno o más bloques de construcción, que potencialmente llevan a una variedad de estructuras del resto funcional que corresponden a una secuencia de oligonucleótidos particular. Tal depuración se puede lograr por la reacción de cualquier resto funcional inicial restantes con un compuesto que reacciona con el grupo reactivo de la etapa (b). Preferiblemente, el compuesto depurador reacciona rápidamente con el grupo reactivo de la etapa (b) y no incluye grupos reactivos adicionales que pueden reaccionar con los bloques de construcción añadidos en ciclos posteriores. Por ejemplo, en la síntesis de un compuesto donde el grupo reactivo de la etapa (b) es un grupo amino, un compuesto depurador adecuado es un éster de N-hidroxisuccinimida, tal como éster de ácido acético de N-hidroxisuccinimida.

En otra realización, la invención proporciona un procedimiento de producir una biblioteca de compuestos, en el que cada compuesto comprende un resto funcional que comprende dos o más bloques de construcción que está unido operativamente a un oligonucleótido codificador que identifica la estructura de el resto funcional, dicho procedimiento que comprende las etapas de (a) proporcionar una solución que comprende m iniciadores del compuesto de la reivindicación 1, en el que m es un número entero de 1 o mayor; (b) dividir la solución de la etapa (a) en r recipientes de reacción, en el que r es un número entero de 2 o mayor, de este modo se producen r alícuotas de la solución; (c) hacer reaccionar los iniciadores del compuesto en cada recipiente de reacción con uno de r bloques de construcción, dichos bloques de construcción que comprenden al menos un grupo reactivo complementario, en el que al menos un grupo reactivo complementario es complementario con el grupo reactivo de la etapa (a), en condiciones adecuadas para la reacción del grupo reactivo complementario para formar un enlace covalente, de este modo se producen r alícuotas que comprenden los compuestos que consisten en un resto funcional que comprenden $n+1$ bloques de construcción unidos operativamente al oligonucleótido inicial; y (d) hacer reaccionar el oligonucleótido inicial en cada alícuota con uno de un conjunto de r oligonucleótidos entrantes distintos correspondientes al bloque de construcción de la etapa (c) en presencia de una enzima que cataliza el ligamiento del oligonucleótido entrante y el oligonucleótido inicial, en condiciones adecuadas para el ligamiento enzimático del oligonucleótido entrante y el oligonucleótido inicial para formar un oligonucleótido codificador, en el que el último de dichos r oligonucleótidos entrantes distintos comprende a secuencia capuchón, dicha secuencia capuchón que comprende una secuencia de nucleótidos que contiene nucleótidos degenerados; de este modo se producen r alícuotas que comprenden moléculas que consisten en un resto funcional que comprende $n+1$ bloques de construcción unidos operativamente a un oligonucleótido codificador que identifica la estructura del resto funcional que comprende los $n+1$ bloques de construcción. En una realización preferida, el oligonucleótido presente en cada molécula proporciona suficiente información para identificar los bloques de construcción dentro de la molécula y, opcionalmente, el orden de la adición de los bloques de construcción. En esta realización, el procedimiento de la invención comprende un procedimiento de sintetizar una biblioteca de compuestos, en la que los compuestos comprenden un resto funcional que comprende dos o más bloques de construcción que está unido operativamente a un oligonucleótido que identifica la estructura del resto funcional. Opcionalmente, el procedimiento también puede incluir la etapa de (e) recombinar las r fracciones, producidas en la etapa (d), de este modo se produce una solución que comprende moléculas que consiste en un resto funcional que comprende $n + 1$ bloques de construcción, que están unidos operativamente a un oligonucleótido alargado que codifica los $n + 1$ bloques de construcción. Las etapas (a) a (e) se pueden realizar una o más veces para producir los ciclos 1 a i , donde i es un número entero de 2 o mayor. In ciclo $s+1$, donde s es un número entero de $i-1$ o menor, la solución que comprende m iniciadores del compuesto de la etapa (a) es la solución de la etapa (e) del ciclo s . Asimismo, los iniciadores del compuesto de la etapa (a) del ciclo $s+1$ son los productos de la etapa (d) del ciclo s .

Preferiblemente la solución de la etapa (b) se divide en r fracciones en cada ciclo de síntesis de la biblioteca. En esta realización, cada fracción reacciona con un bloque de construcción único.

En los procedimientos de la invención, el orden de adición del bloque de construcción y el oligonucleótido entrante no es crítico, y las etapas (b) y (c) de la síntesis de una molécula, y las etapas (c) y (d) de la síntesis de la biblioteca se pueden invertir, es decir, el oligonucleótido entrante se puede ligar al oligonucleótido inicial antes de añadir el nuevo bloque de construcción. En ciertas realizaciones, puede ser posible realizar estas dos etapas simultáneamente.

En ciertas realizaciones, el procedimiento también comprende, después de la etapa (b), la etapa de eliminar cualquier resto funcional inicial sin reaccionar. La eliminación de cualquier resto funcional inicial sin reaccionar en un ciclo particular impide que el resto funcional inicial de un ciclo reaccione con un bloque de construcción añadido en un ciclo posterior. Tales reacciones pueden llevar a la generación de restos funcionales que pierden uno o más bloques de construcción, potencialmente llevan a una variedad de estructuras del resto funcional que corresponden a una secuencia de oligonucleótidos particular. Tal eliminación se puede lograr por la reacción de cualquier resto funcional inicial restante con un compuesto que reacciona con el grupo reactivo de la etapa (b). Preferiblemente, el compuesto depurador reacciona rápidamente con el grupo reactivo de la etapa (b) y no incluye grupos reactivos adicionales que pueden reaccionar con los bloques de construcción añadidos en ciclos posteriores. Por ejemplo, en la síntesis de un compuesto donde el grupo reactivo de la etapa (b) es un grupo amino, un compuesto depurador adecuado es un éster de N-hidroxisuccinimida, tal como éster de ácido acético de N-hidroxisuccinimida.

En una realización, los bloques de construcción usados en la síntesis de la biblioteca se seleccionan de un conjunto de bloques de construcción candidatos por evaluación de la capacidad de los bloques de construcción candidatos para reaccionar con grupos funcionales complementarios apropiados en las condiciones usadas para la síntesis de la biblioteca. Los bloques de construcción que se muestran adecuadamente reactivos en tales condiciones posteriormente se pueden seleccionar para la incorporación en la biblioteca. Los productos de un ciclo dado, opcionalmente, se pueden purificar. Cuando el ciclo es un ciclo intermedio, es decir, cualquier ciclo anterior al ciclo final, estos productos son intermedios y se pueden purificar antes de la iniciación del próximo ciclo. Si el ciclo es el ciclo final, los productos del ciclo son los productos finales, y se pueden purificar antes de cualquier uso de los compuestos. Esta etapa de purificación, por ejemplo, puede eliminar reactantes sin reaccionar o en exceso y la enzima empleada para el ligamiento de oligonucleótidos. Se puede usar cualquiera de los procedimientos que son adecuados para separar los productos de otras especies presentes en la solución, que incluyen cromatografía líquida, tal como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y precipitación con un codisolvente adecuado, tal

como etanol. Los procedimientos adecuados para la purificación dependerán de la naturaleza de los productos y el sistema de disolventes usado para la síntesis.

Las reacciones se realizan preferiblemente en solución acuosa, tal como una solución acuosa regulada, pero también se puede realizar en medio acuoso/orgánico mixto compatible con las propiedades de solubilidad de los bloques de construcción, los oligonucleótidos, los productos intermedios y finales y la enzima usada para catalizar el ligamiento del oligonucleótido.

Se entiende que el número teórico de compuestos producidos por un ciclo dado en el procedimiento descrito anteriormente es el producto del número de diferentes iniciadores del compuesto; m , usado en el ciclo y el número de distintos bloques de construcción añadido en el ciclo, r . El número real de compuestos distintos producido en el ciclo puede ser tan alto como el producto de r y m ($r \times m$), pero puede ser menor, dada las diferencias de reactividad de determinados bloques de construcción con ciertos otros bloques de construcción. Por ejemplo, la cinética de adición de un particular bloque de construcción a un particular compuesto iniciador puede ser tal que en la escala de tiempo del ciclo de síntesis, se puede producir poco a nada el producto de esta reacción.

En ciertas realizaciones, un bloque de construcción común se añade antes al ciclo 1, después del último ciclo o entre cualquiera de dos ciclos. Por ejemplo, cuando el resto funcional es una poliamida, un bloque de construcción de terminación N-terminal común se puede añadir después del ciclo final. Un bloque de construcción común también se puede introducir entre dos ciclos, por ejemplo, para añadir un grupo funcional, tal como un grupo alquino o azida, que se puede utilizar para modificar los restos funcionales, por ejemplo, por ciclación, después de la síntesis de la biblioteca.

El término "unido operativamente", como se usa en la presente memoria, significa que dos estructuras químicas se unen entre sí de manera tal de permanecer unidas durante las diversas manipulaciones a las que se espera sean sometidas. Normalmente el resto funcional y el oligonucleótido codificador se unen covalentemente por medio de un grupo de unión apropiado. El grupo de unión es un resto bivalente con un sitio de unión para el oligonucleótido y un sitio de unión para el resto funcional. Por ejemplo, cuando el resto funcional es un compuesto de poliamida, el compuesto de poliamida se puede unir al grupo de unión en su extremo N-terminal, su extremo C-terminal o por medio de un grupo funcional en una de las cadenas laterales. El grupo de unión es suficiente para separar el compuesto de poliamida y el oligonucleótido en la menos un átomo, y preferiblemente, en más de un átomo, tales como al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis átomos. Preferiblemente, el grupo de unión es suficientemente flexible para permitir que el compuesto de poliamida se una a las moléculas blanco de una manera que es independiente del oligonucleótido.

En una realización, el grupo de unión se une al extremo N-terminal del compuesto de poliamida y el grupo 5'-fosfato del oligonucleótido. Por ejemplo, el grupo de unión se puede derivar de un precursor del grupo de unión que comprende un grupo carboxilo activado en un extremo y un éster activado en el otro extremo. La reacción del precursor del grupo de unión con el átomo de nitrógeno N-terminal formará un enlace amida que conecta el grupo de unión con el compuesto de poliamida o bloque de construcción N-terminal, mientras que la reacción del precursor del grupo de unión con el grupo 5'-hidroxilo del oligonucleótido producirá la unión del oligonucleótido al grupo de unión por medio de una unión éster. El grupo de unión puede comprender, por ejemplo, una cadena polimetileno, tal como una cadena $-(CH_2)_n-$ o una cadena poli(etilenglicol), tal como una cadena $-(CH_2CH_2O)_n$, donde en ambos casos n es un número entero de 1 a aproximadamente 20. Preferiblemente, n es de 2 a aproximadamente 12, más preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 10. En una realización, el grupo de unión comprende un grupo hexametileno $-(CH_2)_6-$.

Cuando los bloques de construcción son residuos de aminoácidos, el resto funcional resultante es una poliamida. Los aminoácidos se pueden acoplar por medio de reacciones químicas adecuadas para la formación de los enlaces amida. Preferiblemente, el acoplamiento de los bloques de construcción de aminoácido se realiza en condiciones que sean compatibles con el ligamiento enzimático de los oligonucleótidos, por ejemplo, a pH neutro o casi neutro pH y en solución acuosa. En una realización, el compuesto de poliamida se sintetiza desde la dirección C-terminal a N-terminal. En esta realización, el bloque de construcción primero o C-terminal, se acopla en su grupo carboxilo a un oligonucleótido por medio de un grupo de unión adecuado. El primer bloque de construcción reacciona con el segundo bloque de construcción, que preferiblemente tiene un grupo carboxilo activado y un grupo amino protegido. Se puede usar cualquier abordaje de grupo activador/protector que es adecuado para la formación de enlace amida en fase de solución. Por ejemplo, las especies de carboxilo activado adecuadas incluyen fluoruro de acilo (Patente U.S. No. 5.360.928, incorporada en la presente memoria por referencia en su totalidad), anhídridos simétricos y ésteres de N-hidroxisuccinimida. Los grupos acilo también se pueden activar in situ, como es conocido en la técnica, por la reacción con un compuesto activador adecuado. Los compuestos activadores adecuados incluyen dicitlohexilcarbodiimida (DCC), diisopropilcarbodiimida (DIC), 1-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDOJ), hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), anhídrido n-propano-fosfónico (PPA), cloruro de N,N-bis(2-oxo-3-oxazolidinil)imidofosforilo (BOP-Cl), hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidinofosfonio (PyBop), difenilfosforil azida (DPPA), reactivo de Castro (BOP, PyBop), sales de O-benzotriazolil-N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), cianuro de dietilfosforilo (DEPCN), dióxido de 2,5-difenil-2,3-dihidro-3-oxo-4-hidroxitiofeno (reactivo de Steglich; HOTDO), 1,11-carbonil-diimidazol (CDT), y cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMT-MM). Los reactivos de acoplamiento se pueden emplear solos o en combinación con aditivos tales como N,N-

dimetil-4-aminopiridina (DMAP), N-hidroxi-benzotriazol (HOBt), N-hidroxibenzotriazina (HOObt), N-hidroxisuccinimida (HOSu) N-hidroxiabenzotriazol (HOAt), sales de azabenzotriazolil-tetrametiluronio (HATU, HAPyU) o 2-hidroxipiridina. En ciertas realizaciones, la síntesis de una biblioteca requiere el uso de dos o más abordajes de activación, para permitir el uso de un conjunto de bloques de construcción estructuralmente diversos.

5 Para cada bloque de construcción, los expertos en la técnica pueden determinar el abordaje de activación apropiado.

El grupo protector N-terminal puede ser cualquier grupo protector que es compatible con las condiciones del proceso, por ejemplo, grupos protectores que son adecuados para las condiciones de síntesis en fase de solución. Un grupo protector preferido es el grupo fluorenilmetoxicarbonilo ("Fmoc"). También se puede necesitar proteger

10 cualquiera de los grupos funcionales potencialmente reactivos en la cadena lateral del bloque de construcción de aminoácido. Preferiblemente el grupo protector de la cadena lateral es ortogonal al grupo protector N-terminal, es decir, el grupo protector de la cadena lateral se elimina en condiciones que son diferentes de los requeridos para la eliminación del grupo protector N-terminal. Los grupos protectores de la cadena lateral adecuados incluyen el grupo nitroveratrilo, que se puede usar para proteger los grupos carboxilo de la cadena lateral y grupos amino de la cadena

15 lateral. Otro grupo protector amino de la cadena lateral adecuada es el grupo N-pent-4-enoilo.

Los bloques de construcción se pueden modificar después de la incorporación en el resto funcional, por ejemplo, por una reacción adecuada que involucra un grupo funcional en uno o más de los bloques de construcción. La modificación del bloque de construcción puede ocurrir después de la adición del bloque de construcción final o en cualquier punto intermedio en la síntesis del resto funcional, por ejemplo, después de cualquier ciclo del proceso de

20 síntesis. Cuando se sintetiza una biblioteca de moléculas bifuncionales de la invención, la modificación del bloque de construcción se puede realizar en la biblioteca completa o en una porción de la biblioteca, de este modo aumenta el grado de complejidad de la biblioteca. Las reacciones modificadoras del bloque de construcción adecuadas incluyen las reacciones que se pueden realizar en las condiciones compatibles con el resto funcional y el oligonucleótido codificador. Los ejemplos de tales reacciones incluyen la acilación y sulfonación de grupos amino o grupos hidroxilo,

25 alquilación de los grupos amino, esterificación o tioesterificación de grupos carboxilo, amidación de grupos carboxilo, epoxidación de alquenos, y otras reacciones conocidas en la técnica. Cuando el resto funcional incluye un bloque de construcción que tiene un grupo funcional alquino o azida, la reacción de cicloadición de azida/alquino se puede usar para derivar el bloque de construcción. Por ejemplo, un bloque de construcción que incluye un alquino puede reaccionar con una azida orgánica, o un bloque de construcción que incluye una azida puede reaccionar con un

30 alquino, en tal caso forma un triazol. Las reacciones de modificación del bloque de construcción pueden ocurrir después de la adición del bloque de construcción final o en un punto intermedio del proceso de síntesis, y se puede usar para anexar una variedad de estructuras químicas al resto funcional, que incluyen carbohidratos, restos de unión a metal y estructuras que se dirigen a ciertas biomoléculas o tipos de tejido.

En otra realización, el resto funcional comprende una serie lineal de bloques de construcción y esta serie lineal se

35 cicla por medio de una reacción adecuada. Por ejemplo, si al menos dos bloques de construcción de la disposición lineal incluyen grupos sulfhidrilo, los grupos sulfhidrilo se pueden oxidar para formar una unión disulfuro, de este modo se cicla la disposición lineal. Por ejemplo, los restos funcionales pueden ser oligopéptidos que incluyen dos o más restos de cisteína L o D y/u homocisteína L o D. Los bloques de construcción también pueden incluir otros grupos funcionales capaces de reaccionar entre sí para ciclar la disposición lineal, tal como grupos carboxilo y

40 grupos amino o hidroxilo.

En una realización preferida, uno de los bloques de construcción en la disposición lineal comprende un grupo alquino y otro bloque de construcción de la disposición lineal comprende un grupo azida. Los grupos azida y alquino pueden ser inducidos para reaccionar por medio de cicloadición, lo que da origen a la formación de una macroestructura cíclica. En el ejemplo ilustrado en la Figura 9, el resto funcional es un polipéptido que comprende un

45 bloque de construcción de propargilglicina en su extremo C-terminal y un grupo azidoacetilo en su extremo N-terminal. La reacción del grupo alquino y la azida en condiciones adecuadas produce la formación de un compuesto cíclico, que incluye una estructura de triazol dentro del macrociclo. En el caso de una biblioteca, en una realización, cada miembro de la biblioteca comprende bloques de construcción que contienen alquino y azida y se pueden ciclar de esta manera. En una segunda realización, todos los miembros de la biblioteca comprenden bloques de

50 construcción que contienen alquino y azida, pero solo una porción de la biblioteca se cicla. En una tercera realización, solo determinados restos funcionales incluyen bloques de construcción que contienen alquino y azida, y solo estas moléculas se ciclan. En las precedentes segunda y tercera realización, la biblioteca, después de la reacción de cicloadición, incluirá restos funcionales cíclicos y lineales.

En algunas realizaciones de la invención en que el mismo resto funcional, por ejemplo, triazina, se añade a cada una

55 y todas las fracciones de la biblioteca durante una etapa de síntesis particular, puede no ser necesario añadir una marca oligonucleotídica que codifica este resto funcional.

Los oligonucleótidos se pueden ligar por procedimientos químicos y enzimáticos. En una realización, los oligonucleótidos se ligan por medios químicos. El ligamiento químico del ADN y ARN se puede realizar por medio de reactivos tales como carbodiimida y bromuro de cianógeno hidrosolubles descritos, por ejemplo, por Shabarova, et al. (1991) *Nucleic Acids Research*, 19, 4247-4251, Federova, et al. (1996) *Nucleosides and Nucleotides*, 15, 1137-

60 1147, y Carriero y Damha (2003) *Journal of Organic Chemistry*, 68, 8328-8338. En una realización, el ligamiento

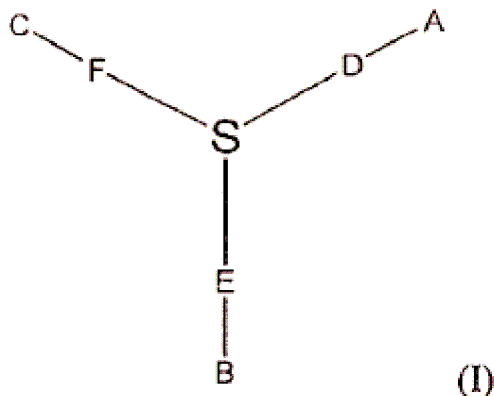
químico se realiza por medio de bromuro de cianógeno, 5 M en acetonitrilo, en una relación 1:10 v/v con oligonucleótido 5'-fosforilado en un buffer de pH 7,6 (1 M de MES + 20 mM de MgCl₂) a 0 grados durante 1 - 5 minutos. En otra realización, los oligonucleótidos se ligando por medio de procedimientos enzimáticos. En cada realización, los oligonucleótidos pueden ser bicatenarios, preferiblemente con una proyección de aproximadamente 5 a aproximadamente 14 bases. El oligonucleótidos también puede ser monocatenario, en tal caso se emplea una férula con una superposición de aproximadamente 6 bases con cada uno de los oligonucleótidos por ligar para ubicar los restos reactivos 5' y 3' próximos entre sí.

En una realización, el bloque de construcción inicial está unido operativamente a un oligonucleótido inicial. Antes o después de acoplar un segundo bloque de construcción al bloque de construcción inicial, una segunda secuencia de oligonucleótidos que identifica el segundo bloque de construcción se liga al oligonucleótido inicial. Los procedimientos para ligar la secuencia de oligonucleótidos inicial y la secuencia de oligonucleótidos entrante se exponen en las Figuras 1 y 2. En la Figura 1, el oligonucleótido inicial es bicatenario, y una cadena incluye una secuencia de la proyección que es complementaria con un extremo del segundo oligonucleótido y pone al segundo oligonucleótidos en contacto con el oligonucleótido inicial. Preferiblemente la secuencia de oligonucleótidos inicial de la proyección y la secuencia complementario del segundo oligonucleótidos son de al menos aproximadamente 4 bases; más preferiblemente ambas secuencias son de la misma longitud. El oligonucleótido inicial y el segundo oligonucleótidos se pueden ligar por medio de una enzima adecuada. Si el oligonucleótido inicial se liga al primer bloque de construcción en el extremo 5' de una de las cadenas (la "cadena superior"), por lo tanto la cadena que es complementaria con la cadena superior (la "cadena inferior") incluirá la secuencia de la proyección en su extremo 5', y el segundo oligonucleótidos incluirá una secuencia complementaria en su extremo 5'. Después del ligamiento del segundo oligonucleótido, se puede añadir una cadena que es complementaria con la secuencia del segundo oligonucleótido que es 3' a la secuencia complementaria de la proyección y que incluye la secuencia de la proyección adicional.

En una realización, el oligonucleótido se alarga como se expone en la Figura 2. El oligonucleótidos unido al resto funcional en crecimiento y el oligonucleótido entrante se ubican por ligamiento por el uso de una secuencia de la "férula", que incluye una región que es complementaria con el extremo 3' del oligonucleótido inicial y una región que es complementaria con el extremo 5' del oligonucleótido entrante. La férula pone el extremo 5' del oligonucleótido en proximidad con el extremo 3' del oligo entrante y el ligamiento se obtiene por medio de ligamiento enzimático. En el ejemplo ilustrado en la Figura 2, el oligonucleótido inicial consiste en 16 nucleobases y la férula es complementaria con las 6 bases en el extremo 3'. El oligonucleótido entrante consiste en 12 nucleobases, y la férula es complementaria con las 6 bases del extremo 5' terminal. La longitud de la férula y las longitudes de las regiones complementarias no son críticas. Sin embargo, las regiones complementarias deben ser suficientemente largas para permitir la formación de dímeros estables en las condiciones del ligamiento, pero tan largas como para producir un nucleótido codificador excesivamente largo en las moléculas finales. Se prefiere que las regiones complementarias sean de aproximadamente 4 bases a aproximadamente 12 bases, más preferiblemente de aproximadamente 5 bases a aproximadamente 10 bases, y con máxima preferencia de aproximadamente 5 bases a aproximadamente 8 bases de longitud.

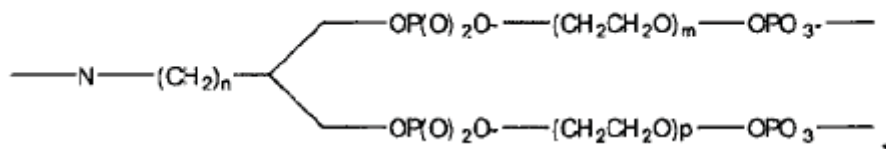
Los procedimientos de dividir y mezclar usados para los procedimientos para la síntesis de biblioteca expuestos en la presente memoria asegurar que cada resto funcional único está unido operativamente a al menos una secuencia de oligonucleótidos única que identifica el resto funcional. Si 2 o más marcas de oligonucleótidos diferentes se usan para al menos un bloque de construcción en al menos uno de los ciclos de síntesis, cada resto funcional diferente que comprende este bloque de construcción será codificado por múltiples oligonucleótidos. Por ejemplo, si se usan 2 marcas de oligonucleótidos para cada bloque de construcción durante la síntesis de una biblioteca de 4 ciclos, existirán 16 secuencias de ADN (2⁴) que codifican cada resto funcional único. Existen varias ventajas potenciales para codificar cada resto funcional único con múltiples secuencias. Primero, la selección de una combinación diferente de secuencias de la marca que codifican el mismo resto funcional asegura que estas moléculas se seleccionaron de modo independiente. Segundo, la selección de una combinación diferente de secuencias de la marca que codifican el mismo resto funcional eliminar la posibilidad de que la selección esté basada en la secuencia del oligonucleótido. Tercero, se pueden reconocer artefactos técnicos si el análisis de la secuencia sugiere que un resto funcional particular esta altamente enriquecido, pero solo aparece una combinación de secuencia de las muchas posibilidades. La marcación múltiple se puede lograr al tener reacciones de división independientes con el mismo bloque de construcción pero con una marca oligonucleotídicas diferente. De modo alternativo, se puede lograr la marcación múltiple por la mezcla de una relación apropiada de cada marca en una reacción de marcación única con un bloque de construcción individual.

En una realización, el oligonucleótido inicial es bicatenario y las dos cadenas se unen de modo covalente. Un medio de unión covalente de las cadenas se muestra en la Figura 3, en la que un resto ligador, por ejemplo, un ligador, se usa para ligar las dos cadenas y el resto funcional. El resto ligador puede ser cualquier estructura química que comprende un primer grupo funcional que está adaptado para reaccionar con un bloque de construcción, un segundo grupo funcional que está adaptado para reaccionar con el extremo 3' de un oligonucleótido, y un tercer grupo funcional que está adaptado para reaccionar con el extremo 5' de un oligonucleótido. Preferiblemente, el segundo y tercer grupos funcionales se orientan de modo de ubicar las cadenas de oligonucleótido en una orientación relativa que permita la hibridación de las dos cadenas. Por ejemplo, el resto ligador, por ejemplo, el ligador, puede tener la estructura general (I):

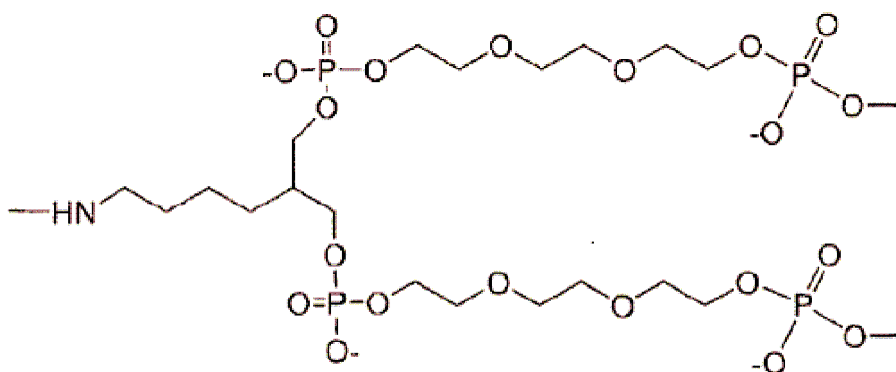


donde A, es un grupo funcional que puede formar un enlace covalente con un bloque de construcción, B es un grupo funcional que puede formar un enlace con el extremo 5' de un oligonucleótido, y C es un grupo funcional que puede formar un enlace con el extremo 3' de un oligonucleótido.

- 5 S es un átomo o un armazón. D, F y E son grupos químicos que unen los grupos funcionales A, C y B a S, que es un átomo nuclear o del armazón. Preferiblemente, (i) A es un grupo amino; B es un grupo fosfato; y C es un grupo fosfato; o (ii) en el que D, E y F son, de modo independiente, un grupo alquileo o un grupo oligo(etilen glicol); o (iii) en el que S es un átomo de carbono, un átomo de nitrógeno, un átomo de fósforo, un átomo de boro, un grupo fosfato, un grupo cíclico o un grupo policíclico; opcionalmente en el que el resto ligador es de la estructura



10 en el que cada uno de n, m y p es, de modo independiente, un número entero de 1 a aproximadamente 20; opcionalmente (A) en el que cada uno de n, m y p es de modo independiente un número entero de 2 a ocho, opcionalmente en el que cada uno de n, m y p es de modo independiente un número entero de 3 a 6; o (B) en el que el resto ligador tiene la estructura



15 En realizaciones en que el oligonucleótido inicial es bicatenario, los oligonucleótidos entrantes también son bicatenarios. Como se muestra en la Figura 3, el oligonucleótido inicial puede tener una cadena que es más larga que la otra, lo que proporciona una secuencia de la proyección. En esta realización, el oligonucleótido entrante incluye una secuencia de la proyección que es complementaria con la secuencia de la proyección del oligonucleótido inicial. La hibridación de las dos secuencia de la proyección complementarias pone el oligonucleótido entrante en posición para el ligamiento con el oligonucleótido inicial. Este ligamiento se puede realizar enzimáticamente por medio de una ADN o ARN ligasa. Las secuencias de la proyección del oligonucleótido entrante y el oligonucleótido inicial son preferiblemente de la misma longitud y consisten en dos o más nucleótidos, preferiblemente de 2 a aproximadamente 10 nucleótidos, más preferiblemente de 2 a aproximadamente 6 nucleótidos. En una realización

preferida, el oligonucleótido entrante es un oligonucleótido bicatenario que tiene una secuencia de la proyección en cada extremo. La secuencia de la proyección en un extremo es complementaria con la secuencia de la proyección del oligonucleótido inicial, mientras que después del ligamiento del oligonucleótido entrante y el oligonucleótido inicial, la secuencia de la proyección en el otro extremo es la secuencia de la proyección del oligonucleótido inicial del próximo ciclo. En una realización, las tres secuencias de la proyección son de 2 a 6 nucleótidos de longitud, y la secuencia codificadora del oligonucleótido entrante es de 3 a 10 nucleótidos de longitud, preferiblemente 3 a 6 nucleótidos de longitud. En una realización particular, las secuencias de la proyección son de 2 nucleótidos de longitud y la secuencia codificadora es de 5 nucleótidos de longitud.

En la realización ilustrada en la Figura 4, la cadena entrante tiene una región en su extremo 3' que es complementaria con el extremo 3' del oligonucleótido inicial, que deja las proyecciones en los extremo 5' de ambas cadenas. Los extremos 5' se pueden llenar por medio de, por ejemplo, una ADN polimerasa, tal como polimerasa vent, que da origen a un oligonucleótido bicatenario alargado. La cadena inferior de este oligonucleótido se puede eliminar, y añadir una secuencia adicional al extremo 3' de la cadena superior por medio del mismo procedimiento.

La marca oligonucleotídica codificador se forma como resultado de la adición sucesiva de oligonucleótidos que identifica cada bloque de construcción sucesivo. En una realización de los procedimientos de la invención, las marcas de oligonucleótidos sucesivas se pueden acoplar por ligamiento enzimático para producir un oligonucleótido codificador.

El ligamiento de oligonucleótidos catalizado por enzimas se puede realizar por medio de cualquier enzima que tenga capacidad de ligar fragmentos de ácido nucleico. Los ejemplos de enzimas incluyen ligasas, polimerasas, y topoisomerasas. En realizaciones específicas de la invención, ADN ligasa (EC 6.5.1.1), ADN polimerasa (EC 2.7.7.7), ARN polimerasa (EC 2.7.7.6) o topoisomerasa (EC 5.99.1.2) se usan para ligar los oligonucleótidos. Las enzimas contenidas en cada clase EC se pueden hallar, por ejemplo, descritas en Bairoch (2000) *Nucleic Acids Research* 28:304-5.

En una realización preferida, los oligonucleótidos usado en los procedimientos de la invención son oligodesoxinucleótidos y la enzima usada para catalizar el ligamiento de oligonucleótidos es ADN ligasa. A fin de que el ligamiento se produzca en presencia de la ligasa, es decir, para formar un enlace fosfodiéster entre dos oligonucleótidos, un oligonucleótido debe tener un grupo 5'fosfato libre y el otro oligonucleótido debe tener un grupo 3' hidroxilo libre. Los ejemplos de ADN ligasa que se pueden usar en los procedimientos de la invención incluyen T4 ADN ligasa, Taq ADN ligasa, T4 ARN ligasa, ADN ligasa (*E. coli*) (todas disponibles en, por ejemplo, New England Biolabs, MA).

Los expertos en la técnica entenderán que cada enzima usada para el ligamiento tiene actividad óptima en condiciones específicas, por ejemplo, temperatura, concentración del buffer, pH y tiempo. Cada una de estas condiciones se puede ajustar, por ejemplo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para obtener el ligamiento óptimo de las marcas de oligonucleótidos.

El oligonucleótido entrante puede ser de cualquier longitud conveniente, pero preferiblemente tiene al menos de tres de nucleobases de longitud. Más preferiblemente, el oligonucleótido entrante tiene 4 o más nucleobases de longitud. En una realización, el oligonucleótido entrante tiene de 3 a aproximadamente 12 nucleobases de longitud. Se prefiere que los oligonucleótidos de las moléculas de las bibliotecas de la invención tengan una secuencia terminal que puede servir como un cebador para PCR, como es conocido en la técnica. Tal secuencia terminar se puede incorporar como extremo terminar del oligonucleótido entrante añadido en el ciclo final de la síntesis de la biblioteca, o se pueda añadir después de la síntesis de la biblioteca, por ejemplo, por medio de los procedimientos de ligamiento enzimático descritos en la presente memoria.

Una realización preferida del procedimiento de la invención se expone en la Figura 5. El proceso comienza con una secuencia de ADN sintetizada que une su extremo 5' a un ligador que termina en un grupo amino. En la etapa 1, esta secuencia de ADN de partida se liga a una secuencia de ADN entrante en presencia de una cadena de ADN férula, ADN ligasa y ditiotreitól en buffer Tris. Esto produce una secuencia de ADN marcada que se puede usar directamente en la próxima etapa o se purifica, por ejemplo, por medio de HPLC o precipitación con etanol, antes de proseguir a la próxima etapa. En la etapa 2 el ADN marcado reacciona con un aminoácido activado protegido, en este ejemplo, un fluoruro de aminoácido protegido con Fmoc, que produce un conjugado de aminoácido-ADN protegido. En la etapa 3, el conjugado de aminoácido-ADN protegido se desprotege, por ejemplo, en presencia de piperidina, y el conjugado desprotegido resultante, opcionalmente, se purifica, por ejemplo, por HPLC o precipitación con etanol. El conjugado desprotegido es el producto del primer ciclo de síntesis, y es el material de partida para el segundo ciclo, que añade un segundo residuo de aminoácido al grupo amino libre del conjugado desprotegido.

En realizaciones en que se usa PCR para amplificar y/o secuenciar los oligonucleótidos codificadores de moléculas seleccionadas, los oligonucleótidos codificadores pueden incluir, por ejemplo, secuencias del cebador de PCR y/o cebadores de secuenciación (por ejemplo, cebadores, tales como, por ejemplo, 3'-GACTACCGCGCTCCCTCCG-5' y 3'-GACTCGCCCGACCGTTCCG-5'). Se puede incluir una secuencia del cebador de PCR, por ejemplo, en el oligonucleótido inicial antes del primer ciclo de síntesis, y/o se puede incluir con el primer oligonucleótido entrante, y/o se puede ligar al oligonucleótido codificador después del ciclo final de síntesis de la biblioteca, y/o se puede

incluir en el oligonucleótido entrante del ciclo final. Las secuencias del cebador de PCR añadidas después del ciclo final de síntesis de la biblioteca y/o en el oligonucleótido entrante del ciclo final se denominan en la presente memoria como "secuencias capuchón".

En una realización, la secuencia del cebador de PCR se diseña dentro de la marca oligonucleotídica codificador. Por ejemplo, una secuencia del cebador de PCR se puede incorporar en la marca inicial del oligonucleótido y/o se puede incorporar en la marca final de oligonucleótido. En una realización la misma secuencia del cebador de PCR se incorpora en la marca inicial y final del oligonucleótido. En otra realización, una primera secuencia del cebador de PCR se incorpora en la marca inicial del oligonucleótido y una segunda secuencia del cebador de PCR se incorpora en la marca final del oligonucleótido. Alternativamente, la segunda secuencia del cebador de PCR se puede incorporar en la secuencia capuchón que se describe en la presente memoria. En realizaciones preferidas, la secuencia del cebador de PCR es al menos de aproximadamente 5, 7, 10, 13, 15, 17, 20, 22, o 25 nucleótidos de longitud.

Las secuencias del cebador de PCR adecuadas para usar en las bibliotecas de la invención son conocidas en la técnica; los cebadores y procedimientos adecuados se exponen, por ejemplo, en Innis, et al., eds., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, San Diego: Academic Press (1990), cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad. Otros cebadores adecuados para usar en la construcción de las bibliotecas descritas en la presente memoria son los cebadores descritos en las publicaciones de PCT WO 2004/069849 y WO 2005/003375, cuyos contenidos totales se incorporan expresamente en la presente memoria por referencia.

El término "polinucleótido" como se usa en la presente memoria con referencia a cebadores, sondas y fragmentos o segmentos de ácido nucleico para sintetizar por extensión del cebador se define como una molécula compuesta de dos o más desoxirribonucleótidos, preferiblemente más de tres.

El término "cebador" como se usa en la presente memoria se refiere a un polinucleótido sea purificado de un digesto por restricción de ácido nucleico o producido sintéticamente, que sea capaz de actuar como punto de iniciación de la síntesis de ácido nucleico cuando se coloca en las condiciones en que se induce la síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementario con una cadena de ácido nucleico, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente para la polimerización tal como ADN polimerasa, transcriptasa inversa y similares, y en una temperatura y pH adecuados. El cebador es preferiblemente monocatenario para máxima eficiencia, pero en forma alternativa puede ser forma bicatenaria. Si es bicatenario, el cebador primero se trata de separar de su cadena complementaria antes de usarse para preparar los productos de extensión. Preferiblemente, el cebador es un polidesoxirribonucleótido. El cebador debe ser suficientemente largo para inicial la síntesis de los productos de extensión en presencia de los agentes para la polimerización. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, que incluyen temperatura y la fuente de cebador.

Los cebadores usados en la presente memoria se seleccionan por ser "sustancialmente" complementarios con las diferentes cadenas de cada secuencia específica por amplificar. Esto significa que el cebador debe ser suficientemente complementario para hibridar no aleatoriamente con su respectiva cadena molde. En consecuencia, la secuencia del cebador puede reflejar o no la secuencia exacta del molde.

Los cebadores de polinucleótidos se pueden preparar por medio de cualquier procedimiento adecuado, tal como, por ejemplo, los procedimientos de fosfotriéster o fosfodiéster descritos en Narang et al., (1979) Met. Enzymol., 68:90; Patente U.S. Núm. 4.356.270, Patente U.S. Núm. 4.458.066, Patente U.S. Núm. 4.416.988, Patente U.S. Núm. 4.293.652; y Brown et al., (1979) Met. Enzymol., 68:109.

En los casos en que las secuencias del cebador de PCR se incluyen en un oligonucleótido entrante, estos oligonucleótidos entrantes preferiblemente serán significativamente más largos que los oligonucleótidos entrantes añadidos en otros ciclos, debido a que ellos incluirán una secuencia codificadora y una secuencia del cebador de PCR.

En una realización, la secuencia capuchón se añade después de la adición del bloque de construcción final y el oligonucleótido entrante final, y la síntesis de una biblioteca como se expone en la presente memoria incluye la etapa de ligamiento de la secuencia capuchón al oligonucleótido codificador, de modo que la porción del oligonucleótido de sustancialmente todos los miembros de la biblioteca termina en una secuencia que incluye una secuencia del cebador de PCR. Preferiblemente, la secuencia capuchón se añade por el ligamiento a las fracciones combinadas que son productos del ciclo de síntesis final. La secuencia capuchón se puede añadir por medio de un proceso enzimático usado en la construcción de la biblioteca.

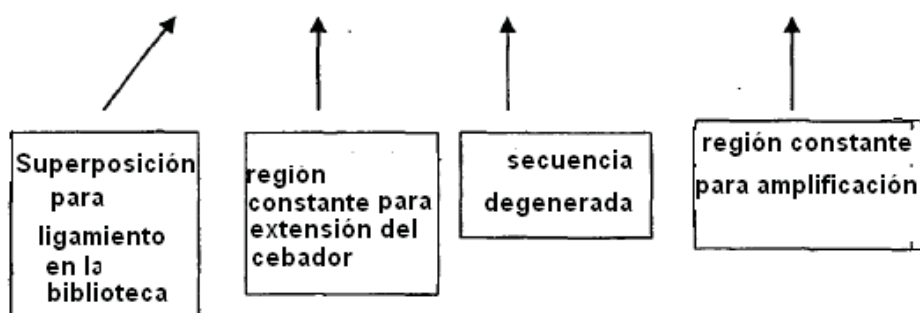
En una realización, la misma secuencia capuchón se liga a cada miembro de la biblioteca. En otra realización, se usa una pluralidad de secuencias capuchón. En esta realización, las secuencias capuchón de oligonucleótidos que contiene bases variables, por ejemplo, se ligan sobre miembros de la biblioteca después del ciclo de síntesis final. En una realización, después del ciclo de síntesis final, las fracciones se combinan y posteriormente se dividen en fracciones otra vez, cada fracción tiene una secuencia capuchón añadida diferente. Alternativamente, se pueden añadir múltiples secuencias capuchón a la biblioteca mezclada después del ciclo final de síntesis. En ambas

realizaciones, los miembros de la biblioteca final incluirán las moléculas que comprenden restos funcionales específicos ligados para identificar oligonucleótidos que incluyen dos o más secuencias capuchón diferentes.

- 5 En una realización, el cebador de terminación comprende una secuencia de oligonucleótidos que contiene nucleótidos variables, es decir, degenerados. Tales bases degeneradas dentro de los cebadores de terminación permiten la identificación de moléculas de la biblioteca de interés al determinar si una combinación de bloques de construcción es la consecuencia de la duplicación por PCR (secuencia idéntica) o apariciones independientes de la molécula (secuencia diferente). Por ejemplo, tales bases degeneradas pueden reducir el número potencial de falsos positivos durante el análisis biológico de la biblioteca codificada.

En una realización, un cebador de terminación degenerado comprende o tiene la siguiente secuencia:

- 10 5'-CAGCGTTCGA-3'
3'-AA GTCGCAAGCT NNNNN GTCTGTTCTGAAGTGGACG-5'

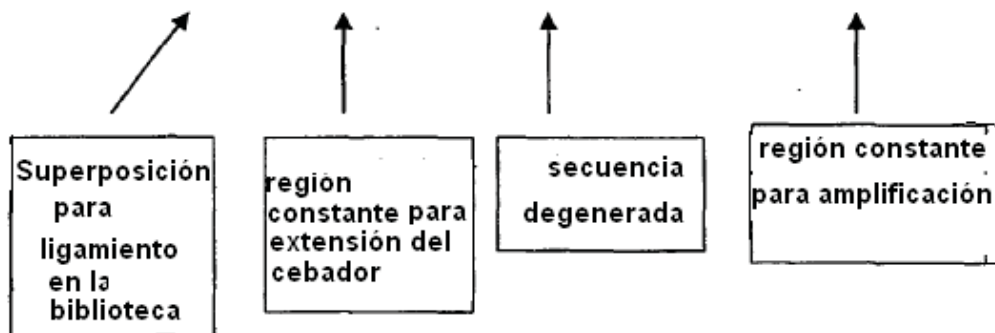


donde N puede ser cualquiera de las 4 bases, lo que permite 1024 secuencias diferentes (45). El cebador tiene la siguiente secuencia después de su ligamiento en la biblioteca y extensión del cebador:

- 15 5'-CAGCGTTCGA N'N'N'N'N'CAGACAAGCTTCACCTGC-3'
3'-AA GTCGCAAGCT N-N N N N GTCTGTTCTGAAGTGGACG-5'

En otra realización, el cebador de terminación comprende o tiene la siguiente secuencia:

3'-AA GTCGCAAGCTACG ABBBABBBAABBBA GACTACCGCGCTCCCTCCG



- 20 donde B puede ser cualquiera de C, G o T, lo que permite 19.683 secuencias diferentes (39). El diseño de la región degenerada en este cebador mejora el análisis de secuencia del ADN, las bases de A que flanquean e interrumpen las bases degeneradas B impiden las extensiones homopoliméricas mayores de 3 bases, y facilitan el alineamiento de secuencia.

- 25 En una realización, el oligonucleótido de terminación degenerado se liga a los miembros de la biblioteca por medio de una enzima adecuada y la cadena superior del oligonucleótido de terminación degenerado posteriormente se polimeriza por medio de una enzima adecuada, tal como una ADN polimerasa.

En otra realización, la secuencia cebadora de PCR es un "adaptador universal" o "cebador universal". Como se usa

en la presente memoria, un "adaptador universal" o "cebador universal" es un oligonucleótidos que contiene una región cebadora de PCR única, que es, por ejemplo, de aproximadamente 5, 7, 10, 13, 15, 17, 20, 22, o 25 nucleótidos de longitud, y se ubica en forma adyacente a una región cebadora de secuenciación única que es, por ejemplo, de aproximadamente 5, 7, 10, 13, 15, 17, 20, 22, o 25 nucleótidos de longitud, y opcionalmente está seguida por una secuencia clave discriminante única (o secuencia identificadora de la muestra) que consiste en al menos uno de cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidos (es decir, A, C, G, T).

Como se usa en la presente memoria, el término "secuencia clave discriminante" o "secuencia identificadora de la muestra" se refiere a una secuencia que se puede usar para marcar únicamente una población de moléculas de una muestra. Se pueden mezclar múltiples muestras, cada una que contiene una secuencia identificadora de la muestra única, secuenciar y re-clasificar después de la secuenciación del ADN para el análisis de las muestras individuales. La misma secuencia discriminante se puede usar para una biblioteca completa o, en forma alternativa, diferentes secuencias clave discriminantes para rastrear bibliotecas diferentes. En una realización, la secuencia clave discriminante está en el cebador de PCR 5', el cebador de PCR 3', o en ambos cebadores. Si ambos cebadores de PCR contienen una secuencia identificadora de la muestra, el número de muestras diferentes que se pueden mezclar con secuencias identificadoras de la muestra únicas es el producto de la cantidad de secuencias identificadoras de la muestra en cada cebador. En consecuencia, 10 cebadores 5' diferentes de secuencia identificadora de la muestra se pueden combinar con 10 cebadores 3' diferentes de secuencia identificadora de la muestra para producir 100 combinaciones diferentes de secuencia identificadora de la muestra.

Los ejemplos no limitantes de cebadores de PCR 5' y 3' únicos que contienen las secuencias clave discriminantes incluyen los siguientes:

Cebadores 5'(posiciones variables negrita e itálica):

5' A – GCCTTGCCAGCCCGCTCAG***AT***GACTCCCAAATCGATGTG;
 5' C – GCCTTGCCAGCCCGCTCAG***CT***GACTCCCAAATCGATGTG;
 5' G – GCCTTGCCAGCCCGCTCAG***GT***GACTCCCAAATCGATGTG;
 5' T – GCCTTGCCAGCCCGCTCAG***TT***GACTCCCAAATCGATGTG;
 5' AA – GCCTTGCCAGCCCGCTCAG***AA***TGACTCCCAAATCGATGTG;
 5' AC – GCCTTGCCAGCCCGCTCAG***ACT***GACTCCCAAATCGATGTG;
 5' AG – GCCTTGCCAGCCCGCTCAG***AGT***GACTCCCAAATCGATGTG;
 5' AT – GCCTTGCCAGCCCGCTCAG***ATT***GACTCCCAAATCGATGTG;

y

5' CA – GCCTTGCCAGCCCGCTCAG***CA***TGACTCCCAAATCGATGTG.

Los cebadores 3' SID (posiciones variables negrita e itálica):

3' A – GCCTCCCTCGCGCCATCAG***A***GCAGGTGAAGCTTGTCTG;
 3' C – GCCTCCCTCGCGCCATCAG***C***GCAGGTGAAGCTTGTCTG;
 3' G – GCCTCCCTCGCGCCATCAG***G***GCAGGTGAAGCTTGTCTG;
 3' T – GCCTCCCTCGCGCCATCAG***T***GCAGGTGAAGCTTGTCTG;
 3' AA – GCCTCCCTCGCGCCATCAG***AA***GCAGGTGAAGCTTGTCTG
 3' AC – GCCTCCCTCGCGCCATCAG***AC***GCAGGTGAAGCTTGTCTG
 3' AG – GCCTCCCTCGCGCCATCAG***AG***GCAGGTGAAGCTTGTCTG
 3' AT – GCCTCCCTCGCGCCATCAG***AT***GCAGGTGAAGCTTGTCTG;

y

3' CA - GCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGCAGGTGAAGCTTGTCTG

En una realización, la secuencia clave discriminante es de aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nucleótidos de longitud. En otra realización, la secuencia clave discriminante es una combinación de aproximadamente 1-4 nucleótidos. En aún otra realización, cada adaptador universal es de aproximadamente cuarenta y cuatro nucleótidos de longitud. En una realización los adaptadores universales se ligan, por medio de T4 ADN ligasa, en el extremo del oligonucleótido codificador. Se pueden diseñar diferentes adaptadores universales en forma específica para cada preparación de biblioteca y en consecuencia, proporcionarán un identificador único para cada biblioteca. El tamaño y la secuencia de los adaptadores universales puede ser modificado cuando se estime necesario por los expertos en la técnica.

Como se indicó antes, la secuencia de nucleótidos de la marca oligonucleotídica como parte de los procedimientos de esta invención se puede determinar por el uso de la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

La marca oligonucleotídica está compuesta de polinucleótidos que identifican los bloques de construcción que componen el resto funcional que se describe en presente. La secuencia de ácidos nucleicos de la marca oligonucleotídica se determina al someter la marca oligonucleotídica a una reacción de PCR de la siguiente manera. La muestra apropiada se pone en contacto con un par cebador de PCR, cada miembro del par tiene una secuencia de nucleótidos preseleccionada. El par cebador de PCR es capaz de iniciar las reacciones de extensión del cebador por la hibridación en un sitio de unión del cebador de PCR en la marca oligonucleotídica codificadora. El sitio de unión del cebador de PCR se diseña preferiblemente en la marca oligonucleotídica codificadora. Por ejemplo, un sitio de unión del cebador de PCR se puede incorporar en la marca inicial del oligonucleótido y el segundo sitio de unión del cebador de PCR puede estar en la marca final oligonucleotídica. En forma alternativa, el segundo sitio de unión del cebador de PCR se puede incorporar en la secuencia capuchón como se describe en la presente memoria. En realizaciones preferidas, el sitio de unión del cebador de PCR tiene al menos aproximadamente 5, 7, 10, 13, 15, 17, 20, 22, o 25 nucleótidos de longitud.

La reacción de PCR se realiza por mezclado del par cebador de PCR, preferiblemente una cantidad predeterminada del mismo, con los ácidos nucleicos de la marca oligonucleotídica codificadora, preferiblemente una cantidad predeterminada de la misma, en un buffer de PCR para formar una mezcla de reacción de PCR. La mezcla se somete a termociclado durante una cantidad de ciclos, que está normalmente predeterminada, suficiente para la formación de un producto de reacción de PCR. Una cantidad suficiente de producto es una que se aísla en una cantidad suficiente para permitir la determinación de la secuencia del ADN.

La PCR se realiza normalmente por termociclado es decir, aumento y disminución repetido de la temperatura de una mezcla de reacción de PCR dentro de un intervalo de temperatura cuyo límite inferior es aproximadamente 30°C a aproximadamente 55°C y cuyo límite superior es aproximadamente 90°C a aproximadamente 100°C. El aumento y disminución puede ser continuo, pero preferiblemente es fásico con períodos de tiempo de estabilidad relativa de temperatura en cada una de las temperaturas, lo que favorece la síntesis, desnaturalización e hibridación del polinucleótido.

La reacción de PCR se realiza por medio de cualquier procedimiento adecuado. En general se produce en una solución acuosa regulada, es decir, un buffer de PCR, preferiblemente a un pH de 7-9. Preferiblemente, está presente un exceso molar del cebador. Se prefiere un gran exceso molar para aumentar la eficiencia del proceso.

El buffer de PCR también contiene los desoxirribonucleótido trifosfatos (sustratos de síntesis de polinucleótido) dATP, dCTP, dGTP, y dTTP y una polimerasa, normalmente termoestable, todo en cantidades adecuadas para la reacción de extensión del cebador (síntesis del polinucleótido) reacción. La solución resultante (mezcla de PCR) se calienta a aproximadamente 90° C-100° C durante aproximadamente 1 a 10 minutos, preferiblemente de 1 a 4 minutos. Después de este período de calentamiento la solución se deja enfriar a 54° C, que es preferible para la hibridación del cebador. La reacción de síntesis puede ocurrir a una temperatura que varía de temperatura ambiente hasta una temperatura superior a la cual la polimerasa (agente inductor) ya no actúa eficientemente. En consecuencia, por ejemplo, si se usa ADN polimerasa, la temperatura es generalmente no mayor de aproximadamente 40° C. El termociclado se repite hasta que se produce la cantidad deseada de producto de PCR. Un ejemplo de buffer de PCR comprende los siguientes reactivos: 50 mM de KCl; 10 mM de Tris-HCl a pH 8,3; 1,5 mM de MgCl₂; 0,001% (p/vol) gelatina, 200 μM de dATP; 200 μM de dTTP; 200 μM de dCTP; 200 μM de dGTP; y 2,5 unidades Termus aquaticus (Taq) de ADN polimerasa I por 100 microlitros de buffer.

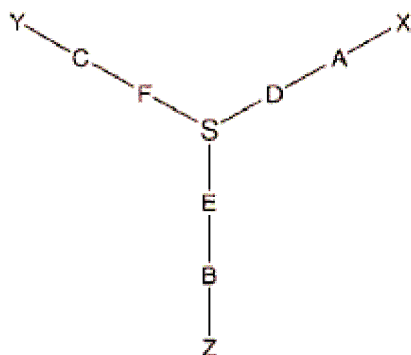
Las enzimas adecuadas para alargar enzimas las secuencias cebadoras incluyen, por ejemplo, ADN polimerasa I de E. coli, ADN polimerasa Taq, fragmento de Klenow de ADN polimerasa I de E. coli, T4 ADN polimerasa, otras ADN polimerasas disponibles, transcriptasa inversa, y otras enzimas, que incluyen enzimas termoestables, que facilitarán la combinación de los nucleótidos de la manera apropiada para formar los productos de extensión del cebador que son complementarios con cada cadena de ácido nucleico. En general, la síntesis se iniciará en el extremo 3' de cada cebador y procederá en dirección 5' de la cadena molde, hasta la que la síntesis termina, con la producción de moléculas de longitudes diferentes.

La cadena de ADN recién sintetizada y su cadena complementaria forma una molécula bicatenaria que se puede usar en las subsiguientes etapas del proceso de análisis.

Los procedimientos de amplificación por PCR se describen en las Patentes U.S. Nos. 4.683.192, 4.683.202, 4.800.159, y 4.965.188, y al menos en tecnología PCR: Principles and Applications for DNA Amplification, H. Erlich, ed., Stockton Press, New York (1989); y PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al., eds., Academic Press, San Diego, Calif. (1990).

Una vez que la marca oligonucleotídica codificadora se ha amplificado, se pueden determinar la secuencia de la marca, y finalmente la composición de la molécula seleccionada, por medio del análisis de la secuencia de ácidos nucleicos, un procedimiento bien conocido para determinar la secuencia de las secuencias de nucleótidos. El análisis de la secuencia de ácidos nucleicos se aproxima por una combinación de (a) técnicas fisicoquímicas, basadas en la hibridación o desnaturalización de una cadena sonda más su blanco complementario, y (b) reacciones enzimáticas con las polimerasas.

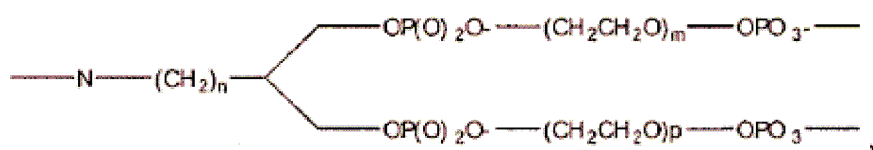
Los compuestos se pueden producir por medio de los procedimientos de la invención y recolecciones de tales compuestos, sea como especies aisladas o combinadas para formar una biblioteca de estructura químicas. Los compuestos descritos en la presente memoria incluyen compuestos de la fórmula



donde X es un resto funcional que comprende uno o más bloques de construcción, Z es un oligonucleótido unido a su extremo 3' terminal a B e Y es un oligonucleótido que está unido a C en su extremo 5' terminal. A es un grupo funcional que forma un enlace covalente con X, B es un grupo funcional que forma un enlace con el extremo 3' de Z y C es un grupo funcional que forma un enlace con el extremo 5' de Y. D, F y E son grupos químicos que unen grupos funcionales A, C y B a S, que es un átomo del núcleo o el armazón. Preferiblemente, D, E y F son de modo independiente una cadena de átomos, tales como una cadena alqueno o una cadena oligo(etilenglicol), y D, E y F pueden ser iguales o diferentes, y preferiblemente son efectivos para permitir la hibridación de los dos oligonucleótidos y la síntesis del resto funcional.

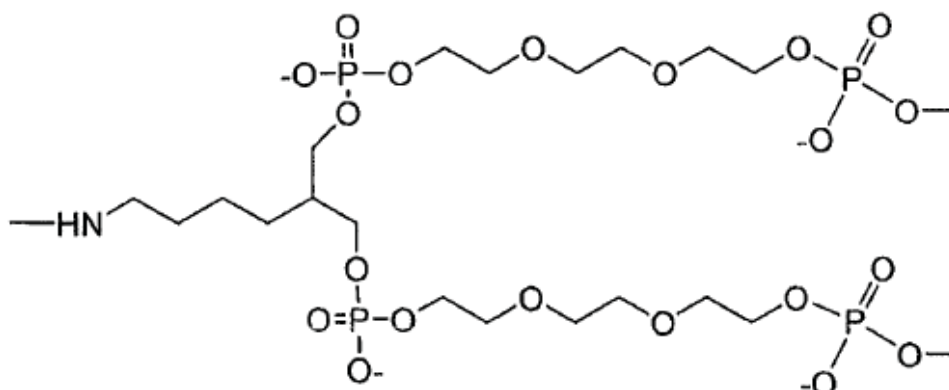
Preferiblemente, Y y Z son sustancialmente complementarios y están orientados en el compuesto para permitir el apareamiento de bases de Watson-Crick y la formación de duplex en condiciones adecuadas. Y y Z son de la misma longitud o diferentes longitudes. Preferiblemente, Y y Z son de la misma longitud, o uno de Y y Z es de 1 a 10 bases más largas que el otro. En una realización preferida, Y y Z tienen 10 o más bases de longitud y tienen regiones complementarias de diez o más pares de bases. Más preferiblemente, Y y Z son sustancialmente complementarias en toda su longitud, es decir, ellos tienen no más de un apareamiento erróneo por cada diez pares de bases. Con máxima preferencia, Y y Z son complementarias en toda su longitud, es decir, excepto por cualquier región de la proyección de Y o Z, las cadenas se hibridan por medio del apareamiento de Watson-Crick sin errores de apareamiento a lo largo de su longitud completa.

S puede ser un átomo individual o un armazón molecular. Por ejemplo, S puede ser un átomo de carbono, un átomo de boro, un átomo de nitrógeno o un átomo de fósforo, o un armazón poliatómico, tal como un grupo fosfato o un grupo cíclico, tal como un grupo cicloalquilo, cicloalqueno, heterocicloalquilo, heterocicloalqueno, arilo o heteroarilo. En una realización, el ligador es un grupo de la estructura



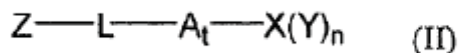
donde cada uno de n , m y p es, de modo independiente, un número entero de 1 a aproximadamente 20,

preferiblemente de 2 a ocho, y más preferiblemente de 3 a 6. En una realización particular, el ligador tiene la estructura que se muestra a continuación.

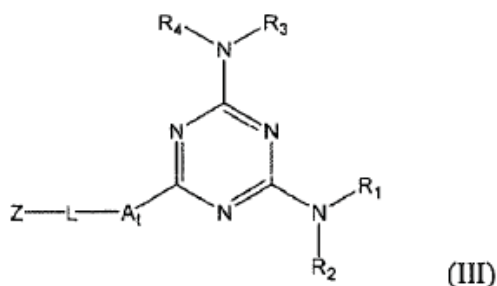


En una realización, las bibliotecas descritas en la presente memoria incluyen moléculas que consisten en un resto funcional compuesto de bloques de construcción, donde cada resto funcional está unido operativamente a un oligonucleótido codificador. La secuencia de nucleótidos del oligonucleótido codificador es indicador de los bloques de construcción presentes en el resto funcional, y en algunas realizaciones, la conectividad o disposición de los bloques de construcción. La invención proporciona la ventaja de que la metodología usada para construir el resto funcional y que se usa para construir la marca oligonucleotídica se pueden llevar a cabo en el mismo medio de reacción, preferiblemente un medio acuoso, en consecuencia se simplifica el procedimiento de preparar la biblioteca comparada con los procedimientos de la técnica previa. En ciertas realizaciones en las que las estas de ligamiento del oligonucleótido y las etapas de adición del bloque de construcción no se pueden realizar en medio acuoso, cada reacción tendrá un pH óptimo diferente. En estas realizaciones, la reacción de adición del bloque de construcción se puede realizar a un pH y temperatura adecuados en un buffer acuoso adecuado. El buffer posteriormente se puede intercambiar por un buffer acuoso que proporciona un pH adecuado para el ligamiento de oligonucleótidos.

Se describen en la presente memoria compuestos, y bibliotecas que comprenden los compuestos de Fórmula II



donde X es un armazón molecular, cada Y es de modo independiente, un resto periférico, y n es un número entero de 1 a 6. Cada A es de modo independiente, un bloque de construcción y n es un número entero de 0 a aproximadamente 5. L es un resto ligador y Z es un oligonucleótido monocatenario o bicatenario que identifica la estructura $-A_1-X(Y)_n$. La estructura $X(Y)_n$ puede ser, por ejemplo, una las estructuras de armazón que se exponen en la Tabla 8 (ver más adelante). Se describen en la presente memoria compuestos, y bibliotecas que comprenden los compuestos de Fórmula III:

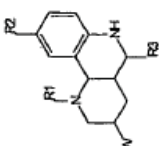
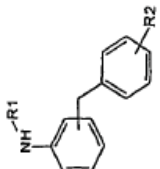
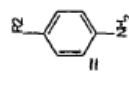
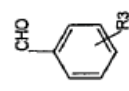
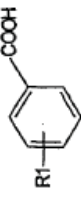
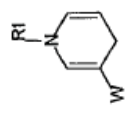
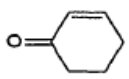


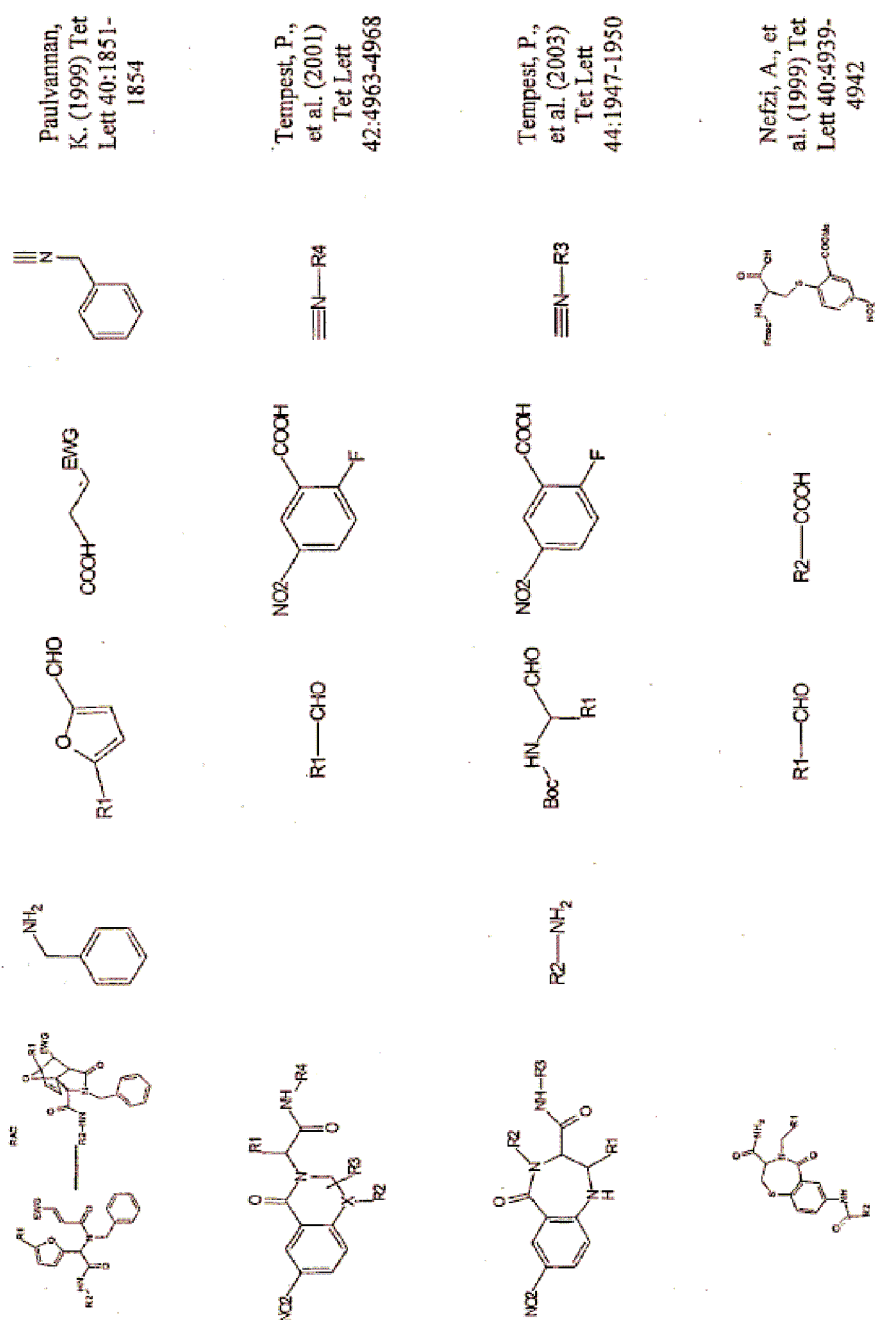
donde t es un número entero de 0 a aproximadamente 5, preferiblemente de 0 a 3, y cada A es, de modo independiente, un bloque de construcción. L es un resto ligador y Z es un oligonucleótido monocatenario o bicatenario que identifica cada A y R1, R2, R3 y R4. R1, R2, R3 y R4 son de modo independiente un sustituyente seleccionado de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, heteroarilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcoxi, ariloxi,

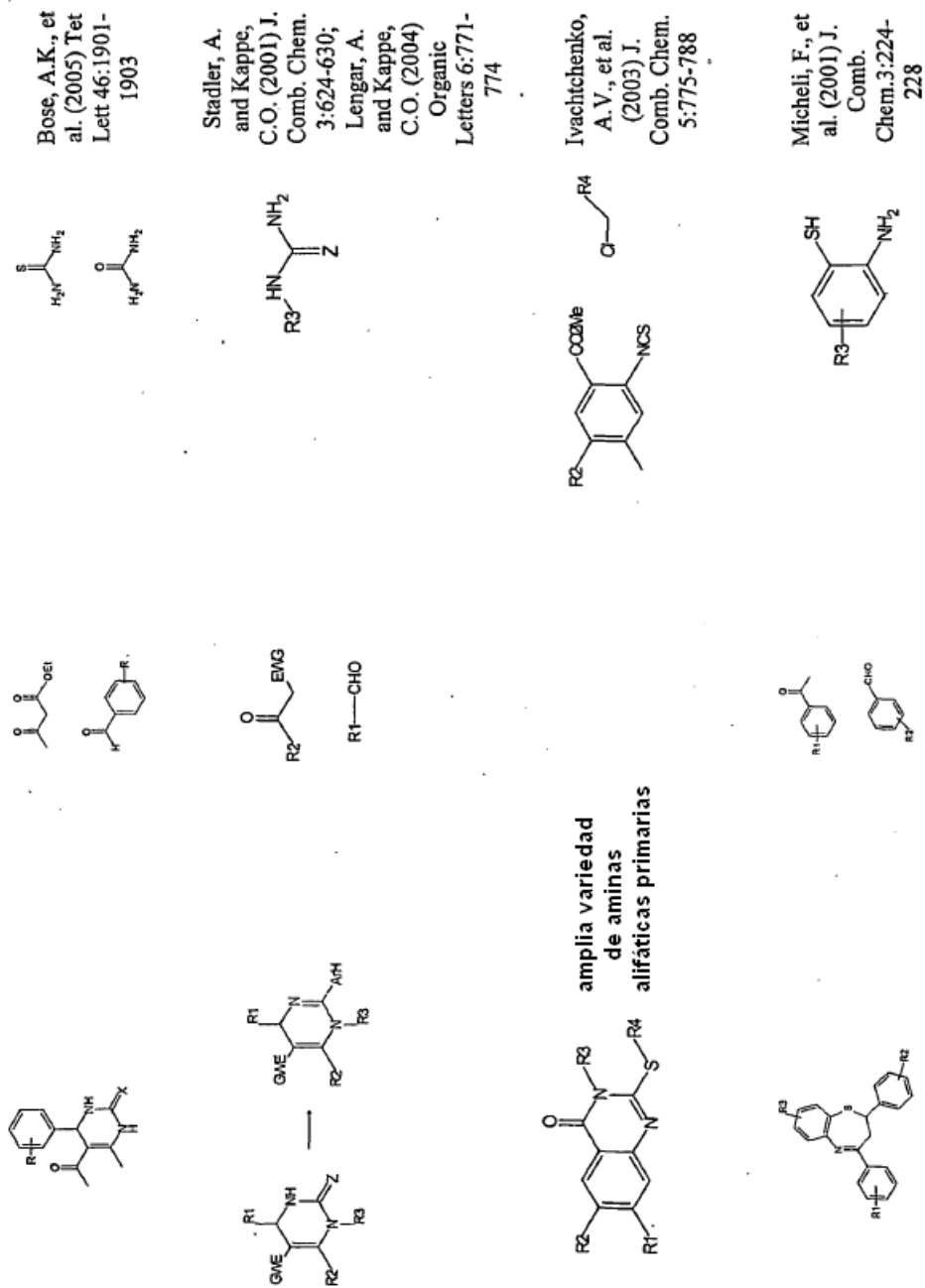
amino, y amino sustituido. En una realización, cada A es un residuos de aminoácido.

5 Las bibliotecas que incluyen compuestos de Fórmula II o Fórmula III pueden comprender al menos aproximadamente 100; 1000; 10.000; 100.000; 1.000.000 o 10.000.000 compuestos de Fórmula II o Fórmula III. En una realización, la biblioteca se prepara por medio de un procedimiento diseñado para producir una biblioteca que comprende al menos aproximadamente 100; 1000; 10.000; 100.000; 1.000.000 o 10.000.000 compuestos de Fórmula H o Fórmula III.

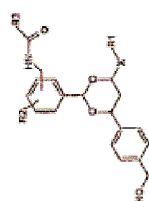
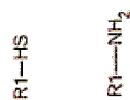
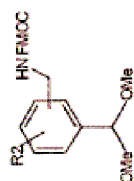
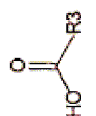
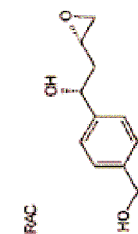
Tabla 8

Estructuras	Amina	Aldehído/cetona	Ácido carboxílico	Otros	Referencia
 	 aminas	 benzaldehídos y furfural		   	Carranco, I., et al. (2005) J. Comb. Chem. 7:33-41 Rosamilia, A.E., et al. (2005) Organic Letters 7:1525-1528 Syeda Huma, H.Z., et al. (2002) Tet Lett 43:6485- 6488 Tempest, P., et al. (2001) Tet Lett 42:4959-4962

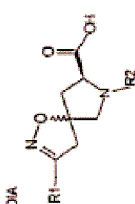
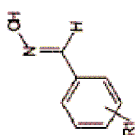
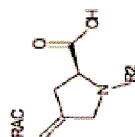




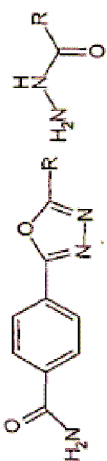
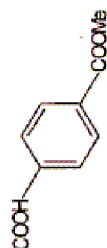
Stemson,
S.M., et al.
(2001) Org.
Lett. 3:4239-
4242



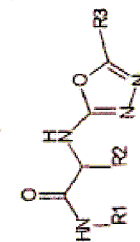
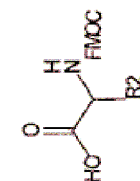
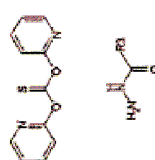
Cheng, W.-C.,
et al. (2002) J.
Org. Chem.
67:5673-
5677; Park,
K.-H., et al.
(2001) J
Comb Chem
3:171-176

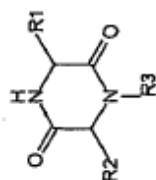


Brown, B.J.,
et al. (2000)
Synlett 1:131-
133



Kilburn, J.P.,
et al. (2001)
Tet Lett
42:2583-2586

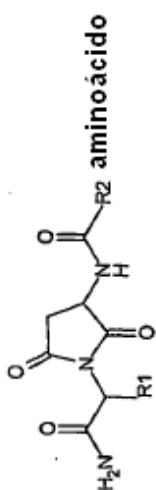




aminoácido

éster de aminoácido

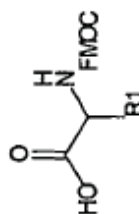
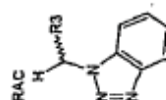
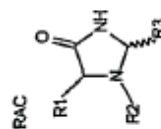
del Fresno,
M., et al.
(1998) Tet
Lett 39:2639-
2642



aminoácido

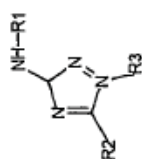
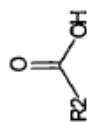
ácidos carboxílicos

Alvarez-
Gutierrez,
J.M., et al.
(2000) Tet
Lett 41:609-
612

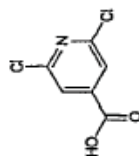


Rinnová, M.,
et al. (2002) J.
Comb.Chem
4:209-213

Makara,
G.M., et al.
(2002)
Organic Lett
4:1751-1754

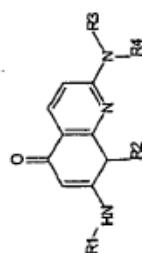
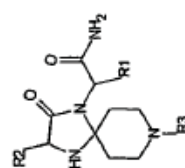


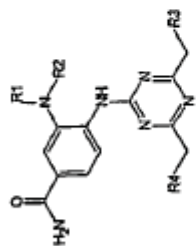
Schell, P., et
al. (2005) J.
Comb. Chem
7:96-98



Feliu, L., et
al. (2003) J.
Comb. Chem.
5:356-361

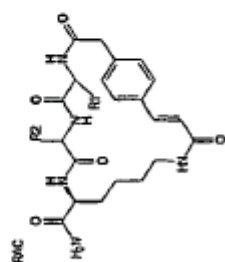
aminoácidos





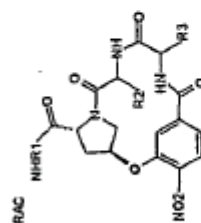
Aminas

Aldehidos



aminoácidos

Hiroshige,
M., et al.
(1995) J. Am.
Chem. Soc.
117:11590-
11591



aminoácidos

Bose, A.K., et
al. (2005) Tet
Lett 46:1901-
1903

Una ventaja de los procedimientos de la invención es que se pueden usar para preparar bibliotecas que comprenden grandes cantidades de compuestos. La capacidad de amplificar secuencias de oligonucleótidos codificadoras por medio de procedimientos conocidos tales como la reacción en cadena de polimerasa ("PCR") significa que las moléculas seleccionadas se pueden identificar incluso si se recuperan relativamente pocas copias.

Esto permite el uso práctico de bibliotecas muy grandes, que como consecuencia de su alto grado de complejidad, comprende relativamente pocas copias de cualquier miembro de biblioteca dado, o requiere el uso de volúmenes muy grandes. Por ejemplo, una biblioteca que consiste en 108 estructuras únicas en la que cada estructura tiene 1 x 10¹² copias (aproximadamente 1 picomol), requiere aproximadamente 100 L de solución con 1 µM de concentración efectiva. Para la misma biblioteca, si cada miembro es representado por 1.000.000 copias, el volumen requerido es 100 µL con una concentración efectiva de 1 µM.

En una realización preferida, la biblioteca comprende de aproximadamente 103 a aproximadamente 10¹⁵ copias de cada miembro de biblioteca. Debido a las diferencias de eficiencia de síntesis entre los miembros de la biblioteca, es posible que diferentes miembros de la biblioteca tengan diferentes números de copias en cualquier biblioteca dada. En consecuencia, si bien el número de copias de cada miembro teóricamente presente en la biblioteca puede ser igual, el número real de copias de cualquier miembro de la biblioteca dada es independiente del número de copias de cualquier otro miembro. Más preferiblemente, las bibliotecas de compuesto de la invención incluyen al menos aproximadamente 105, 106 o 107 copias de cada miembro de la biblioteca, o de sustancialmente todos los miembros de biblioteca. Por "sustancialmente todos" los miembros de biblioteca se entiende al menos aproximadamente 85% de los miembros de la biblioteca, preferiblemente al menos aproximadamente 90%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de los miembros de la biblioteca.

Preferiblemente, la biblioteca incluye un número suficiente de copias de cada miembro que permite realizar múltiples rondas (es decir, dos o más) de selección contra un blanco biológico, con cantidades suficientes de moléculas de unión restantes después de la ronda final de selección para permitir la amplificación de la marca de oligonucleótidos de las moléculas restantes y, en consecuencia, la identificación de restos funcionales de la moléculas de unión. Una representación esquemática de tal proceso de selección se ilustra en la Figura 6, en que la 1 y 2 representan los miembros de la biblioteca, B es una molécula blanco y X es un resto unido operativamente a B que permite la eliminación de B del medio de selección. En este ejemplo, el compuesto 1 se une a B, mientras que el compuesto 2 no se une a B. El proceso de selección, como se describe en la Ronda 1, comprende (I) poner en contacto una biblioteca que comprende los compuestos 1 y 2 con B-X en condiciones adecuadas para unión del compuesto 1 a B; (II) eliminar el compuesto 2, (III) disociar el compuesto 1 de B y eliminar BX del medio de reacción. El resultado de la Ronda I es una colección de moléculas que está enriquecido en el compuesto 1 con respecto al compuesto 2. Las posteriores rondas que emplean las etapas I-III producen el posterior enriquecimiento del compuesto 1 respecto al compuesto 2. Si bien tres rondas de selección se muestran en la Figura 6, en la práctica se puede emplear cualquier número de rondas, por ejemplo de una ronda a diez rondas, para obtener el enriquecimiento deseado de las moléculas de unión con respecto a las moléculas de no unión.

En la realización mostrada en la Figura 6, no existe amplificación (síntesis de más copias) de los compuestos restantes después de cualquiera de las rondas de selección. Tal amplificación puede producir una mezcla de compuestos que no compatible con las cantidades relativas de los compuestos restantes después de la selección. Esta incompatibilidad se debe al hecho de que ciertos compuestos se pueden sintetizar más fácilmente que otros compuestos, y por ende se pueden amplificar de una manera que no es proporcional a su presencia después de la selección. Por ejemplo, si el compuesto 2 se sintetiza más fácilmente que el compuesto 1, la amplificación de las moléculas restantes después de la Ronda 2 puede producir una amplificación desproporcionada del compuesto 2 con respecto al compuesto 1, y una mezcla de compuestos resultante con mucho menor enriquecimiento (si hubiera) del compuesto 1 con respecto al compuesto 2.

En una realización, el blanco se inmoviliza en un soporte sólido por cualquier técnica de inmovilización conocida. El soporte sólido puede ser, por ejemplo, una matriz insoluble en agua contenida dentro de una columna o una membrana de cromatografía. La biblioteca codificada se puede aplicar a una matriz insoluble en agua dentro de una columna cromatográfica. La columna posteriormente se lava para eliminar los agentes de unión no específicos. Los compuestos unidos al blanco posteriormente se pueden disociar por el cambio de pH, concentración salina, concentración de disolvente orgánico, u otros procedimientos, tales como competición con un ligando conocido por el blanco.

En otra realización, el blanco está libre en solución y se incuban con la biblioteca codificada. Los compuestos que se unen al blanco (también denominados en la presente memoria como "ligandos") se aíslan selectivamente por una etapa de separación por tamaño tal como filtración en gel o ultrafiltración. En una realización, la mezcla de compuestos codificados y la biomolécula blanco se pasan a través de una columna de cromatografía por exclusión de tamaño (filtración en gel), que separa cualquier complejo ligando-blanco de los compuestos no unidos. Los complejos ligando-blanco se transfieren a una columna de cromatografía de fase inversa, que disocia los ligandos del blanco. Los ligandos disociados se analizan posteriormente por amplificación por PCR y análisis de secuencia de los oligonucleótidos codificadores. Este abordaje es particularmente ventajoso en situaciones en que la inmovilización del blanco puede producir pérdida de actividad.

En algunas realizaciones de la invención, el procedimiento de selección puede comprender la amplificación del

oligonucleótido codificador de al menos un miembro de la biblioteca de compuestos que se une a un blanco previo a la secuenciación.

En una realización, la biblioteca de compuestos que comprende oligonucleótidos codificadores se amplifica antes del análisis de secuencia a fin de minimizar cualquier potencial asimetría en la distribución de la población de moléculas de ADN presentes en la mezcla de la biblioteca seleccionada. Por ejemplo, solo una pequeña cantidad de biblioteca se recupera después de una etapa de selección y normalmente se amplifica por medio de PCR antes del análisis de secuencia. La PCR tiene el potencial de producir una asimetría en la distribución de la población de moléculas de ADN presentes en la mezcla de la biblioteca seleccionada. Esto es especialmente problemático cuando el número de moléculas de entrada es pequeño y las moléculas de entrada son moldes de PCR malos. Los productos de PCR producidos en los primeros ciclos son moldes más eficientes que la biblioteca de duplex covalentes, y en consecuencia la frecuencia de estas moléculas en la población amplificada final puede ser mucho más alta que en el molde de entrada original.

Por consiguiente, a fin de minimizar esta potencial asimetría de la PCR; en una realización de la invención, una población de oligonucleótidos de cadena simple correspondientes a los miembros de la biblioteca individual se produce, por ejemplo, por medio de un cebador en una reacción, seguido por amplificación PCR por medio de dos cebadores. Al realizar esto, existe una acumulación lineal de producto de extensión del cebador de cadena simple antes de la amplificación exponencial por medio de PCR, y la diversidad y distribución de las moléculas en el producto de extensión del cebador acumulado refleja más precisamente la diversidad y distribución de las moléculas presentes en el modelo de entrada original, debido a que la fase de amplificación exponencial ocurre solo después de que mucha de la diversidad molecular original presente está representada en la población de moléculas producidas durante la reacción de extensión del cebador.

Una vez que los ligandos únicos son identificados por el proceso descrito anteriormente, se pueden aplicar varios niveles de análisis para producir la información de la relación estructura-actividad y guiar la posterior optimización de la afinidad, especificidad y bioactividad del ligando. En ligandos derivados de la misma estructura, se puede emplear un modelado molecular tridimensional para identificar los rasgos estructurales significativos comunes a los ligandos, de este modo se generan familias de ligandos de molécula pequeña que presumiblemente se unen a un sitio común de la biomolécula blanco.

Se puede usar una variedad de abordajes de análisis para obtener ligandos que posean afinidad alta por un blanco pero afinidad significativamente más débil por otro blanco estrechamente relacionado. Un abordaje de selección es identificar ligandos para ambas biomoléculas en experimentos paralelos y posteriormente eliminar los ligandos comunes por una comparación de referencia cruzada. En este procedimiento, los ligandos para biomolécula se pueden identificar por separado como se describió antes. Este procedimiento es compatible con las biomoléculas blanco inmovilizadas y las biomoléculas blanco libres en solución.

Para las biomoléculas blanco inmovilizadas, otro abordaje es añadir una etapa de preselección que elimina todos los ligandos que se unen a la biomolécula no blanco de la biblioteca. Por ejemplo, una primera biomolécula se puede poner en contacto con una biblioteca codificada como se describió anteriormente. Los compuestos que no se unen a la primera biomolécula posteriormente se separan de cualquier complejo de primera biomolécula-ligando que se forma. La segunda biomolécula seguidamente se pone en contacto con los compuestos que no se unieron a la primera biomolécula. Los compuestos que se unen a la segunda biomolécula se pueden identificar como se describió anteriormente y tienen afinidad significativamente mayor para la segunda biomolécula que para la primera molécula.

Un ligando para una biomolécula de función desconocida que se identifica por el procedimiento descrito antes también se puede usar para determinar la función biológica de la biomolécula. Esto es ventajoso porque si bien nuevas secuencias génicas aún se deben identificar, las funciones de las proteínas codificadas por estas secuencias y la validez de estas proteínas como blancos para nuevos descubrimiento y desarrollo de fármacos son difíciles de terminar y representan tal vez el obstáculo más significativo para aplicar la información genómica al tratamiento de una enfermedad. Los ligandos específicos del blanco obtenidos mediante el proceso descrito en esta invención se pueden emplear efectivamente en los ensayos biológicos de célula completa o en modelos animales apropiados para entender la función de la proteína blanco y la validez de la proteína blanco para la intervención terapéutica. Este abordaje también puede confirmar que el blanco es específicamente susceptible para el descubrimiento de fármacos de molécula pequeña.

En una realización, uno o más compuestos de una biblioteca de la invención se identifican como ligandos para una biomolécula particular. Estos compuestos posteriormente se pueden evaluar en un ensayo in vitro en cuanto a la capacidad de unirse a la biomolécula. Preferiblemente, los restos funcionales de los compuestos de unión se sintetizan sin la marca de oligonucleótido o resto ligador, y estos restos funcionales se evalúan en cuanto a la capacidad de unirse a la biomolécula.

El efecto de la unión de los restos funcionales a las biomolécula sobre la función de la biomolécula también se puede evaluar por medio de ensayos in vitro libres de células o basado en células. Para una biomolécula que tiene una función desconocida, el ensayo puede incluir una comparación de la actividad de la biomolécula en presencia y

ausencia del ligando, por ejemplo, por la medición directa de la actividad, tal como actividad enzimática o por una medición indirecta, tal como una función celular que está influida por la biomolécula. Si la biomolécula es de función desconocida, una célula que expresa la biomolécula se puede poner en contacto con el ligando y se evalúa el efecto del ligando sobre la viabilidad, función, fenotipo, y/o expresión del gen de la célula. El ensayo in vitro puede ser, por ejemplo, un ensayo de muerte celular, un ensayo de proliferación celular o un ensayo de replicación viral. Por ejemplo, si la biomolécula es una proteína expresada por un virus, una célula infectada con el virus se puede poner en contacto con un ligando para la proteína. Posteriormente se puede evaluar el efecto de la unión del ligando a la proteína sobre la viabilidad viral.

Un ligando identificado por el procedimiento de la invención también se puede evaluar en un modelo in vivo o en un ser humano. Por ejemplo, el ligando se puede evaluar en un animal u organismo que produce la biomolécula. Se puede determinar cualquier cambio resultante en el estado de salud (por ejemplo, progresión de la enfermedad) del animal u organismo.

En una biomolécula, tal como una molécula de proteína o un ácido nucleico, de función desconocida, el efecto de un ligando que se une a la biomolécula en una célula u organismo que produce la biomolécula puede proporcionar información respecto de la función biológica de la biomolécula. Por ejemplo, la observación de que un proceso celular particular se inhibe en presencia del ligando indica que el proceso depende, al menos en parte, de la función de la biomolécula.

Los ligandos identificados por medio de los procedimientos de la invención también se pueden usar como reactivos de afinidad para la biomolécula a la que se usan. En una realización, tales ligandos se usan para efectuar la purificación por afinidad de la biomolécula, por ejemplo, por medio de cromatografía de una solución que comprende la biomolécula por medio de una fase sólida al que se unen uno o más ligandos.

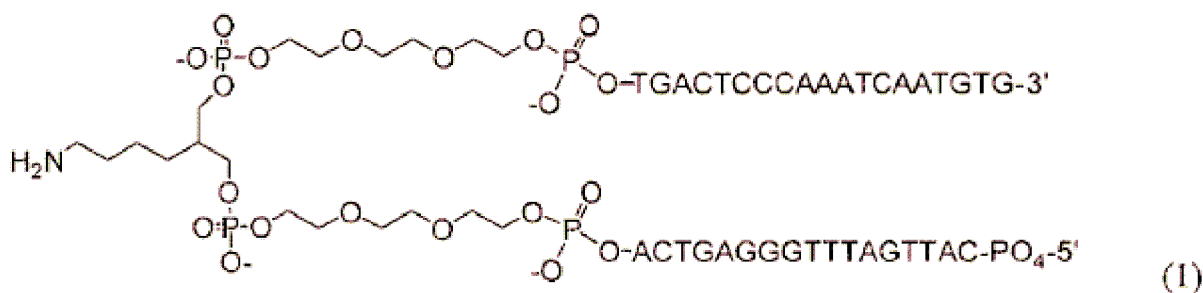
Esta invención se ilustra adicionalmente con los siguientes ejemplos

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis y caracterización de una biblioteca en el orden de 105 miembros

La síntesis de una biblioteca que comprende en el orden de 105 miembros distintos se obtuvo por medio de los siguientes reactivos:

Compuesto 1:



Códigos de letra único para desoxirribonucleótidos:

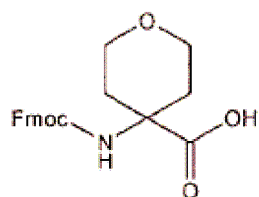
A = adenosina

C = citidina

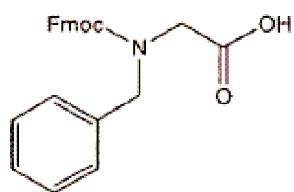
G = guanosina

T = timidina

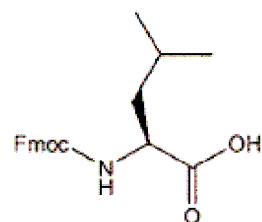
Precusores del bloque de construcción:



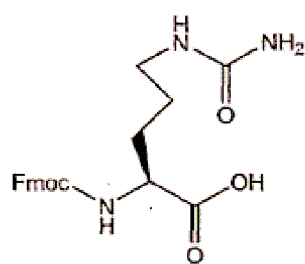
BB1



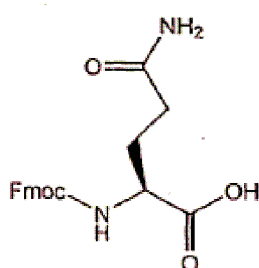
BB2



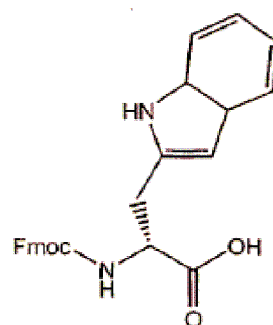
BB3



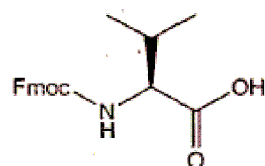
BB4



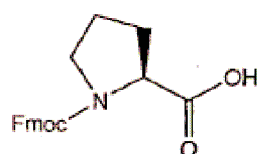
BB5



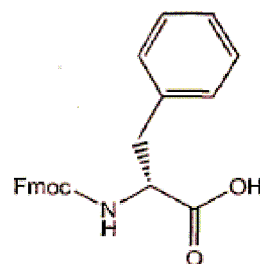
BB6



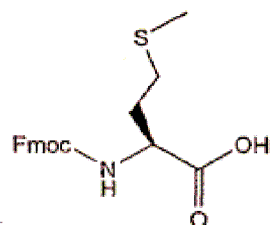
BB7



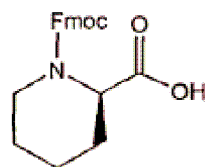
BB8



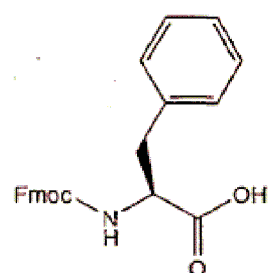
BB9



BB10



BB11



BB12

Marca de oligonucleótidos: Secuencia

Secuencia

Número de marca

5'-PO ₄ -GCAACGAAG (SEQ ID NO:1)	1.1
ACCGTTGCT-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:2)	
5'-PO ₃ -GCGTACAAG (SEQ ID NO:3)	1.2
ACCGCATGT-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:4)	
5'-PO ₃ -GCTCTGTAG (SEQ ID NO:5)	1.3
ACCGAGACA-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:6)	
5'-PO ₃ -GTGCCATAG (SEQ ID NO:7)	1.4
ACCACGGTA-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:8)	

5'-PO ₃ -GTTGACCAG (SEQ ID NO:9)	1.5
ACCAACTGG-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:10)	
5'-PO ₃ -CGACTTGAC (SEQ ID NO:11)	1.6
CAAGTCGCA-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:12)	
5'-PO ₃ -CGTAGTCAG (SEQ ID NO:13)	1.7
ACGCATCAG-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:14)	
5'-PO ₃ -CCAGCATAG (SEQ ID NO:15)	1.8
ACGGTCGTA-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:16)	
5'-PO ₃ -CCTACAGAG (SEQ ID NO:17)	1.9
ACGGATGTC-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:18)	
5'-PO ₃ -CTGAACGAG (SEQ ID NO:19)	1.10
CGTTCAGCA-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:20)	
5'-PO ₃ -CTCCAGTAG (SEQ ID NO:21)	1.11
ACGAGGTCA-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:22)	
5'-PO ₃ -TAGGTCCAG (SEQ ID NO:23)	1.12
ACATCCAGG-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:24)	
5'-PO ₃ -GCGTGTTGT (SEQ ID NO:25)	2.1
TCCGCACAA-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:26)	
5'-PO ₃ -GCTTGGAGT (SEQ ID NO:27)	2.2
TCCGAACCT-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:28)	
5'-PO ₃ -GTCAAGCGT (SEQ ID NO:29)	2.3
TCCAGTTCG-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:30)	
5'-PO ₃ -CAAGAGCGT (SEQ ID NO:31)	2.4
TCGTTCTCG-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:32)	
5'-PO ₃ -CAGTTCGGT (SEQ ID NO:33)	2.5
TCGTCAAGC-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:34)	
5'-PO ₃ -CGAAGGAGT (SEQ ID NO:35)	2.6
TCGCTTCCT-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:36)	
5'-PO ₃ -CGGTGTTGT (SEQ ID NO:37)	2.7
TCGCCACAA-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:38)	
5'-PO ₃ -CGTTGCTGT (SEQ ID NO:39)	2.8
TCGCAACGA-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:40)	

5'-PO ₃ -CCGATCTGT (SEQ ID NO:41)	2.9
TCGGCTAGA-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:42)	
5'-PO ₃ -CCTTCTCGT (SEQ ID NO:43)	2.10
TCGGAAGAG-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:44)	
5'-PO ₃ -TGAGTCCGT (SEQ ID NO:45)	2.11
TCACTCAGG-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:46)	
5'-PO ₃ -TGCTACGGT (SEQ ID NO:47)	2.12
TCAGATTGC-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:48)	
5'-PO ₃ -GTGCGTTGA (SEQ ID NO:49)	3.1
CACACGCAA-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:50)	
5'-PO ₃ -GTTGGCAGA (SEQ ID NO:51)	3.2
CACAACCGT-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:52)	
5'-PO ₃ -CCTGTAGGA (SEQ ID NO:53)	3.3
CAGGACATC-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:54)	
5'-PO ₃ -CTGCGTAGA (SEQ ID NO:55)	3.4
CAGACGCAT-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:56)	
5'-PO ₃ -CTTACGCGA (SEQ ID NO:57)	3.5
CAGAATGCG-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:58)	
5'-PO ₃ -TGGTCACGA (SEQ ID NO:59)	3.6
CAACCAGTG-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:60)	
5'-PO ₃ -TCAGAGCGA (SEQ ID NO:61)	3.7
CAAGTCTCG-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:62)	
5'-PO ₃ -TTGCTCGGA (SEQ ID NO:63)	3.8
CAAACGAGC-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:64)	
5'-PO ₃ -GCAGTTGGA (SEQ ID NO:65)	3.9
CACGTCAAC-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:66)	
5'-PO ₃ -GCCTGAAGA (SEQ ID NO:67)	3.10
CACGGACTT-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:68)	
5'-PO ₃ -GTAGCCAGA (SEQ ID NO:69)	3.11
CACATCGGT-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:70)	
5'-PO ₃ -GTCGCTTGA (SEQ ID NO:71)	3.12
CACAGCGAA-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:72)	
5'-PO ₃ -GCCTAAGTT (SEQ ID NO:73)	4.1
CTCGGATTC-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:74)	

5'-PO ₃ -GTAGTGCTT (SEQ ID NO:75)	4.2
CTCATCACG-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:76)	
5'-PO ₃ -GTCGAAGTT (SEQ ID NO:77)	4.3
CTCAGCTTC-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:78)	
5'-PO ₃ -GTTTCGGTT (SEQ ID NO:79)	4.4
CTCAAAGCC-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:80)	
5'-PO ₃ -CAGCGTTTT (SEQ ID NO:81)	4.5
CTGTGCAA-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:82)	
5'-PO ₃ -CATACGCTT (SEQ ID NO:83)	4.6
CTGTATGCG-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:84)	
5'-PO ₃ -CGATCTGTT (SEQ ID NO:85)	4.7
CTGCTAGAC-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:86)	
5'-PO ₃ -CGCTTTGTT (SEQ ID NO:87)	4.8
CTGCGAAAC-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:88)	
5'-PO ₃ -CCACAGTTT (SEQ ID NO:89)	4.9
CTGGTGTC-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:90)	
5'-PO ₃ -CCTGAAGTT (SEQ ID NO:91)	4.10
CTGGACTTC-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:92)	
5'-PO ₃ -CTGACGATT (SEQ ID NO:93)	4.11
CTGACTGCT-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:94)	
5'-PO ₃ -CTCCACTTT (SEQ ID NO:95)	4.12
CTGAGGTGA-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:96)	
5'-PO ₃ -ACCAGAGCC (SEQ ID NO:97)	5.1
AATGGTCTC-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:98)	
5'-PO ₃ -ATCCGCACC (SEQ ID NO:99)	5.2
AATAGGCGT-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:100)	
5'-PO ₃ -GACGACACC (SEQ ID NO:101)	5.3
AACTGCTGT-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:102)	
5'-PO ₃ -GGATGGACC (SEQ ID NO:103)	5.4
AACCTACCT-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:104)	
5'-PO ₃ -GCAGAAGCC (SEQ ID NO:105)	5.5
AACGTCTTC-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:106)	

5' -PO₃-GCCATGTCC (SEQ ID NO:107) 5.6
AACGGTACA-PO₃-5' (SEQ ID NO:108)

5' -PO₃-GTCTGCTCC (SEQ ID NO:109) 5.7
AACAGACGA-PO₃-5' (SEQ ID NO:110)

5' -PO₃-CGACAGACC (SEQ ID NO:111) 5.8
AAGCTGTCT-PO₃-5' (SEQ ID NO:112)

5' -PO₃-CGCTACTCC (SEQ ID NO:113) 5.9
AAGCGATGA-PO₃-5' (SEQ ID NO:114)

5' -PO₃-CCACAGACC (SEQ ID NO:115) 5.10
AAGGTGTCT-PO₃-5' (SEQ ID NO:116)

5' -PO₃-CCTCTCTCC (SEQ ID NO:117) 5.11
AAGGAGAGA-PO₃-5' (SEQ ID NO:118)

5' -PO₃-CTCGTAGCC (SEQ ID NO:119) 5.12
AAGAGCATC-PO₃-5' (SEQ ID NO:120)

Buffer de ligasa 1X: 50 mM de Tris, pH 7,5; 10 mM de ditiotretitol; 10 mM de MgCl₂; 2,5 mM de ATP; 50 mM de NaCl.

Buffer de ligasa 10X: 500 mM de Tris, pH 7,5; 100 mM de ditiotretitol; 100 mM de MgCl₂; 25 mM de ATP; 500 mM de NaCl

5 Ciclo 1

A cada uno de los doce tubos de PCR se añadieron 50 µL de una solución 1 mM del Compuesto 1 en agua; 75 µL de una solución 0,80 mM de una de las Marcas 1.1-1.12; 15 µL de buffer de ligasa 10X y 10 µL de agua desionizada. Los tubos se calentaron 95°C durante 1 minuto y posteriormente se enfriaron a 16°C durante 10 minutos. A cada tubo se añadieron 5.000 unidades de T4 ADN ligasa (2,5 µL de una solución de 2.000.000 unidades/mL (New England Biolabs, Cat. No. M0202)) en 50 µL de buffer de ligasa 1X y las soluciones resultantes se incubaron a 16°C durante 16 horas.

Después del ligamiento, las muestras se transfirieron a tubos Eppendorf de 1,5 ml y se trataron con 20 µL de NaCl M acuoso y 500 µL de etanol frío (-20°C) y se mantuvo a -20°C durante 1 hora. Después de la centrifugación, el sobrenadante se extrajo y el pellet se lavó con 70% de etanol acuoso a -20°C. Cada uno de los pellets se diluyó posteriormente en 150 µL de 150 mM buffer de borato de sodio, pH 9.4.

Las soluciones patrón que comprenden uno de cada uno de los precursores del bloque de construcción BB1 a BB12, N,N-diisopropiletanolamina y hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio, cada uno a una concentración de 0,25 M, se prepararon en DMF y se agitaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las soluciones del precursor del bloque de construcción se añadieron a cada una de las soluciones de pellet descritas anteriormente para proporcionar un exceso de 10 veces de precursor del bloque de construcción con respecto al ligador. Las soluciones resultantes se agitaron. Se añadieron 10 equivalentes adicionales del precursor del bloque de construcción se añadieron a la mezcla de reacción después de 20 minutos, y otros 10 equivalentes después de 40 minutos. La concentración final de DMF en la mezcla de reacción fue 22%. Las soluciones de reacción posteriormente se agitaron toda la noche a 4°C. El progreso de la reacción se controló por RP-HPLC por medio de acetato de tetraetilamonio acuoso 50 mM (pH=7.5) y acetonitrilo, y un gradiente de 2-46% de acetonitrilo durante 14 min. La reacción se detuvo cuando se acila ~95% del material inicial (ligador). Después de la acilación, las mezclas de reacción se mezclaron y liofilizaron a sequedad. El material liofilizado se purificó posteriormente por HPLC, y las fracciones correspondientes a la biblioteca (producto acilado) se mezclaron y liofilizaron.

La biblioteca se disolvió en 2,5 ml de buffer de fosfato de sodio 0,01 M (pH = 8,2) y se añadió 0,1 ml de piperidina (4% v/v) a este. La adición de piperidina produce turbidez que no se disuelve con el mezclado. Las mezclas de reacción se agitaron a temperatura ambiente durante 50 minutos, y posteriormente se centrifugó la solución turbia (14.000 rpm), el sobrenadante se extrajo por medio una pipeta de 200 µl y el pellet se resuspendió en 0,1 ml de agua. El lavado acuoso se combinó con el sobrenadante y se descartó el pellet. La biblioteca desprotegida se precipitó de la solución por la adición de exceso de etanol frío en hielo de modo de llevar la concentración final de etanol de la reacción a 70% v/v. La centrifugación de la mezcla acuosa de etanol dio un pellet blanco que comprende la biblioteca. El pellet se lavó una vez con etanol acuoso frío 70%. Después de la extracción del

disolvente, el pellet se secó al aire (~5 min) para eliminar las trazas de etanol y posteriormente se usó en el ciclo 2. Las marcas y los correspondientes precursores del bloque de construcción usados en la Ronda 1 se exponen en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1

Precursor del bloque de construcción	Marca
BB1	1.11
BB2	1.6
BB3	1.2
BB4	1.8
BB5	1.1
BB6	1.10
BB7	1.12
BB8	1.5
BB9	1.4
BB10	1.3
BB11	1.7
BB12	1.9

5

Ciclos 2-5

Para cada uno de estos ciclos, la solución combinada resultante del ciclo previo se dividió en 12 alícuotas iguales de 50 µl cada una y se colocaron en tubos de PCR. A cada tubo se añadió una solución que comprende una marca diferente, y se llevaron a cabo el ligamiento, purificación y acilación que se describieron para el Ciclo 1, excepto para los Ciclos 3-5, se omitió la etapa de purificación por HPLC descrita para el Ciclo 1. La correspondencia entre las marcas y los precursores del bloque de construcción para los Ciclos 2-5 se presenta en la Tabla 2.

10

Los productos del Ciclo 5 se ligaron con el cebador de cierre que se muestra a continuación, por medio del procedimiento descrito antes para el ligamiento de las marcas.

5'-PO3-GGCACATTGATTTGGGAGTCA

15 GTGTA ACTAAACCCTCAGT-PO3-5'

Tabla 2

Precursores del bloque de construcción	Ciclo 2 Marca	Ciclo 3 Marca	Ciclo 4 Marca	Ciclo 5 Marca
BB1	2.7	3.7	4.7	5.7
BB2	2.8	3.8	4.8	5.8
BB3	2.2	3.2	4.2	5.2
BB4	2.10	3.10	4.10	5.10
BB5	2.1	3.1	4.1	5.1
BB6	2.12	3.12	4.12	5.12
BB7	2.5	3.5	4.5	5.5

BB8	2.6	3.6	4.6	5.6
BB9	2.4	3.4	4.4	5.4
BB10	2.3	3.3	4.3	5.3
BB11	2.9	3.9	4.9	5.9
BB12	2.11	3.11	4.11	5.11

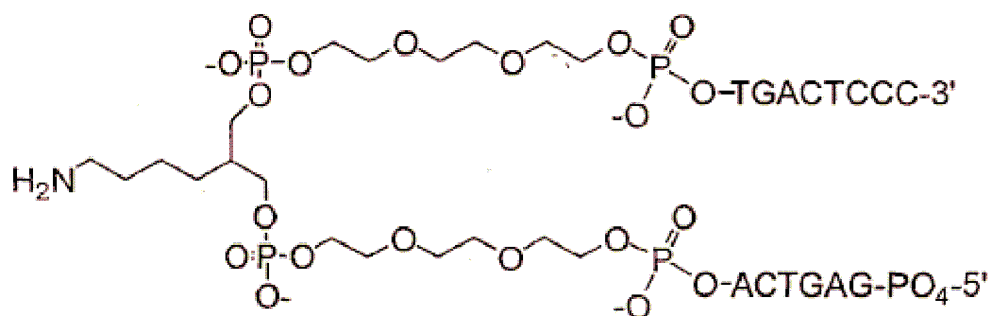
Resultados

5 El procedimiento de síntesis descrito antes tiene la capacidad de producir una biblioteca que comprende 125 (aproximadamente 249.000) estructuras diferentes. La síntesis de la biblioteca se controló por electroforesis en gel del producto de cada ciclo. Los resultados de cada uno de los cinco ciclos y la biblioteca final después del ligamiento del cebador de cierre se ilustran en la Figura 7. El compuesto marcado "pieza principal" es el Compuesto 1. La figura muestra que cada ciclo produce el aumento de peso molecular esperado y que los productos de cada ciclo son sustancialmente homogéneos con respecto al peso molecular.

Ejemplo 2: Síntesis y caracterización de una biblioteca en el orden de 108 miembros

10 La síntesis de una biblioteca que comprende en el orden de 108 miembros distintos se llevó a cabo por medio de los siguientes reactivos:

Compuesto 2:



Códigos de letra único para desoxirribonucleótidos:

15 A = adenosina

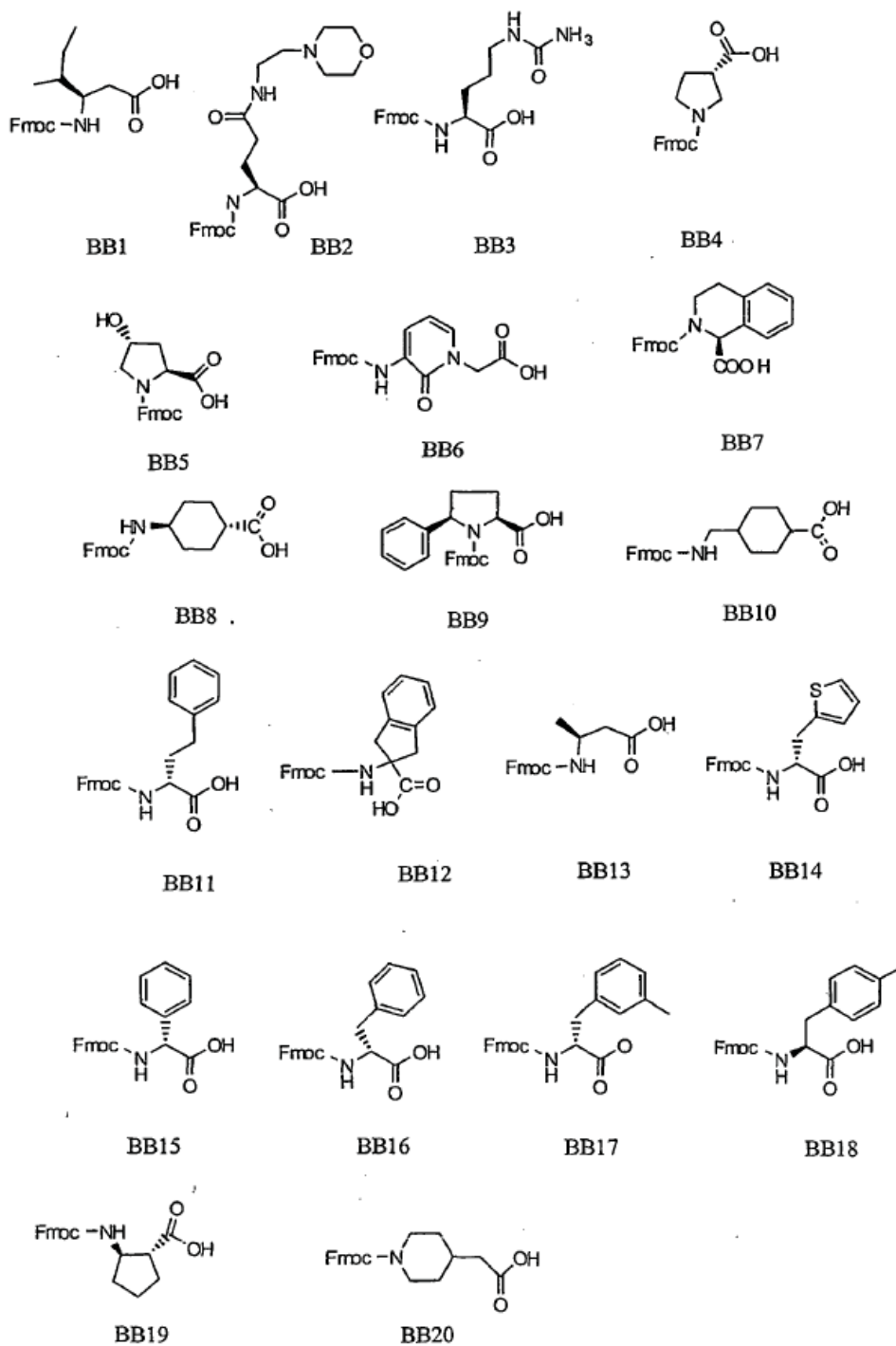
C = citidina

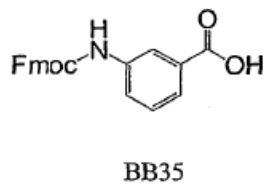
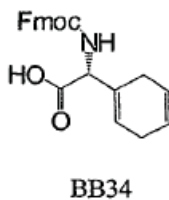
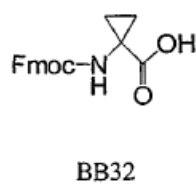
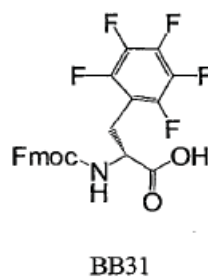
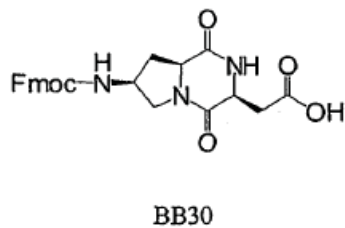
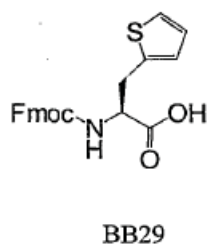
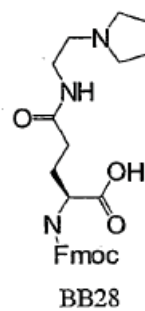
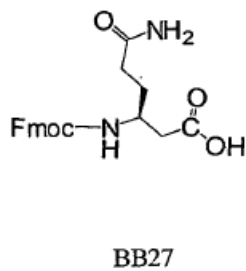
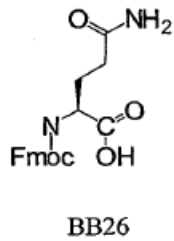
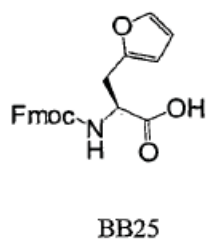
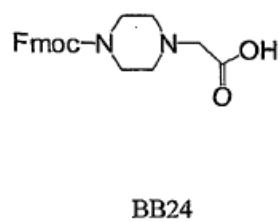
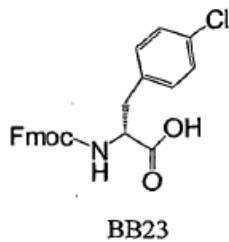
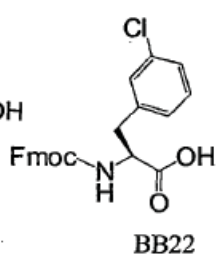
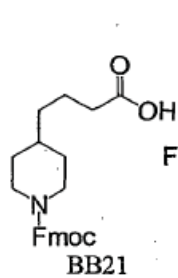
G = guanosina

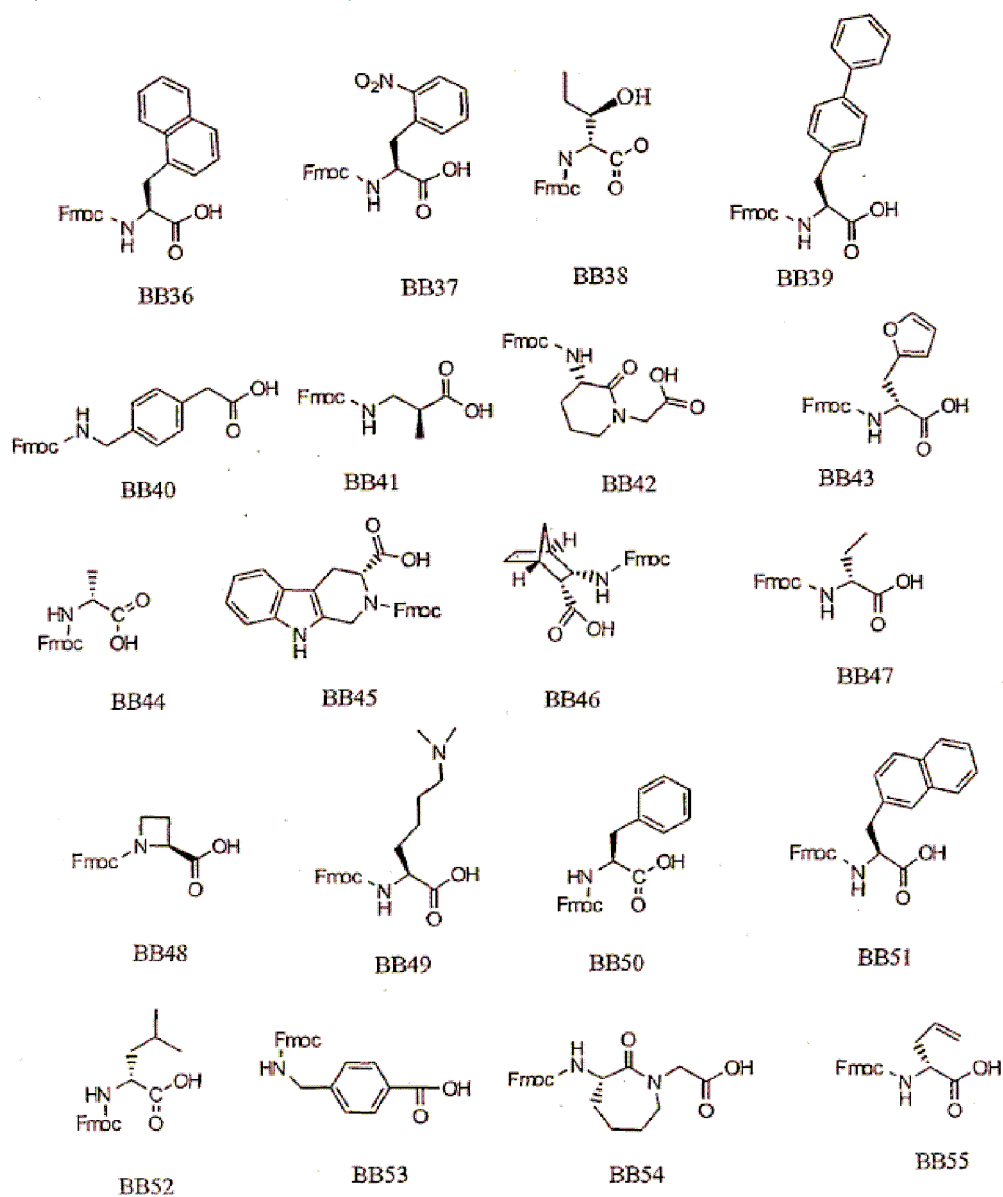
T = timidina

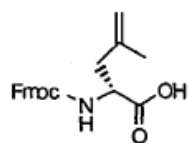
20

Precursores del bloque de construcción:

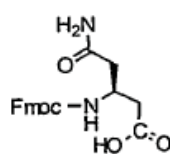




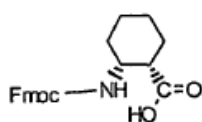




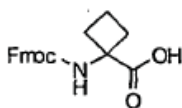
BB57



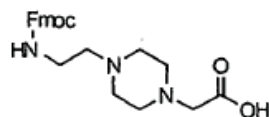
BB58



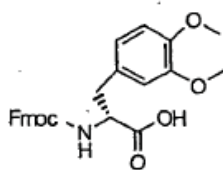
BB59



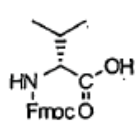
BB60



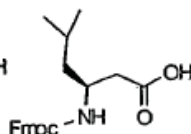
BB61



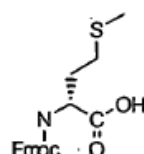
BB62



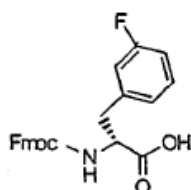
BB63



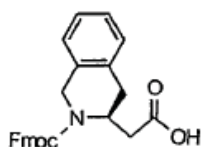
BB64



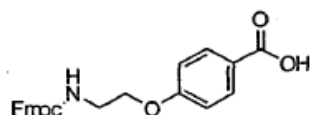
BB65



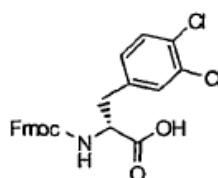
BB66



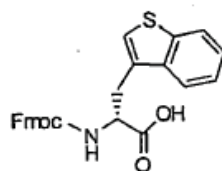
BB67



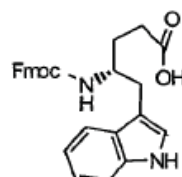
BB68



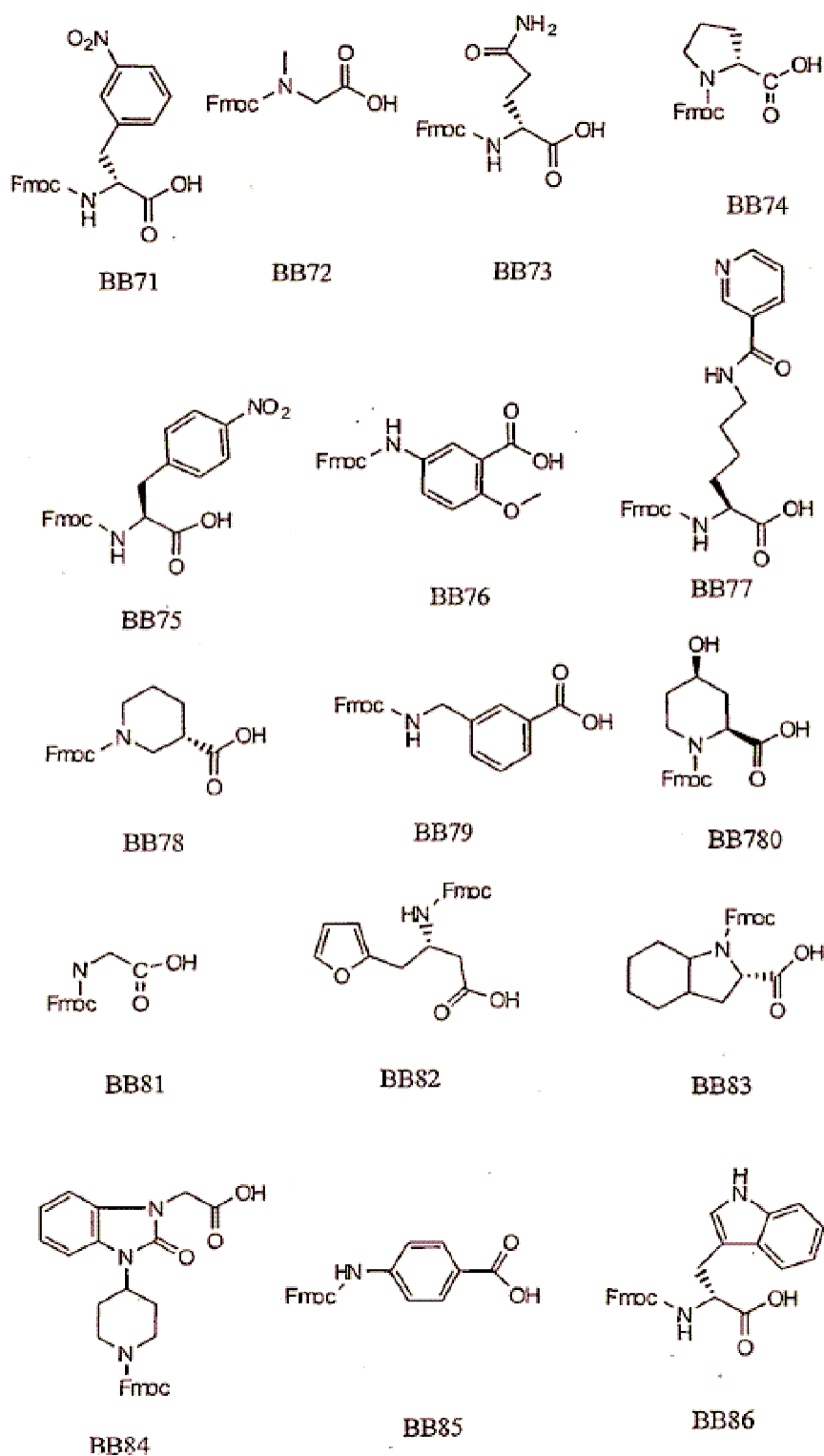
BB69



BB70



BB71



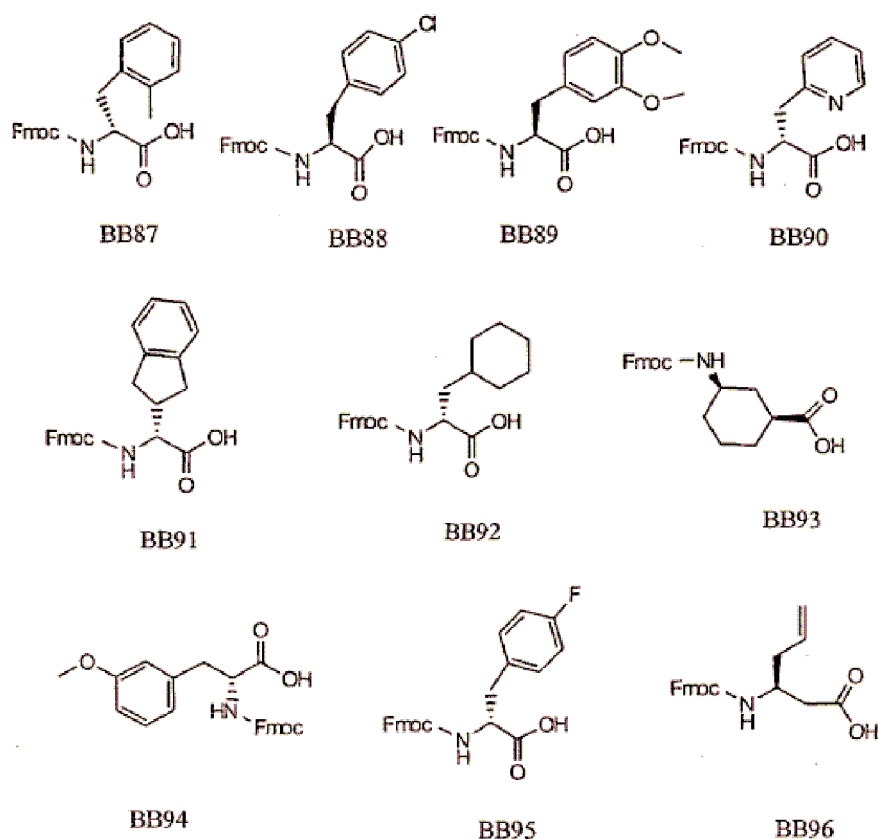


Tabla 3: Marcas de oligonucleótidos usadas en el ciclo 1:

Número de marca	Secuencia de la cadena superior	Secuencia de la cadena inferior
1.1	5'-PO3- AAATCGATGTGGTCACTCAG (SEQ ID NO:121)	5'-PO3- GAGTGACCACATCGATTGG (SEQ ID NO:122)
1.2	5'-PO3- AAATCGATGTGGACTAGGAG (SEQ ID NO:123)	5'-PO3- CCTAGTCCACATCGATTGG (SEQ ID NO:124)
1.3	5'-PO3- AAATCGATGTGCCGTATGAG (SEQ ID NO:125)	5'-PO3- CATACGGCACATCGATTGG (SEQ ID NO:126)
1.4	5'-PO3- AAATCGATGTGCTGAAGGAG (SEQ ID NO:127)	5'-PO3- CCTTCAGCACATCGATTGG (SEQ ID NO:128)
1.5	5'-PO3- AAATCGATGTGGACTAGCAG (SEQ ID NO:129)	5'-PO3- GCTAGTCCACATCGATTGG (SEQ ID NO:130)
1.6	5'-PO3- AAATCGATGTGCGCTAAGAG (SEQ ID NO:131)	5'-PO3- CTTAGCGCACATCGATTGG (SEQ ID NO:132)
1.7	5'-PO3- AAATCGATGTGAGCCGAGAG (SEQ ID NO:133)	5'-PO3- CTCGGCTCACATCGATTGG (SEQ ID NO:134)

1.8	5'-PO3- AAATCGATGTGCCGTATCAG (SEQ ID NO:135)	5'-PO3- GATACGGCACATCGATTGG (SEQ ID NO:136)
1.9	5'-PO3- AAATCGATGTGCTGAAGCAG (SEQ ID NO:137)	5'-PO3- GCTTCAGCACATCGATTGG (SEQ ID NO:138)
1.10	5'-PO3- AAATCGATGTGTGCGAGTAG (SEQ ID NO:139)	5'-PO3- ACTCGCACACATCGATTGG (SEQ ID NO:140)
1.11	5'-PO3- AAATCGATGTGTTTGCGCAG (SEQ ID NO:141)	5'-PO3- CGCCAAACACATCGATTGG (SEQ ID NO:142)
1.12	5'-PO3- AAATCGATGTGCGCTAACAG (SEQ ID NO:143)	5'-PO3- GTTAGCGCACATCGATTGG (SEQ ID NO:144)
1.13	5'-PO3- AAATCGATGTGAGCCGACAG (SEQ ID NO:145)	5'-PO3- GTCGGCTCACATCGATTGG (SEQ ID NO:146)
1.14	5'-PO3- AAATCGATGTGAGCCGAAAG (SEQ ID NO:147)	5'-PO3- TTCGGCTCACATCGATTGG (SEQ ID NO:148)
1.15	5'-PO3- AAATCGATGTGTCGGTAGAG (SEQ ID NO:149)	5'-PO3- CTACCGACACATCGATTGG (SEQ ID NO:150)
1.16	5'-PO3- AAATCGATGTGGTTGCCGAG (SEQ ID NO:151)	5'-PO3- CGGCAACCACATCGATTGG (SEQ ID NO:152)
1.17	5'-PO3- AAATCGATGTGAGTGCGTAG (SEQ ID NO:153)	5'-PO3- ACGCACTCACATCGATTGG (SEQ ID NO:154)
1.18	5'-PO3- AAATCGATGTGGTTGCCAAG (SEQ ID NO:155)	5'-PO3- TGGCAACCACATCGATTGG (SEQ ID NO:156)
1.19	5'-PO3- AAATCGATGTGTGCGAGGAG (SEQ ID NO:157)	5'-PO3- CCTCGCACACATCGATTGG (SEQ ID NO:158)
1.20	5'-PO3- AAATCGATGTGGAACACGAG (SEQ ID NO:159)	5'-PO3- CGTGTTCACATCGATTGG (SEQ ID NO:160)
1.21	5'-PO3- AAATCGATGTGCTTGTCGAG (SEQ ID NO:161)	5'-PO3- CGACAAGCACATCGATTGG (SEQ ID NO:162)
1.22	5'-PO3- AAATCGATGTGTTCCGGTAG (SEQ ID NO:163)	5'-PO3- A0CCGGAACACATCGATTGG (SEQ ID NO:164)
1.23	5'-PO3- AAATCGATGTGTGCGAGCAG (SEQ ID NO:165)	5'-PO3- GCTCGCACACATCGATTGG (SEQ ID NO:166)
1.24	5'-PO3- AAATCGATGTGGTCAGGTAG (SEQ ID NO:167)	5'-PO3- ACCTGACCACATCGATTGG (SEQ ID NO:168)
1.25	5'-PO3- AAATCGATGTGGCCTGTTAG	5'-PO3- AACAGGCCACATCGATTGG

	(SEQ ID NO:169)	(SEQ ID NO:170)
1.26	5'-PO3- AAATCGATGTGGAACACCAG (SEQ ID NO:171)	5'-PO3- GGTGTTCACATCGATTGG (SEQ ID NO:172)
1.27	5'-PO3-AAATCGATGTGCTTGTCCAG (SEQ ID NO:173)	5'-PO3- GGACAAGCACATCGATTGG (SEQ ID NO:174)
1.28	5'-PO3- AAATCGATGTGTGCGAGAAG (SEQ ID NO:175)	5'-PO3- TCTCGCACACATCGATTGG (SEQ ID NO:176)
1.29	5'-PO3- AAATCGATGTGAGTGCGGAG (SEQ ID NO:177)	5'-PO3- CCGCACTCACATCGATTGG (SEQ ID NO:178)
1.30	5'-PO3- AAATCGATGTGTTGTCCGAG (SEQ ID NO:179)	5'-PO3- CGGACAACACATCGATTGG (SEQ ID NO:180)
1.31	5'-PO3- AAATCGATGTGTGGAACGAG (SEQ ID NO:181)	5'-PO3- CGTTCACACATCGATTGG (SEQ ID NO:182)
1.32	5'-PO3- AAATCGATGTGAGTGCGAAG (SEQ ID NO:183)	5'-PO3- TCGCACTCACATCGATTGG (SEQ ID NO:184)
1.33	5'-PO3- AAATCGATGTGTGGAACCAG (SEQ ID NO:185)	5'-PO3- GGTTCACACATCGATTGG (SEQ ID NO:186)
1.34	5'-PO3- AAATCGATGTGTTAGGCGAG (SEQ ID NO:187)	5'-PO3- CGCCTAACACATCGATTGG (SEQ ID NO:188)
1.35	5'-PO3- AAATCGATGTGGCCTGTGAG (SEQ ID NO:189)	5'-PO3- CACAGGCCACATCGATTGG (SEQ ID NO:190)
1.36	5'-PO3-AAATCGATGTGCTCCTGTAG (SEQ ID NO:191)	5'-PO3- ACAGGAGCACATCGATTGG (SEQ ID NO:192)
1.37	5'-PO3- AAATCGATGTGGTCAGGCAG (SEQ ID NO:193)	5'-PO3- GCCTGACCACATCGATTGG (SEQ ID NO:194)
1.38	5'-PO3- AAATCGATGTGGTCAGGAAG (SEQ ID NO:195)	5'-PO3- TCCTGACCACATCGATTGG (SEQ ID NO:196)
1.39	5'-PO3- AAATCGATGTGGTAGCCGAG (SEQ ID NO:197)	5'-PO3- CGGCTACCACATCGATTGG (SEQ ID NO:198)
1.40	5'-PO3- AAATCGATGTGGCCTGTAAG (SEQ ID NO:199)	5'-PO3- TACAGGCCACATCGATTGG (SEQ ID NO:200)
1.41	5'-PO3- AAATCGATGTGCTTTCCGAG (SEQ ID NO:201)	5'-PO3- CCGAAAGCACATCGATTGG (SEQ ID NO:202)
1.42	5'-PO3- AAATCGATGTGCGTAAGGAG (SEQ ID NO:203)	5'-PO3- CCTTACGCACATCGATTGG (SEQ ID NO:204)

1.43	5'-PO3- AAATCGATGTGAGAGCGTAG (SEQ ID NO:205)	5'-PO3- ACGCTCTCACATCGATTGG (SEQ ID NO:206)
1.44	5'-PO3- AAATCGATGTGGACGGCAAG (SEQ ID NO:207)	5'-PO3- TGCCGTCCACATCGATTGG (SEQ ID NO:208)
1.45	5'-PO3-AAATCGATGTGCTTTCGCAG (SEQ ID NO:209)	5'-PO3- GCGAAAGCACATCGATTGG (SEQ ID NO:210)
1.46	5'-PO3- AAATCGATGTGCGTAAGCAG (SEQ ID NO:211)	5'-PO3- GCTTACGCACATCGATTGG (SEQ ID NO:212)
1.47	5'-PO3- AAATCGATGTGGCTATGGAG (SEQ ID NO:213)	5'-PO3- CCATAGCCACATCGATTGG (SEQ ID NO:214)
1.48	5'-PO3- AAATCGATGTGACTCTGGAG (SEQ ID NO:215)	5'-PO3- CCAGAGTCACATCGATTGG (SEQ ID NO:216)
1.49	5'-PO3-AAATCGATGTGCTGGAAAG (SEQ ID NO:217)	5'-PO3- TTCCAGCACATCGATTGG (SEQ ID NO:218)
1.50	5'-PO3- AAATCGATGTGCCGAAGTAG (SEQ ID NO:219)	5'-PO3- ACTTCGGCACATCGATTGG (SEQ ID NO:220)
1.51	5'-PO3- AAATCGATGTGCTCCTGAAG (SEQ ID NO:221)	5'-PO3- TCAGGAGCACATCGATTGG (SEQ ID NO:222)
1.52	5'-PO3- AAATCGATGTGTCCAGTCAG (SEQ ID NO:223)	5'-PO3- GACTGGACACATCGATTGG (SEQ ID NO:224)
1.53	5'-PO3- AAATCGATGTGAGAGCGGAG (SEQ ID NO:225)	5'-PO3- CCGCTCTCACATCGATTGG (SEQ ID NO:226)
1.54	5'-PO3- AAATCGATGTGAGAGCGAAG (SEQ ID NO:227)	5'-PO3- TCGCTCTCACATCGATTGG (SEQ ID NO:228)
1.55	5'-PO3- AAATCGATGTGCCGAAGGAG (SEQ ID NO:229)	5'-PO3- CCTTCGGCACATCGATTGG (SEQ ID NO:230)
1.56	5'-PO3- AAATCGATGTGCCGAAGCAG (SEQ ID NO:231)	5'-PO3- GCTTCGGCACATCGATTGG (SEQ ID NO:232)
1.57	5'-PO3- AAATCGATGTGTGTTCCGAG (SEQ ID NO:233)	5'-PO3- CGGAACACACATCGATTGG (SEQ ID NO:234)
1.58	5'-PO3- AAATCGATGTGTCTGGCGAG (SEQ ID NO:235)	5'-PO3- CGCCAGACACATCGATTGG (SEQ ID NO:236)
1.59	5'-PO3- AAATCGATGTGCTATCGGAG (SEQ ID NO:237)	5'-PO3- CCGATAGCACATCGATTGG (SEQ ID NO:238)
1.60	5'-PO3- AAATCGATGTGCGAAAGGAG	5'-PO3- CCTTTCGCACATCGATTGG

	(SEQ ID NO:239)	(SEQ ID NO:240)
1.61	5'-PO3- AAATCGATGTGCCGAAGAAG (SEQ ID NO:241)	5'-PO3- TCTTCGGCACATCGATTGG (SEQ ID NO:242)
1.62	5'-PO3- AAATCGATGTGGTTGCAGAG (SEQ ID NO:243)	5'-PO3- CTGCAACCACATCGATTGG (SEQ ID NO:244)
1.63	5'-PO3- AAATCGATGTGGATGGTGAG (SEQ ID NO:245)	5'-PO3- CACCATCCACATCGATTGG (SEQ ID NO:246)
1.64	5'-PO3- AAATCGATGTGCTATCGCAG (SEQ ID NO:247)	5'-PO3- GCGATAGCACATCGATTGG (SEQ ID NO:248)
1.65	5'-PO3- AAATCGATGTGCGAAAGCAG (SEQ ID NO:249)	5'-PO3- GCTTTCGCACATCGATTGG (SEQ ID NO:250)
1.66	5'-PO3- AAATCGATGTGACACTGGAG (SEQ ID NO:251)	5'-PO3- CCAGTGTACATCGATTGG (SEQ ID NO:252)
1.67	5'-PO3- AAATCGATGTGTCTGGCAAG (SEQ ID NO:253)	5'-PO3- TGCCAGACACATCGATTGG (SEQ ID NO:254)
1.68	5'-PO3- AAATCGATGTGGATGGTCAG (SEQ ID NO:255)	5'-PO3- GACCATCCACATCGATTGG (SEQ ID NO:256)
1.69	5'-PO3- AAATCGATGTGGTTGCACAG (SEQ ID NO:257)	5'-PO3- GTGCAACCACATCGATTGG (SEQ ID NO:258)
1.70	5'-PO3- AAATCGATGTGGGCATCGAG (SEQ ID NO:259)	5'-PO3-CGATGCCCCATCCGA TTT GG (SEQ ID NO:260)
1.71	5'-PO3- AAATCGATGTGTGCCTCCAG (SEQ ID NO:261)	5'-PO3- GGAGGCACACATCGATTGG (SEQ ID NO:262)
1.72	5'-PO3- AAATCGATGTGTGCCTCAAG (SEQ ID NO:263)	5'-PO3- TGAGGCACACATCGATTGG (SEQ ID NO:264)
1.73	5'-PO3- AAATCGATGTGGGCATCCAG (SEQ ID NO:265)	5'-PO3- GGATGCCACATCGATTGG (SEQ ID NO:266)
1.74	5'-PO3- AAATCGATGTGGGCATCAAG (SEQ ID NO:267)	5'-PO3-TGATGCCCA CAT CGA TTT GG (SEQ ID NO:268)
1.75	5'-PO3- AAATCGATGTGCCTGTCGAG (SEQ ID NO:269)	5'-PO3-CGA CAG GCA CAT CGA TTT GG (SEQ ID NO:270)
1.76	5'-PO3- AAATCGATGTGGACGGATAG (SEQ ID NO:271)	5'-PO3-ATC CGT CCA CAT CGA TTT GG (SEQ ID NO:272)
1.77	5'-PO3- AAATCGATGTGCCTGTCCAG (SEQ ID NO:273)	5'-PO3-GGA CAG GCA CAT CGA TTT GG (SEQ ID NO:274)

1.78	5'-PO3- AAATCGATGTGAAGCACGAG (SEQ ID NO:275)	5'-PO3-CGT GCT TCA CAT CGA TTT GG (SEQ ID NO:276)
1.79	5'-PO3- AAATCGATGTGCCTGTCAAAG (SEQ ID NO:277)	5'-PO3-TGA CAG GCA CAT CGA TTT GG (SEQ ID NO:278)
1.80	5'-PO3- AAATCGATGTGAAGCACCAG (SEQ ID NO:279)	5'-PO3-GGT GCT TCA CAT CGA TTT GG (SEQ ID NO:280)
1.81	5'-PO3-AAATCGATGTGCCTTCGTAG (SEQ ID NO:281)	5'-PO3-ACG AAG GCA CAT CGA TTT GG (SEQ ID NO:282)
1.82	5'-PO3- AAATCGATGTGTCGTCGGAG (SEQ ID NO:283)	5'-PO3-CGG ACG ACA CAT CGA TTT GG (SEQ ID NO:284)
1.83	5'-PO3- AAATCGATGTGGAGTCTGAG (SEQ ID NO:285)	5'-PO3-CAG ACT CCA CAT CGA TTT GG (SEQ ID NO:286)
1.84	5'-PO3- AAATCGATGTGTGATCCGAG (SEQ ID NO:287)	5'-PO3-CGG ATC ACA CAT CGA TTT GG (SEQ ID NO:288)
1.85	5'-PO3- AAATCGATGTGTCAGGCGAG (SEQ ID NO:289)	5'-PO3-CGC CTG ACA CAT CGA TTT GG (SEQ ID NO:290)
1.86	5'-PO3- AAATCGATGTGTCGTCCAAG (SEQ ID NO:291)	5'-PO3-TGG ACG ACA CAT CGA TTT GG (SEQ ID NO:292)
1.87	5'-PO3- AAATCGATGTGGACGGAGAG (SEQ ID NO:293)	5'-PO3-CTC CGT CCA CAT CGA TTT GG (SEQ ID NO:294)
1.88	5'-PO3- AAATCGATGTGGTAGCAGAG (SEQ ID NO:295)	5'-PO3-CTG CTA CCA CAT CGA TTT GG (SEQ ID NO:296)
1.89	5'-PO3- AAATCGATGTGGCTGTGTAG (SEQ ID NO:297)	5'-PO3- ACACAGCCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:298)
1.90	5'-PO3- AAATCGATGTGGACGGACAG (SEQ ID NO:299)	5'-PO3-GTC CGT CCA CAT CGA TTT GG (SEQ ID NO:300)
1.91	5'-PO3- AAATCGATGTGTCAGGCAAG (SEQ ID NO:301)	5'-PO3-TGC CTG ACA CAT CGA TTT GG (SEQ ID NO:302)
1.92	5'-PO3- AAATCGATGTGGCTCGAAAG (SEQ ID NO:303)	5'-PO3- TTCGAGCCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:304)
1.93	5'-PO3- AAATCGATGTGCCTTCGGAG (SEQ ID NO:305)	5'-PO3-CCG AAG GCA CAT CGA TTT GG (SEQ ID NO:306)
1.94	5'-PO3- AAATCGATGTGGTAGCACAG (SEQ ID NO:307)	5'-PO3-GTG CTA CCA CAT CGA TTT GG (SEQ ID NO:308)
1.95	5'-PO3- AAATCGATGTGGAAGGTCAG	5'-PO3-GAC CTT CCA CAT CGA TTT GG

	(SEQ ID NO:309)	(SEQ ID NO:310)
	5'-PO3- AAATCGATGTGGTGCTGTAG	5'-PO3-ACA GCA CCA CAT CGA TTT GG
1.96	(SEQ ID NO:311)	(SEQ ID NO:312)

Tabla 4: Marcas de oligonucleótidos usadas en el ciclo 1:

Número de marca	Secuencia de la cadena superior	Secuencia de la cadena inferior
2.1	5'-PO3-GTT GCC TGT (SEQ ID NO:313)	5'-PO3-AGG CAA CCT (SEQ ID NO:314)
2.2	5'-PO3-CAG GAC GGT (SEQ ID NO:315)	5'-PO3-CGT CCT GCT (SEQ ID NO:316)
2.3	5'-PO3-AGA CGT GGT (SEQ ID NO:317)	5'-PO3-CAC GTC TCT (SEQ ID NO:318)
2.4	5'-PO3-CAG GAC CGT (SEQ ID NO:319)	5'-PO3-GGT CCT GCT (SEQ ID NO:320)
2.5	5'-PO3-CAG GAC AGT (SEQ ID NO:321)	5'-PO3-TGT CCT GCT (SEQ ID NO:322)
2.6	5'-PO3-CAC TCT GGT (SEQ ID NO:323)	5'-PO3-CAG AGT GCT (SEQ ID NO:324)
2.7	5'-PO3-GAC GGC TGT (SEQ ID NO:325)	5'-PO3-AGC CGT CCT (SEQ ID NO:326)
2.8	5'-PO3-CAC TCT CGT (SEQ ID NO:327)	5'-PO3-GAG AGT GCT (SEQ ID NO:328)
2.9	5'-PO3-GTA GCC TGT (SEQ ID NO:329)	5'-PO3-AGG CTA CCT (SEQ ID NO:330)
2.10	5'-PO3-GCC ACT TGT (SEQ ID NO:331)	5'-PO3-AAG TGG CCT (SEQ ID NO:332)
2.11	5'-PO3-CAT CGC TGT (SEQ ID NO:333)	5'-PO3-AGC GAT GCT (SEQ ID NO:334)
2.12	5'-PO3-CAC TGG TGT (SEQ ID NO:335)	5'-PO3-ACC AGT GCT (SEQ ID NO:336)
2.13	5'-PO3-GCC ACT GGT (SEQ ID NO:337)	5'-PO3-CAG TGG CCT (SEQ ID NO:338)
2.14	5'-PO3-TCT GGC TGT (SEQ ID NO:339)	5'-PO3-AGC CAG ACT (SEQ ID NO:340)
2.15	5'-PO3-GCC ACT CGT (SEQ ID NO:341)	5'-PO3-GAG TGG CCT (SEQ ID NO:342)
2.16	5'-PO3-TGC CTC TGT (SEQ ID NO:343)	5'-PO3-AGA GGC ACT (SEQ ID NO:344)
2.17	5'-PO3-CAT CGC AGT (SEQ ID NO:345)	5'-PO3-TGC GAT GCT (SEQ ID NO:346)
2.18	5'-PO3-CAG GAA GGT (SEQ ID NO:347)	5'-PO3-CTT CCT GCT (SEQ ID NO:348)
2.19	5'-PO3-GGC ATC TGT (SEQ ID NO:349)	5'-PO3-AGA TGC CCT (SEQ ID NO:350)
2.20	5'-PO3-CGG TGC TGT (SEQ ID NO:351)	5'-PO3-AGC ACC GCT (SEQ ID NO:352)
2.21	5'-PO3-CAC TGG CGT	5'-PO3-GCC AGT GCT

	(SEQ ID NO:353)	(SEQ ID NO:354)
2.22	5'-PO3-TCTCCTCGT (SEQ ID NO:355)	5'-PO3-GAGGAGACT (SEQ ID NO:356)
2.23	5'-PO3-CCT GTC TGT (SEQ ID NO:357)	5'-PO3-AGA CAG GCT (SEQ ID NO:358)
2.24	5'-PO3-CAA CGC TGT (SEQ ID NO:359)	5'-PO3-AGC GTT GCT (SEQ ID NO:360)
2.25	5'-PO3-TGC CTC GGT (SEQ ID NO:361)	5'-PO3-CGA GGC ACT (SEQ ID NO:362)
2.26	5'-PO3-ACA CTG CGT (SEQ ID NO:363)	5'-PO3-GCA GTG TCT (SEQ ID NO:364)
2.27	5'-PO3-TCG TCC TGT (SEQ ID NO:365)	5'-PO3-AGG ACG ACT (SEQ ID NO:366)
2.28	5'-PO3-GCT GCC AGT (SEQ ID NO:367)	5'-PO3-TGG CAG CCT (SEQ ID NO:368)
2.29	5'-PO3-TCA GGC TGT (SEQ ID NO:369)	5'-PO3-AGC CTG ACT (SEQ ID NO:370)
2.30	5'-PO3-GCC AGG TGT (SEQ ID NO:371)	5'-PO3-ACC TGG CCT (SEQ ID NO:372)
2.31	5'-PO3-CGG ACC TGT (SEQ ID NO:373)	5'-PO3-AGG TCC GCT (SEQ ID NO:374)
2.32	5'-PO3-CAA CGC AGT (SEQ ID NO:375)	5'-PO3-TGC GTT GCT (SEQ ID NO:376)
2.33	5'-PO3-CAC ACG AGT (SEQ ID NO:377)	5'-PO3-TCG TGT GCT (SEQ ID NO:378)
2.34	5'-PO3-ATG GCC TGT (SEQ ID NO:379)	5'-PO3-AGG CCA TCT (SEQ ID NO:380)
2.35	5'-PO3-CCA GTC TGT (SEQ ID NO:381)	5'-PO3-AGA CTG GCT (SEQ ID NO:382)
2.36	5'-PO3-GCC AGG AGT (SEQ ID NO:383)	5'-PO3-TCC TGG CCT (SEQ ID NO:384)
2.37	5'-PO3-CGG ACC AGT (SEQ ID NO:385)	5'-PO3-TGG TCC GCT (SEQ ID NO:386)
2.38	5'-PO3-CCT TCG CGT (SEQ ID NO:387)	5'-PO3-GCG AAG GCT (SEQ ID NO:388)
2.39	5'-PO3-GCA GCC AGT (SEQ ID NO:389)	5'-PO3-TGG CTG CCT (SEQ ID NO:390)
2.40	5'-PO3-CCA GTC GGT (SEQ ID NO:391)	5'-PO3-CGA CTG GCT (SEQ ID NO:392)
2.41	5'-PO3-ACT GAG CGT (SEQ ID NO:393)	5'-PO3-GCT CAG TCT (SEQ ID NO:394)
2.42	5'-PO3-CCA GTC CGT (SEQ ID NO:395)	5'-PO3-GGA CTG GCT (SEQ ID NO:396)
2.43	5'-PO3-CCA GTC AGT (SEQ ID NO:397)	5'-PO3-TGA CTG GCT (SEQ ID NO:398)
2.44	5'-PO3-CAT CGA GGT (SEQ ID NO:399)	5'-PO3-CTC GAT GCT (SEQ ID NO:400)
2.45	5'-PO3-CCA TCG TGT (SEQ ID NO:401)	5'-PO3-ACG ATG GCT (SEQ ID NO:402)
2.46	5'-PO3-GTG CTG CGT (SEQ ID NO:403)	5'-PO3-GCA GCA CCT (SEQ ID NO:404)

2.47	5'-PO3-GAC TAC GGT (SEQ ID NO:405)	5'-PO3-CGT AGT CCT (SEQ ID NO:406)
2.48	5'-PO3-GTG CTG AGT (SEQ ID NO:407)	5'-PO3-TCA GCA CCT (SEQ ID NO:408)
2.49	5'-PO3-GCTGCATGT (SEQ ID NO:409)	5'-PO3-ATGCAGCCT (SEQ ID NO:410)
2.50	5'-PO3-GAGTGGTGT (SEQ ID NO:411)	5'-PO3-ACCACTCCT (SEQ ID NO:412)
2.51	5'-PO3-GACTACCGT (SEQ ID NO:413)	5'-PO3-GGTAGTCCT (SEQ ID NO:414)
2.52	5'-PO3-CGGTGATGT (SEQ ID NO:415)	5'-PO3-ATCACCGCT (SEQ ID NO:416)
2.53	5'-PO3-TGCGACTGT (SEQ ID NO:417)	5'-PO3-AGTCGCACT (SEQ ID NO:418)
2.54	5'-PO3-TCTGGAGGT (SEQ ID NO:419)	5'-PO3-CTCCAGACT (SEQ ID NO:420)
2.55	5'-PO3-AGCACTGGT (SEQ ID NO:421)	5'-PO3-CAGTGCTCT (SEQ ID NO:422)
2.56	5'-PO3-TCGCTTGGT (SEQ ID NO:423)	5'-PO3-CAAGCGACT (SEQ ID NO:424)
2.57	5'-PO3-AGCACTCGT (SEQ ID NO:425)	5'-PO3-GAGTGCTCT (SEQ ID NO:426)
2.58	5'-PO3-GCGATTGGT (SEQ ID NO:427)	5'-PO3-CAATCGCCT (SEQ ID NO:428)
2.59	5'-PO3-CCATCGCGT (SEQ ID NO:429)	5'-PO3-GCGATGGCT (SEQ ID NO:430)
2.60	5'-PO3-TCGCTTCGT (SEQ ID NO:431)	5'-PO3-GAAGCGACT (SEQ ID NO:432)
2.61	5'-PO3-AGTGCCTGT (SEQ ID NO:433)	5'-PO3-AGGCACTCT (SEQ ID NO:434)
2.62	5'-PO3-GGCATGAGGT (SEQ ID NO:435)	5'-PO3-CTATGCCCT (SEQ ID NO:436)
2.63	5'-PO3-GCGATTTCGT (SEQ ID NO:437)	5'-PO3-GAATCGCCT (SEQ ID NO:438)
2.64	5'-PO3-TGCGACGGT (SEQ ID NO:439)	5'-PO3-CGTCGCACT (SEQ ID NO:440)
2.65	5'-PO3-GAGTGGCGT (SEQ ID NO:441)	5'-PO3-GCCACTCCT (SEQ ID NO:442)
2.66	5'-PO3-CGGTGAGGT (SEQ ID NO:443)	5'-PO3-CTCACCGCT (SEQ ID NO:444)
2.67	5'-PO3-GCTGCAAGT (SEQ ID NO:445)	5'-PO3-TTGCAGCCT (SEQ ID NO:446)
2.68	5'-PO3-TTCCGCTGT (SEQ ID NO:447)	5'-PO3-AGCGGAACT (SEQ ID NO:448)
2.69	5'-PO3-GAGTGGAGT (SEQ ID NO:449)	5'-PO3-TCCACTCCT (SEQ ID NO:450)
2.70	5'-PO3-ACAGAGCGT (SEQ ID NO:451)	5'-PO3-GCTCTGTCT (SEQ ID NO:452)
2.71	5'-PO3-TGCGACCGT (SEQ ID NO:453)	5'-PO3-GGTCGCACT (SEQ ID NO:454)
2.72	5'-PO3-CCTGTAGGT (SEQ ID NO:455)	5'-PO3-CTACAGGCT (SEQ ID NO:456)

2.73	5'-PO3-TAGCCGTGT (SEQ ID NO:457)	5'-PO3-ACGGCTACT (SEQ ID NO:458)
2.74	5'-PO3-TGCGACAGT (SEQ ID NO:459)	5'-PO3-TGTCGCACT (SEQ ID NO:460)
2.75	5'-PO3-GGTCTGTGT (SEQ ID NO:461)	5'-PO3-ACAGACCCT (SEQ ID NO:462)
2.76	5'-PO3-CGGTGAAGT (SEQ ID NO:463)	5'-PO3-TTCACCGCT (SEQ ID NO:464)
2.77	5'-PO3-CAACGAGGT (SEQ ID NO:465)	5'-PO3-CTCGTTGCT (SEQ ID NO:466)
2.78	5'-PO3-GCAGCATGT (SEQ ID NO:467)	5'-PO3-ATGCTGCCT (SEQ ID NO:468)
2.79	5'-PO3-TCGTCAGGT (SEQ ID NO:469)	5'-PO3-CTGACGACT (SEQ ID NO:470)
2.80	5'-PO3-AGTGCCAGT (SEQ ID NO:471)	5'-PO3-TGGCACTCT (SEQ ID NO:472)
2.81	5'-PO3-TAGAGGCGT (SEQ ID NO:473)	5'-PO3-GCCTCTACT (SEQ ID NO:474)
2.82	5'-PO3-GTCAGCGGT (SEQ ID NO:475)	5'-PO3-CGCTGACCT (SEQ ID NO:476)
2.83	5'-PO3-TCAGGAGGT (SEQ ID NO:477)	5'-PO3-CTCCTGACT (SEQ ID NO:478)
2.84	5'-PO3-AGCAGGTGT (SEQ ID NO:479)	5'-PO3-ACCTGCTCT (SEQ ID NO:480)
2.85	5'-PO3-TTCCGCAGT (SEQ ID NO:481)	5'-PO3-TGCGGAACT (SEQ ID NO:482)
2.86	5'-PO3-GTCAGCCGT (SEQ ID NO:483)	5'-PO3-GGCTGACCT (SEQ ID NO:484)
2.87	5'-PO3-GGTCTGCGT (SEQ ID NO:485)	5'-PO3-GCAGACCCT (SEQ ID NO:486)
2.88	5'-PO3-TAGCCGAGT (SEQ ID NO:487)	5'-PO3-TCGGCTACT (SEQ ID NO:488)
2.89	5'-PO3-GTCAGCAGT (SEQ ID NO:489)	5'-PO3-TGCTGACCT (SEQ ID NO:490)
2.90	5'-PO3-GGTCTGAGT (SEQ ID NO:491)	5'-PO3-TCAGACCCT (SEQ ID NO:492)
2.91	5'-PO3-CGGACAGGT (SEQ ID NO:493)	5'-PO3-CTGTCCGCT (SEQ ID NO:494)
2.92	5'-PO3-TTAGCCGGT5'- PO3-3' (SEQ ID NO:495)	5'-PO3-CGGCTAACT5'-PO3- 3' (SEQ ID NO:496)
2.93	5'-PO3-GAGACGAGT (SEQ ID NO:497)	5'-PO3-TCGTCTCCT (SEQ ID NO:498)
2.94	5'-PO3-CGTAACCGT (SEQ ID NO:499)	5'-PO3-GGTTACGCT (SEQ ID NO:500)
2.95	5'-PO3-TTGGCGTGT5'- PO3-3' (SEQ ID NO:501)	5'-PO3-ACGCCAACT5'-PO3- 3' (SEQ ID NO:502)
2.96	5'-PO3-ATGGCAGGT (SEQ ID NO:503)	5'-PO3-CTGCCATCT (SEQ ID NO:504)

Tabla 4: Marcas de oligonucleótidos usadas en el ciclo 3:

Número de marca	Secuencia de la cadena superior	Secuencia de la cadena inferior
3.1	5'-PO3-CAG CTA CGA (SEQ ID NO: 505)	5'-PO3-GTA GCT GAC (SEQ ID NO: 506)
3.2	5'-PO3-CTC CTG CGA (SEQ ID NO: 507)	5'-PO3-GCA GGA GAC (SEQ ID NO: 508)
3.3	5'-PO3-GCT GCC TGA (SEQ ID NO: 509)	5'-PO3-AGG CAG CAC (SEQ ID NO: 510)
3.4	5'-PO3-CAG GAA CGA (SEQ ID NO: 511)	5'-PO3-GTT CCT GAC (SEQ ID NO: 512)
3.5	5'-PO3-CAC ACG CGA (SEQ ID NO: 513)	5'-PO3-GCG TGT GAC (SEQ ID NO: 514)
3.6	5'-PO3-GCA GCC TGA (SEQ ID NO: 515)	5'-PO3-AGG CTG CAC (SEQ ID NO: 516)
3.7	5'-PO3-CTG AAC GGA (SEQ ID NO: 517)	5'-PO3-CGT TCA GAC (SEQ ID NO: 518)
3.8	5'-PO3-CTG AAC CGA (SEQ ID NO: 519)	5'-PO3-GGT TCA GAC (SEQ ID NO: 520)
3.9	5'-PO3-TCT GGA CGA (SEQ ID NO: 521)	5'-PO3-GTC CAG AAC (SEQ ID NO: 522)
3.10	5'-PO3-TGC CTA CGA (SEQ ID NO: 523)	5'-PO3-GTA GGC AAC (SEQ ID NO: 524)
3.11	5'-PO3-GGC ATA CGA (SEQ ID NO: 525)	5'-PO3-GTA TGC CAC (SEQ ID NO: 526)
3.12	5'-PO3-CGG TGA CGA (SEQ ID NO: 527)	5'-PO3-GTC ACC GAC (SEQ ID NO: 528)
3.13	5'-PO3-CAA CGA CGA (SEQ ID NO: 529)	5'-PO3-GTC GTT GAC (SEQ ID NO: 530)
3.14	5'-PO3-CTC CTC TGA (SEQ ID NO: 531)	5'-PO3-AGA GGA GAC (SEQ ID NO: 532)
3.15	5'-PO3-TCA GGA CGA (SEQ ID NO: 533)	5'-PO3-GTC CTG AAC (SEQ ID NO: 534)
3.16	5'-PO3-AAA GGC GGA (SEQ ID NO: 535)	5'-PO3-CGC CTT TAC (SEQ ID NO: 536)
3.17	5'-PO3-CTC CTC GGA (SEQ ID NO: 537)	5'-PO3-CGA GGA GAC (SEQ ID NO: 538)
3.18	5'-PO3-CAG ATG CGA (SEQ ID NO: 539)	5'-PO3-GCA TCT GAC (SEQ ID NO: 540)
3.19	5'-PO3-GCA GCA AGA (SEQ ID NO: 541)	5'-PO3-TTG CTG CAC (SEQ ID NO: 542)
3.20	5'-PO3-GTG GAG TGA (SEQ ID NO: 543)	5'-PO3-ACT CCA CAC (SEQ ID NO: 544)
3.21	5'-PO3-CCA GTA GGA (SEQ ID NO: 545)	5'-PO3-CTA CTG GAC (SEQ ID NO: 546)
3.22	5'-PO3-ATG GCA CGA (SEQ ID NO: 547)	5'-PO3-GTG CCA TAC (SEQ ID NO: 548)
3.23	5'-PO3-GGA CTG TGA (SEQ ID NO: 549)	5'-PO3-ACA GTC CAC (SEQ ID NO: 550)

3.24	5'-PO3-CCG AAC TGA (SEQ ID NO:551)	5'-PO3-AGT TCG GAC (SEQ ID NO:552)
3.25	5'-PO3-CTC CTC AGA (SEQ ID NO:553)	5'-PO3-TGA GGA GAC (SEQ ID NO:554)
3.26	5'-PO3-CAC TGC TGA (SEQ ID NO:555)	5'-PO3-AGC AGT GAC (SEQ ID NO:556)
3.27	5'-PO3-AGC AGG CGA (SEQ ID NO:557)	5'-PO3-GCC TGC TAC (SEQ ID NO:558)
3.28	5'-PO3-AGC AGG AGA (SEQ ID NO:559)	5'-PO3-TCC TGC TAC (SEQ ID NO:560)
3.29	5'-PO3-AGA GCC AGA (SEQ ID NO:561)	5'-PO3-TGG CTC TAC (SEQ ID NO:562)
3.30	5'-PO3-GTC GTT GGA (SEQ ID NO:563)	5'-PO3-CAA CGA CAC (SEQ ID NO:564)
3.31	5'-PO3-CCG AAC GGA (SEQ ID NO:565)	5'-PO3-CGT TCG GAC (SEQ ID NO:566)
3.32	5'-PO3-CAC TGC GGA (SEQ ID NO:567)	5'-PO3-CGC AGT GAC (SEQ ID NO:568)
3.33	5'-PO3-GTG GAG CGA (SEQ ID NO:569)	5'-PO3-GCT CCA CAC (SEQ ID NO:570)
3.34	5'-PO3-GTG GAG AGA (SEQ ID NO:571)	5'-PO3-TCT CCA CAC (SEQ ID NO:572)
3.35	5'-PO3-GGA CTG CGA (SEQ ID NO:573)	5'-PO3-GCA GTC CAC (SEQ ID NO:574)
3.36	5'-PO3-CCG AAC CGA (SEQ ID NO:575)	5'-PO3-GGT TCG GAC (SEQ ID NO:576)
3.37	5'-PO3-CAC TGC CGA (SEQ ID NO:577)	5'-PO3-GGC AGT GAC (SEQ ID NO:578)
3.38	5'-PO3-CGA AAC GGA (SEQ ID NO:579)	5'-PO3-CGT TTC GAC (SEQ ID NO:580)
3.39	5'-PO3-GGA CTG AGA (SEQ ID NO:581)	5'-PO3-TCA GTC CAC (SEQ ID NO:582)
3.40	5'-PO3-CCG AAC AGA (SEQ ID NO:583)	5'-PO3-TGT TCG GAC (SEQ ID NO:584)
3.41	5'-PO3-CGA AAC CGA (SEQ ID NO:585)	5'-PO3-GGT TTC GAC (SEQ ID NO:586)
3.42	5'-PO3-CTG GCT TGA (SEQ ID NO:587)	5'-PO3-AAG CCA GAC (SEQ ID NO:588)
3.43	5'-PO3-CAC ACC TGA (SEQ ID NO:589)	5'-PO3-AGG TGT GAC (SEQ ID NO:590)
3.44	5'-PO3-AAC GAC CGA (SEQ ID NO:591)	5'-PO3-GGT CGT TAC (SEQ ID NO:592)
3.45	5'-PO3-ATC CAG CGA (SEQ ID NO:593)	5'-PO3-GCT GGA TAC (SEQ ID NO:594)
3.46	5'-PO3-TGC GAA GGA (SEQ ID NO:595)	5'-PO3-CTT CGC AAC (SEQ ID NO:596)
3.47	5'-PO3-TGC GAA CGA (SEQ ID NO:597)	5'-PO3-GTT CGC AAC (SEQ ID NO:598)
3.48	5'-PO3-CTG GCT GGA (SEQ ID NO:599)	5'-PO3-CAG CCA GAC (SEQ ID NO:600)
3.49	5'-PO3-CAC ACC GGA (SEQ ID NO:601)	5'-PO3-CGG TGT GAC (SEQ ID NO:602)

	5'-PO3-AGT GCA GGA	5'-PO3-CTG CAC TAC
3.50	(SEQ ID NO: 603)	(SEQ ID NO: 604)
	5'-PO3-GAC CGT TGA	5'-PO3-AAC GGT CAC
3.51	(SEQ ID NO: 605)	(SEQ ID NO: 606)
	5'-PO3-GGT GAG TGA	5'-PO3-ACT CAC CAC
3.52	(SEQ ID NO: 607)	(SEQ ID NO: 608)
	5'-PO3-CCT TCC TGA	5'-PO3-AGG AAG GAC
3.53	(SEQ ID NO: 609)	(SEQ ID NO: 610)
	5'-PO3-CTG GCT AGA	5'-PO3-TAG CCA GAC
3.54	(SEQ ID NO: 611)	(SEQ ID NO: 612)
	5'-PO3-CAC ACC AGA	5'-PO3-TGG TGT GAC
3.55	(SEQ ID NO: 613)	(SEQ ID NO: 614)
	5'-PO3-AGC GGT AGA	5'-PO3-TAC CGC TAC
3.56	(SEQ ID NO: 615)	(SEQ ID NO: 616)
	5'-PO3-GTC AGA GGA	5'-PO3-CTC TGA CAC
3.57	(SEQ ID NO: 617)	(SEQ ID NO: 618)
	5'-PO3-TTC CGA CGA	5'-PO3-GTC GGA AAC
3.58	(SEQ ID NO: 619)	(SEQ ID NO: 620)
	5'-PO3-AGG CGT AGA	5'-PO3-TAC GCC TAC
3.59	(SEQ ID NO: 621)	(SEQ ID NO: 622)
	5'-PO3-CTC GAC TGA	5'-PO3-AGT CGA GAC
3.60	(SEQ ID NO: 623)	(SEQ ID NO: 624)
	5'-PO3-TAC GCT GGA	5'-PO3-CAG CGT AAC
3.61	(SEQ ID NO: 625)	(SEQ ID NO: 626)
	5'-PO3-GTT CGG TGA	5'-PO3-ACC GAA CAC
3.62	(SEQ ID NO: 627)	(SEQ ID NO: 628)
	5'-PO3-GCC AGC AGA	5'-PO3-TGC TGG CAC
3.63	(SEQ ID NO: 629)	(SEQ ID NO: 630)
	5'-PO3-GAC CGT AGA	5'-PO3-TAC GGT CAC
3.64	(SEQ ID NO: 631)	(SEQ ID NO: 632)
	5'-PO3-GTG CTC TGA	5'-PO3-AGA GCA CAC
3.65	(SEQ ID NO: 633)	(SEQ ID NO: 634)
	5'-PO3-GGT GAG CGA	5'-PO3-GCT CAC CAC
3.66	(SEQ ID NO: 635)	(SEQ ID NO: 636)
	5'-PO3-GGT GAG AGA	5'-PO3-TCT CAC CAC
3.67	(SEQ ID NO: 637)	(SEQ ID NO: 638)
	5'-PO3-CCT TCC AGA	5'-PO3-TGG AAG GAC
3.68	(SEQ ID NO: 639)	(SEQ ID NO: 640)
	5'-PO3-CTC CTA CGA	5'-PO3-GTA GGA GAC
3.69	(SEQ ID NO: 641)	(SEQ ID NO: 642)
	5'-PO3-CTC GAC GGA	5'-PO3-CGT CGA GAC
3.70	(SEQ ID NO: 643)	(SEQ ID NO: 644)
	5'-PO3-GCC GTT TGA	5'-PO3-AAA CGG CAC
3.71	(SEQ ID NO: 645)	(SEQ ID NO: 646)
	5'-PO3-GCG GAG TGA	5'-PO3-ACT CCG CAC
3.72	(SEQ ID NO: 647)	(SEQ ID NO: 648)
	5'-PO3-CGT GCT TGA	5'-PO3-AAG CAC GAC
3.73	(SEQ ID NO: 649)	(SEQ ID NO: 650)
	5'-PO3-CTC GAC CGA	5'-PO3-GGT CGA GAC
3.74	(SEQ ID NO: 651)	(SEQ ID NO: 652)
	5'-PO3-AGA GCA GGA	5'-PO3-CTG CTC TAC
3.75	(SEQ ID NO: 653)	(SEQ ID NO: 654)

3.76	5'-PO3-GTG CTC GGA (SEQ ID NO: 655)	5'-PO3-CGA GCA CAC (SEQ ID NO: 656)
3.77	5'-PO3-CTC GAC AGA (SEQ ID NO: 657)	5'-PO3-TGT CGA GAC (SEQ ID NO: 658)
3.78	5'-PO3-GGA GAG TGA (SEQ ID NO: 659)	5'-PO3-ACT CTC CAC (SEQ ID NO: 660)
3.79	5'-PO3-AGG CTG TGA (SEQ ID NO: 661)	5'-PO3-ACA GCC TAC (SEQ ID NO: 662)
3.80	5'-PO3-AGA GCA CGA (SEQ ID NO: 663)	5'-PO3-GTG CTC TAC (SEQ ID NO: 664)
3.81	5'-PO3-CCA TCC TGA (SEQ ID NO: 665)	5'-PO3-AGG ATG GAC (SEQ ID NO: 666)
3.82	5'-PO3-GTT CGG AGA (SEQ ID NO: 667)	5'-PO3-TCC GAA CAC (SEQ ID NO: 668)
3.83	5'-PO3-TGG TAG CGA (SEQ ID NO: 669)	5'-PO3-GCT ACC AAC (SEQ ID NO: 670)
3.84	5'-PO3-GTG CTC CGA (SEQ ID NO: 671)	5'-PO3-GGA GCA CAC (SEQ ID NO: 672)
3.85	5'-PO3-GTG CTC AGA (SEQ ID NO: 673)	5'-PO3-TGA GCA CAC (SEQ ID NO: 674)
3.86	5'-PO3-GCC GTT GGA (SEQ ID NO: 675)	5'-PO3-CAA CGG CAC (SEQ ID NO: 676)
3.87	5'-PO3-GAG TGC TGA (SEQ ID NO: 677)	5'-PO3-AGC ACT CAC (SEQ ID NO: 678)
3.88	5'-PO3-GCT CCT TGA (SEQ ID NO: 679)	5'-PO3-AAG GAG CAC (SEQ ID NO: 680)
3.89	5'-PO3-CCG AAA GGA (SEQ ID NO: 681)	5'-PO3-CTT TCG GAC (SEQ ID NO: 682)
3.90	5'-PO3-CAC TGA GGA (SEQ ID NO: 683)	5'-PO3-CTC AGT GAC (SEQ ID NO: 684)
3.91	5'-PO3-CGT GCT GGA (SEQ ID NO: 685)	5'-PO3-CAG CAC GAC (SEQ ID NO: 686)
3.92	5'-PO3-CCG AAA CGA (SEQ ID NO: 687)	5'-PO3-GTT TCG GAC (SEQ ID NO: 688)
3.93	5'-PO3-GCG GAG AGA (SEQ ID NO: 689)	5'-PO3-TCT CCG CAC (SEQ ID NO: 690)
3.94	5'-PO3-GCC GTT AGA (SEQ ID NO: 691)	5'-PO3-TAA CGG CAC (SEQ ID NO: 692)
3.95	5'-PO3-TCT CGT GGA (SEQ ID NO: 693)	5'-PO3-CAC GAG AAC (SEQ ID NO: 694)
3.96	5'-PO3-CGT GCT AGA (SEQ ID NO: 695)	5'-PO3-TAG CAC GAC (SEQ ID NO: 696)

Tabla 4: Marcas de oligonucleótidos usadas en el ciclo 3:

Número de marca	Secuencia de la cadena superior	Secuencia de la cadena inferior
4.1	5'-PO3-GCCTGTCTT (SEQ ID NO: 697)	5'-PO3-GAC AGG CTC (SEQ ID NO: 698)
4.2	5'-PO3-CTCCTGGTT (SEQ ID NO: 699)	5'-PO3-CCA GGA GTC (SEQ ID NO: 700)

4.3	5'-PO3-ACTCTGCTT (SEQ ID NO:701)	5'-PO3-GCA GAG TTC (SEQ ID NO:702)
4.4	5'-PO3-CATCGCCTT (SEQ ID NO:703)	5'-PO3-GGC GAT GTC (SEQ ID NO:704)
4.5	5'-PO3-GCCACTATT (SEQ ID NO:705)	5'-PO3-TAG TGG CTC (SEQ ID NO:706)
4.6	5'-PO3-CACACGGTT (SEQ ID NO:707)	5'-PO3-CCG TGT GTC (SEQ ID NO:708)
4.7	5'-PO3-CAACGCCTT (SEQ ID NO:709)	5'-PO3-GGC GTT GTC (SEQ ID NO:710)
4.8	5'-PO3-ACTGAGGTT (SEQ ID NO:711)	5'-PO3-CCT CAG TTC (SEQ ID NO:712)
4.9	5'-PO3-GTGCTGGTT (SEQ ID NO:713)	5'-PO3-CCA GCA CTC (SEQ ID NO:714)
4.10	5'-PO3-CATCGACTT (SEQ ID NO:715)	5'-PO3-GTC GAT GTC (SEQ ID NO:716)
4.11	5'-PO3-CCATCGGTT (SEQ ID NO:717)	5'-PO3-CCG ATG GTC (SEQ ID NO:718)
4.12	5'-PO3-GCTGCACTT (SEQ ID NO:719)	5'-PO3-GTG CAG CTC (SEQ ID NO:720)
4.13	5'-PO3-ACAGAGGTT (SEQ ID NO:721)	5'-PO3-CCT CTG TTC (SEQ ID NO:722)
4.14	5'-PO3-AGTGCCGTT (SEQ ID NO:723)	5'-PO3-CGG CAC TTC (SEQ ID NO:724)
4.15	5'-PO3-CGGACATTT (SEQ ID NO:725)	5'-PO3-ATG TCC GTC (SEQ ID NO:726)
4.16	5'-PO3-GGTCTGGTT (SEQ ID NO:727)	5'-PO3-CCA GAC CTC (SEQ ID NO:728)
4.17	5'-PO3-GAGACGGTT (SEQ ID NO:729)	5'-PO3-CCG TCT CTC (SEQ ID NO:730)
4.18	5'-PO3-CTTTCCGTT (SEQ ID NO:731)	5'-PO3-CGG AAA GTC (SEQ ID NO:732)
4.19	5'-PO3-CAGATGGTT (SEQ ID NO:733)	5'-PO3-CCA TCT GTC (SEQ ID NO:734)
4.20	5'-PO3-CGGACACTT (SEQ ID NO:735)	5'-PO3-GTG TCC GTC (SEQ ID NO:736)
4.21	5'-PO3-ACTCTCGTT (SEQ ID NO:737)	5'-PO3-CGA GAG TTC (SEQ ID NO:738)
4.22	5'-PO3-GCAGCACTT (SEQ ID NO:739)	5'-PO3-GTG CTG CTC (SEQ ID NO:740)
4.23	5'-PO3-ACTCTCCTT (SEQ ID NO:741)	5'-PO3-GGA GAG TTC (SEQ ID NO:742)
4.24	5'-PO3-ACCTTGTT (SEQ ID NO:743)	5'-PO3-CCA AGG TTC (SEQ ID NO:744)
4.25	5'-PO3-AGAGCCGTT (SEQ ID NO:745)	5'-PO3-CGG CTC TTC (SEQ ID NO:746)
4.26	5'-PO3-ACCTTGCTT (SEQ ID NO:747)	5'-PO3-GCA AGG TTC (SEQ ID NO:748)
4.27	5'-PO3-AAGTCCGTT (SEQ ID NO:749)	5'-PO3-CGG ACT TTC (SEQ ID NO:750)
4.28	5'-PO3-GGA CTG GTT (SEQ ID NO:751)	5'-PO3-CCA GTC CTC (SEQ ID NO:752)

4.29	5'-PO3-GTCGTTCTT (SEQ ID NO:753)	5'-PO3-GAA CGA CTC (SEQ ID NO:754)
4.30	5'-PO3-CAGCATCTT (SEQ ID NO:755)	5'-PO3-GAT GCT GTC (SEQ ID NO:756)
4.31	5'-PO3-CTATCCGTT (SEQ ID NO:757)	5'-PO3-CGG ATA GTC (SEQ ID NO:758)
4.32	5'-PO3-ACACTCGTT (SEQ ID NO:759)	5'-PO3-CGA GTG TTC (SEQ ID NO:760)
4.33	5'-PO3-ATCCAGGTT (SEQ ID NO:761)	5'-PO3-CCT GGA TTC (SEQ ID NO:762)
4.34	5'-PO3-GTTCCTGTT (SEQ ID NO:763)	5'-PO3-CAG GAA CTC (SEQ ID NO:764)
4.35	5'-PO3-ACACTCCTT (SEQ ID NO:765)	5'-PO3-GGA GTG TTC (SEQ ID NO:766)
4.36	5'-PO3-GTTCCTCTT (SEQ ID NO:767)	5'-PO3-GAG GAA CTC (SEQ ID NO:768)
4.37	5'-PO3-CTGGCTCTT (SEQ ID NO:769)	5'-PO3-GAG CCA GTC (SEQ ID NO:770)
4.38	5'-PO3-ACGGCATT (SEQ ID NO:771)	5'-PO3-ATG CCG TTC (SEQ ID NO:772)
4.39	5'-PO3-GGTGAGGTT (SEQ ID NO:773)	5'-PO3-CCT CAC CTC (SEQ ID NO:774)
4.40	5'-PO3-CCTTCCGTT (SEQ ID NO:775)	5'-PO3-CGG AAG GTC (SEQ ID NO:776)
4.41	5'-PO3-TACGCTCTT (SEQ ID NO:777)	5'-PO3-GAG CGT ATC (SEQ ID NO:778)
4.42	5'-PO3-ACGGCAGTT (SEQ ID NO:779)	5'-PO3-CTG CCG TTC (SEQ ID NO:780)
4.43	5'-PO3-ACTGACGTT (SEQ ID NO:781)	5'-PO3-CGT CAG TTC (SEQ ID NO:782)
4.44	5'-PO3-ACGGCACTT (SEQ ID NO:783)	5'-PO3-GTG CCG TTC (SEQ ID NO:784)
4.45	5'-PO3-ACTGACCTT (SEQ ID NO:785)	5'-PO3-GGT CAG TTC (SEQ ID NO:786)
4.46	5'-PO3-TTTGCGGTT (SEQ ID NO:787)	5'-PO3-CCG CAA ATC (SEQ ID NO:788)
4.47	5'-PO3-TGGTAGGTT (SEQ ID NO:789)	5'-PO3-CCT ACC ATC (SEQ ID NO:790)
4.48	5'-PO3-GTTCGGCTT (SEQ ID NO:791)	5'-PO3-GCC GAA CTC (SEQ ID NO:792)
4.49	5'-PO3-GCC GTT CTT (SEQ ID NO:793)	5'-PO3-GAA CGG CTC (SEQ ID NO:794)
4.50	5'-PO3-GGAGAGGTT (SEQ ID NO:795)	5'-PO3-CCT CTC CTC (SEQ ID NO:796)
4.51	5'-PO3-CACTGACTT (SEQ ID NO:797)	5'-PO3-GTC AGT GTC (SEQ ID NO:798)
4.52	5'-PO3-CGTGCTCTT (SEQ ID NO:799)	5'-PO3-GAG CAC GTC (SEQ ID NO:800)
4.53	5'-PO3-AATCCGCTT (SEQ ID NO:801)	5'-PO3-GCGGATTTC (SEQ ID NO:802)
4.54	5'-PO3-AGGCTGGTT (SEQ ID NO:803)	5'-PO3-CCA GCC TTC (SEQ ID NO:804)

	5'-PO3-GCTAGTGTT	5'-PO3-CAC TAG CTC
4.55	(SEQ ID NO:805)	(SEQ ID NO:806)
	5'-PO3-GGAGAGCTT	5'-PO3-GCT CTC CTC
4.56	(SEQ ID NO:807)	(SEQ ID NO:808)
	5'-PO3-GGAGAGATT	5'-PO3-TCT CTC CTC
4.57	(SEQ ID NO:809)	(SEQ ID NO:810)
	5'-PO3-AGGCTGCTT	5'-PO3-GCA GCC TTC
4.58	(SEQ ID NO:811)	(SEQ ID NO:812)
	5'-PO3-GAGTGC GTT	5'-PO3-CGC ACT CTC
4.59	(SEQ ID NO:813)	(SEQ ID NO:814)
	5'-PO3-CCATCCATT	5'-PO3-TGG ATG GTC
4.60	(SEQ ID NO:815)	(SEQ ID NO:816)
	5'-PO3-GCTAGTCTT	5'-PO3-GAC TAG CTC
4.61	(SEQ ID NO:817)	(SEQ ID NO:818)
	5'-PO3-AGGCTGATT	5'-PO3-TCA GCC TTC
4.62	(SEQ ID NO:819)	(SEQ ID NO:820)
	5'-PO3-ACAGACGTT	5'-PO3-CGT CTG TTC
4.63	(SEQ ID NO:821)	(SEQ ID NO:822)
	5'-PO3-GAGTGCCTT	5'-PO3-GGC ACT CTC
4.64	(SEQ ID NO:823)	(SEQ ID NO:824)
	5'-PO3-ACAGACCTT	5'-PO3-GGT CTG TTC
4.65	(SEQ ID NO:825)	(SEQ ID NO:826)
	5'-PO3-CGAGCTTTT	5'-PO3-AAG CTC GTC
4.66	(SEQ ID NO:827)	(SEQ ID NO:828)
	5'-PO3-TTAGCGGTT	5'-PO3-CCG CTA ATC
4.67	(SEQ ID NO:829)	(SEQ ID NO:830)
	5'-PO3-CCTCTTGTT	5'-PO3-CAA GAG GTC
4.68	(SEQ ID NO:831)	(SEQ ID NO:832)
	5'-PO3-GGTCTCTTT	5'-PO3-AGA GAC CTC
4.69	(SEQ ID NO:833)	(SEQ ID NO:834)
	5'-PO3-GCCAGATTT	5'-PO3-ATC TGG CTC
4.70	(SEQ ID NO:835)	(SEQ ID NO:836)
	5'-PO3-GAGACCTTT	5'-PO3-AGG TCT CTC
4.71	(SEQ ID NO:837)	(SEQ ID NO:838)
	5'-PO3-CACACAGTT	5'-PO3-CTG TGT GTC
4.72	(SEQ ID NO:839)	(SEQ ID NO:840)
	5'-PO3-CCTCTTCTT	5'-PO3-GAA GAG GTC
4.73	(SEQ ID NO:841)	(SEQ ID NO:842)
	5'-PO3-TAGAGCGTT	5'-PO3-CGC TCT ATC
4.74	(SEQ ID NO:843)	(SEQ ID NO:844)
	5'-PO3-GCACCTTIT	5'-PO3-AAG GTG CTC
4.75	(SEQ ID NO:845)	(SEQ ID NO:846)
	5'-PO3-GGCTTGTTT	5'-PO3-ACA AGC CTC
4.76	(SEQ ID NO:847)	(SEQ ID NO:848)
	5'-PO3-GACGCGATT	5'-PO3-TCG CGT CTC
4.77	(SEQ ID NO:849)	(SEQ ID NO:850)
	5'-PO3-CGAGCTGTT	5'-PO3-CAG CTC GTC
4.78	(SEQ ID NO:851)	(SEQ ID NO:852)
	5'-PO3-TAGAGCCTT	5'-PO3-GGC TCT ATC
4.79	(SEQ ID NO:853)	(SEQ ID NO:854)
	5'-PO3-CATCCGTTT	5'-PO3-ACG GAT GTC
4.80	(SEQ ID NO:855)	(SEQ ID NO:856)

4.81	5'-PO3-GGTCTCGTT (SEQ ID NO:857)	5'-PO3-CGA GAC CTC (SEQ ID NO:858)
4.82	5'-PO3-GCCAGAGTT (SEQ ID NO:859)	5'-PO3-CTC TGG CTC (SEQ ID NO:860)
4.83	5'-PO3-GAGACCGTT (SEQ ID NO:861)	5'-PO3-CGG TCT CTC (SEQ ID NO:862)
4.84	5'-PO3-CGAGCTATT (SEQ ID NO:863)	5'-PO3-TAG CTC GTC (SEQ ID NO:864)
4.85	5'-PO3-GCAAGTGTT (SEQ ID NO:865)	5'-PO3-CAC TTG CTC (SEQ ID NO:866)
4.86	5'-PO3-GGTCTCCTT (SEQ ID NO:867)	5'-PO3-GGA GAC CTC (SEQ ID NO:868)
4.87	5'-PO3-GCCAGACTT (SEQ ID NO:869)	5'-PO3-GTC TGG CTC (SEQ ID NO:870)
4.88	5'-PO3-GGTCTCATT (SEQ ID NO:871)	5'-PO3-TGA GAC CTC (SEQ ID NO:872)
4.89	5'-PO3-GAGACCATT (SEQ ID NO:873)	5'-PO3-TGG TCT CTC (SEQ ID NO:874)
4.90	5'-PO3-CCTTCAGTT (SEQ ID NO:875)	5'-PO3-CTG AAG GTC (SEQ ID NO:876)
4.91	5'-PO3-GCACCTGTT (SEQ ID NO:877)	5'-PO3-CAG GTG CTC (SEQ ID NO:878)
4.92	5'-PO3-AAAGGCGTT (SEQ ID NO:879)	5'-PO3-CGC CTT TTC (SEQ ID NO:880)
4.93	5'-PO3-CAGATCGTT (SEQ ID NO:881)	5'-PO3-CGA TCT GTC (SEQ ID NO:882)
4.94	5'-PO3-CATAGGCTT (SEQ ID NO:883)	5'-PO3-GCC TAT GTC (SEQ ID NO:884)
4.95	5'-PO3-CCTTCACTT (SEQ ID NO:885)	5'-PO3-GTG AAG GTC (SEQ ID NO:886)
4.96	5'-PO3-GCACCTCTT (SEQ ID NO:887)	5'-PO3-GAG GTG CTC (SEQ ID NO:888)

Tabla 7: Correspondencia entre bloques de construcción y marcas de oligonucleótidos para los Ciclos 1-4.

Bloque de construcción	Ciclo	Ciclo	Ciclo	Ciclo
	1	2	3	4
BB1	1.1	2.1	3.1	4.1
BB2	1.2	2.2	3.2	4.2
BB3	1.3	2.3	3.3	4.3
BB4	1.4	2.4	3.4	4.4
BB5	1.5	2.5	3.5	4.5

ES 2 365 534 T3

BB6	1.6	2.6	3.6	4.6
BB7	1.7	2.7	3.7	4.7
BB8	1.8	2.8	3.8	4.8
BB9	1.9	2.9	3.9	4.9
BB10	1.10	2.10	3.10	4.10
BB11	1.11	2.11	3.11	4.11
B812	1.12	2.12	3.12	4.12
BB13	1.13	2.13	3.13	4.13
BB14	1.14	2.14	3.14	4.14
BB15	1.15	2.15	3.15	4.15
B816	1.16	2.16	3.16	4.16
BB17	1.17	2.17	3.17	4.17
BB18	1.18	2.18	3.18	4.18
BB19	1.19	2.19	3.19	4.19
BB20	1.20	2.20	3.20	4.20
BB21	1.21	2.21	3.21	4.21
BB22	1.22	2.22	3.22	4.22
BB23	1.23	2.23	3.23	4.23
BB24	1.24	2.24	3.24	4.24
BB25	1.25	2.25	3.25	4.25
BB26	1.26	2.26	3.26	4.26
BB27	1.27	2.27	3.27	4.27
BB28	1.28	2.28	3.28	4.28
BB29	1.29	2.29	3.29	4.29
BB30	1.30	2.30	3.30	-4.30
BB31	1.31	2.31	3.31	4.31
BB32	1.32	2.32	3.32	4.32
BB33	1.33	2.33	3.33	4.33
BB34	1.34	2.34	3.34	4.34
BB35	1.35	2.35	3.35	4.35
BB36	1.36	2.36	3.36	4.36
BB37	1.37	2.37	3.37	4.37
BB38	1.38	2.38	3.38	4.38
B839	1.39	2.39	3.39	4.39
BB40	1.44	2.44	3.44	4.44
BB41	1.41	2.41	3.41	4.41

ES 2 365 534 T3

BB42	1.42	2.42	3.42	4.42
BB43	1.43	2.43	3.43	4.43
BB44	1.40	2.40	3.40	4.40
BB45	1.45	2.45	3.45	4.45
BB46	1.46	2.46	3.46	4.46
BB47	1.47	2.47	3.47	4.47
BB48	1.48	2.48	3.48	4.48
BB49	1.49	2.49	3.49	4.49
BB50	1.50	2.50	3.50	4.50
BB51	1.51	2.51	3.51	4.51
BB52	1.52	2.52	3.52	4.52
BB53	1.53	2.53	3.53	4.53
BB54	1.54	2.54	3.54	4.54
BB55	1.55	2.55	3.55	4.55
BB56	1.56	2.56	3.56	4.56
BB57	1.57	2.57	3.57	4.57
BB58	1.58	2.58	3.58	4.58
BB59	1.59	2.59	3.59	4.59
BB60	1.60	2.60	3.60	4.60
BB61	1.61	2.61	3.61	4.61
BB62	1.62	2.62	3.62	4.62
BB63	1.63	2.63	3.63	4.63
BB64	1.64	2.64	3.64	4.64
BB65	1.65	2.65	3.65	4.65
BB66	1.66	2.66	3.66	4.66
BB67	1.67	2.67	3.67	4.67
BB68	1.68	2.68	3.68	4.68
BB69	1.69	2.69	3.69	4.69
BB70	1.70	2.70	3.70	4.70
BB71	1.71	2.71	3.71	4.71
BB72	1.72	2.72	3.72	4.72
BB73	1.73	2.73	3.73	4.73
BB74	1.74	2.74	3.74	4.74
BB75	1.75	2.75	3.75	4.75
BB76	1.76	2.76	3.76	4.76
BB77	1.77	2.77	3.77	4.77

BB78	1.78	2.78	3.78	4.78
BB79	1.79	2.79	3.79	4.79
BB80	1.80	2.80	3.80	4.80
BB81	1.81	2.81	3.81	4.81
BB82	1.82	2.82	3.82	4.82
BB83	1.96	2.96	3.96	4.96
BB84	1.83	2.83	3.83	4.83
BB85	1.84	2.84	3.84	4.84
BB86	1.85	2.85	3.85	4.85
BB87	1.86	2.86	3.86	4.86
BB88	1.87	2.87	3.87	4.87
BB89	1.88	2.88	3.88	4.88
BB90	1.89	2.89	3.89	4.89
BB91	1.90	2.90	3.90	4.90
BB92	1.91	2.91	3.91	4.91
BB93	1.92	2.92	3.9.2	4.92
BB94	1.93	2.93	3.93	4.93
BB95	1.94	2.94	3.94	4.94
BB96	1.95	2.95	3.95	4.95

Buffer de ligasa 1X: 50 mM de Tris, pH 7,5; 10 mM de ditioneitol; 10 mM de MgCl₂; 2 mM de ATP; 50 mM de NaCl.

Buffer de ligasa 10X: 500 mM de Tris, pH 7,5; 100 mM de ditioneitol; 100 mM de MgCl₂; 20 mM de ATP; 500 mM de NaCl

5 Unión del espaciador soluble en agua al Compuesto 2

A una solución del Compuesto 2 (60 mL, 1 mM) en buffer de borato de sodio (150 mM, pH 9,4) que se enfrió a 4°C se añadieron 40 equivalentes de ácido N-Fmoc-15-amino-4,7,10,13-tetraoxaoctadecanoico (S-Ado) en N,N-dimetilformamida (DMF) (16 mL, 0,15 M) seguido por 40 equivalentes de cloruro hidrato de 4-(4,6-dimetoxi[1,3,5]triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM) en agua (9,6 mL, 0,25 M). La mezcla se agitó suavemente durante 2 horas a 4°C antes de añadir 40 equivalentes adicionales de S-Ado y DMTMM y se agitaron durante 16 horas adicionales a 4°C.

Después de la acilación, se añadieron 0,1X volumen de NaCl 5 M acuoso y un volumen 2,5X de etanol frío (-20°C) y la mezcla se dejó estacionar a -20°C durante al menos una hora. La mezcla posteriormente se centrifugó durante 15 minutos a 14.000 rpm en una centrífuga de 4°C para dar un pellet blanco que se lavó con EtOH frío y posteriormente se secó en un liofilizador a temperatura ambiente durante 30 minutos. El sólido se disolvió en 40 mL de agua y se purificó por HPLC de fase inversa con una columna Waters Xterra RP18. Se usó un perfil de gradiente de fase móvil binaria para eluir el producto por medio un buffer de 50 mM de acetato de trietilamonio a pH 7,5 y 99% de solución de acetronitrilo/1% de agua. El material purificado se concentró por liofilización y el residuo resultante se disolvió en 5 mL de agua. Se añadió un volumen 0,1X de piperidina a la solución y la mezcla se agitó suavemente durante 45 minutos a temperatura ambiente. El producto se purificó posteriormente por precipitación con etanol como se describió antes y se aisló por centrifugación. El pellet resultante se lavó dos veces con EtOH frío y se secó por liofilización para dar el Compuesto 3.

Ciclo 1

A cada pocillo de una placa de 96 pocillos se añadieron 12,5 µL de una solución 4 mM del Compuesto 3 en agua; 100 µL de una solución 1 mM de una marca de oligonucleótidos 1,1 a 1,96, como se muestra en la Tabla 3 (la relación molar del Compuesto 3 a las marcas fue 1:2). Las placas se calentaron 95°C durante 1 minuto y

posteriormente se enfriaron a 16°C durante 10 minutos. A cada pocillo se añadieron 10 µL de buffer de ligasa 10X, 30 unidades de T4 ADN ligasa (1 µL de una solución de 30 unidades/µL (FermentasLife Science, Cat. No. EL0013)), 76,5 µL de agua y las soluciones resultantes se incubaron a 16°C durante 16 horas.

- 5 Después de la reacción de ligamiento, se añadieron 20 µL de NaCl acuoso 5 M directamente a cada pocillo, seguido por 500 µL de etanol frío (-20°C) y se mantuvo a -20°C durante 1 hora.

Las placas se centrifugaron durante 1 hora a 3200 g en una centrífuga Beckman Coulter Allegra 6R por medio Beckman Microplus Carriers. El sobrenadante se extrajo cuidadosamente por la inversión de la placa y el pellet se lavó con 70% de etanol frío acuoso a -20°C. Cada uno de los pellet se diluyó posteriormente en el buffer de borato de sodio (50 µL, 150 mM, pH 9,4) a una concentración de 1 mM y se enfrió a 4°C.

- 10 A cada solución se añadieron 40 equivalentes de uno de los 96 precursores del bloque de construcción en DMF (13 µL, 0,15 M) seguido por 40 equivalentes de DMT-MM en agua (8 µL, 0,25M), y las soluciones se agitaron suavemente a 4°C. Después de 2 horas, se añadieron 40 equivalentes adicionales de uno de cada precursor del bloque de construcción y las soluciones se agitaron suavemente durante 16 horas a 4°C. Después de la acilación, 10 equivalentes de éster de ácido acético de-N-hidroxi-succinimida en DMF (2 µL, 0,25M) se añadieron a cada solución y se agitaron suavemente durante 10 minutos.

- 15 Después de la acilación, las 96 mezclas de reacción se combinaron y se añadieron 0,1 volumen de NaCl acuoso 5 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío y la solución se dejó estacionar a -20°C durante al menos una hora. La mezcla posteriormente se centrifugó. Después de la centrifugación, se extrajo tanto sobrenadante como sea posible con una micropipeta, el pellet se lavó con etanol frío y se centrifugó otra vez. El sobrenadante se extrajo con una pipeta de 200 µL. Se añadió etanol frío 70% al tubo, y la mezcla resultante se centrifugó durante 5 min a 4°C.

- 20 El sobrenadante se extrajo y el etanol restante se extrajo por liofilización a temperatura ambiente durante 10 minutos. El pellet se diluyó posteriormente en 2 mL de agua y se purificó por HPLC de fase inversa con una columna Waters Xterra RP18, Se usó un perfil de gradiente de fase móvil binaria para eluir la biblioteca por medio un buffer de 50 mM de acetato de trietilamonio a pH 7,5 y 99% de solución de acetronitrilo/1% de agua. Las fracciones que contienen la biblioteca se recolectaron, mezclaron y liofilizaron. El residuo resultante se disolvió en 2,5 mL de agua y se añadieron 250 µL de piperidina. La solución se agitó suavemente durante 45 minutos y posteriormente se precipitó con etanol como se describió antes. El pellet resultante se secó por liofilización y posteriormente se disolvió en buffer de borato de sodio (4,8 mL, 150 mM, pH 9,4) a una concentración de 1 mM.

- 25 La solución se enfrió a 4°C y se añadieron 40 equivalentes de N-Fmoc-propargilglicina en DMF (1,2 mL, 0,15 M) y DMT-MM en agua (7,7 mL, 0,25 M). La mezcla se agitó suavemente durante 2 horas a 4°C antes de añadir 40 equivalentes adicionales de N-Fmoc-propargilglicina y DMT-MM y la solución se agitó durante 16 horas adicionales. La mezcla se purificó más tarde por precipitación con EtOH y HPLC de fase inversa como se describió anteriormente y el grupo N-Fmoc se extrajo por tratamiento con piperidina como se describió previamente. Después de la purificación final con precipitación EtOH, el pellet resultante se secó por liofilización y se llevó al próximo ciclo de síntesis-

35 Ciclos 2-4

- Para cada uno de estos ciclos, el pellet seco del ciclo previo se disolvió en agua y se determinó la concentración de biblioteca por espectrofotometría basada en el coeficiente de extinción del componente de ADN de la biblioteca, donde el coeficiente de extinción inicial del Compuesto 2 es 131,500 L/(mol.cm). La concentración de la biblioteca se ajustó con agua de modo que la concentración final de las reacciones de ligamiento posterior fue 0,25 mM. La biblioteca posteriormente se dividió en 96 alícuotas iguales de una placa de 96 pocillos. A cada pocillo se añadió una solución que comprende una marca diferente (la relación molar de la biblioteca a marca fue 1:2), y se realizaron los ligamientos como se describió en el Ciclo 1. Las marcas de oligonucleótidos usadas en los Ciclos 2, 3 y 4 se exponen en las tablas 4, 5 y 6, respectivamente. La correspondencia entre las marcas y los precursores del bloque de construcción para cada uno de los Ciclos 1 a 4 se proporciona en la Tabla 7. La biblioteca se precipitó por la adición de etanol como se describió antes para el Ciclo 1, y se disolvió en el buffer de borato de sodio (150 mM, pH 9,4) a una concentración de 1 mM. Se realizaron las subsiguientes acilaciones y purificaciones como se describió para el Ciclo 1, excepto que se omitió la purificación por HPLC durante el Ciclo 3.

- Los productos del Ciclo 4 se ligaron con el cebador de cierre mostrado a continuación, por medio el procedimiento descrito anterior para el ligamiento de las marcas.

5' PO3-CAG AAG ACA GAC AAG CTT CAC CTG C (SEQ ID NO: 889) 5'-PO3-GCA GGT GAA GCT TGT CTG TCT TCT GAA (SEQ ID NO : 890)

Resultados:

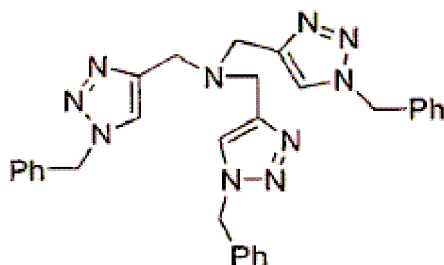
- 55 El procedimiento de síntesis descrito antes tiene la capacidad de producir una biblioteca que comprende 964 (aproximadamente 108) estructuras diferentes. La síntesis de la biblioteca se controló por medio de electroforesis en gel y LC/MS del producto de cada ciclo. Después de la finalización, la biblioteca se analizó por medio de varias

técnicas. La Figura 13a es un cromatograma de la biblioteca después del Ciclo 4, pero antes del ligamiento del cebador de cierre; La Figura 13b es un espectro de masa de la biblioteca en misma etapa de síntesis. El peso molecular promedio se determinó por análisis de ion negativo LC/NIS. La señal iónica se diluyó por medio del software ProMass. Este resultado es compatible con la masa promedio predicha de la biblioteca.

- 5 El componente de ADN de la biblioteca se analizó por electroforesis en gel, que mostró que la mayor parte del material de biblioteca corresponde al producto ligado del tamaño correcto. El análisis de secuencia de ADN de los clones moleculares del producto de PCR derivado de un muestreo de la biblioteca muestra el ligamiento de ADN ocurrido con alta fidelidad y a casi finalización.

Ciclación de la biblioteca

- 10 En la terminación del Ciclo 4, una porción de la biblioteca se terminó en el extremo N-terminal por medio de ácido azidoacético en las condiciones de acilación usuales. El producto, después de la purificación por precipitación con EtOH, se disolvió en buffer de fosfato de sodio (150 mM, pH 8) a una concentración de 1 mM y 4 equivalentes de CuSO₄ en agua (200 mM), ácido ascórbico en agua (200 mM), y se añadió una cantidad catalítica del compuesto que se muestra a continuación como una solución en DMF (200 mM). La mezcla de reacción posteriormente se agitó suavemente durante 2 horas a temperatura ambiente.

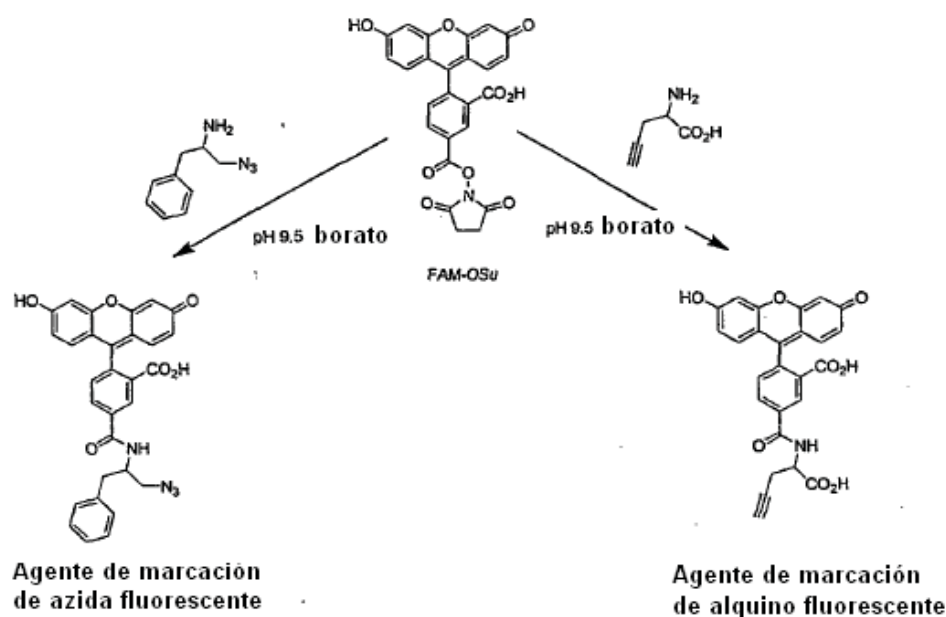


- 20 Para medir el grado de ciclación, se extrajeron alícuotas de 5 μ L de la reacción de ciclación de la biblioteca y se trataron con una azida o alquino marcado con fluorescencia (1 μ L de patrones de DMF 100 mM) preparada como se describió en el Ejemplo 4. Después de 16 horas, ni las marcas de alquino o azida se incorporaron en la biblioteca por análisis HPLC a 500 nm. Este resultado indicó que la biblioteca ya no contenía grupos azida o alquino capaces de cicloadición y que la biblioteca por ende debe haber reaccionado con sí misma, a través de reacciones de ciclación o intermoleculares. La biblioteca ciclada se purificó por HPLC en fase inversa como se describió previamente. Los experimentos de control por medio de la biblioteca no ciclada mostraron la incorporación completa de las marcas fluorescentes mencionadas anteriormente.

- 25 Ejemplo 4: Preparación de marcas fluorescentes para el ensayo de ciclación:

En tubos separados, propargil glicina o 2-amino-3-fenilpropilazida (8 μ mol cada uno) se combinaron con FAM-OSu (Molecular Probes Inc.) (1,2 equiv.) en buffer borato pH 9,4 (250 μ L). Las reacciones se dejaron proceder durante 3 h a temperatura ambiente, y posteriormente se liofilizaron toda la noche. La purificación por HPLC proporcionó alquino y azida fluorescentes deseados en rendimiento cuantitativo.

30

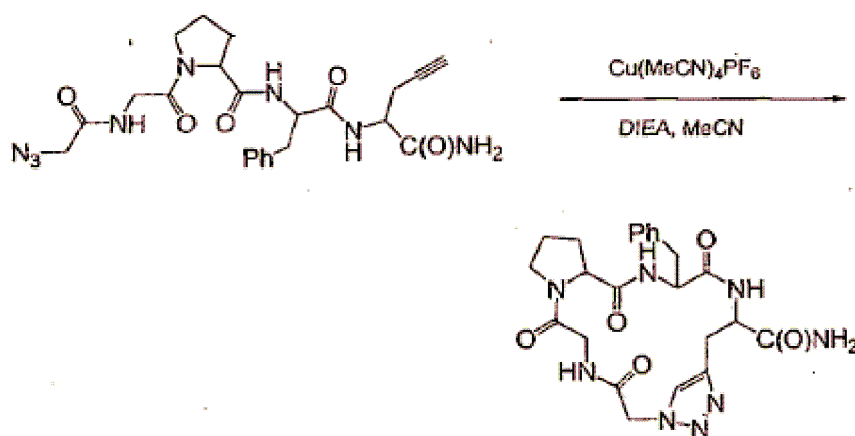


Ejemplo 5: Ciclación de compuestos individuales por medio la reacción de cicloadición de azida/alquino

Preparación de azidoacetil-Gly-Pro-Phe-Pra-NH₂:

5 Por medio de 0,3 mmol de resina Rink-amida, la secuencia indicada se sintetizó por medio de técnicas de síntesis en fase sólida estándares con aminoácidos protegidos con Fmoc y HATU como agente de activación (Pra = C-propargilglicina). Se usó ácido azidoacético para terminar el tetrapéptido. El péptido se escindió de la resina con 20% de TFA/DCM durante 4 h. La purificación por RP HPLC proporcionó el producto como un sólido blanco (75 mg, 51%). ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): 8,4 - 7,8 (m, 3H), 7,4 - 7,1 (m, 7 H), 4,6 - 4,4 (m, 1H), 4,4 - 4,2 (m, 2H), 4,0 - 3,9 (m, 2H), 3,74 (dd, 1H, J = 6 Hz, 17 Hz), 3,5 - 3,3 (m, 2H), 3,07 (dt, 1H, J = 5 Hz, 14 Hz), 2,92 (dd, 1H, J = 5 Hz, 16 Hz), 2,86 (t, 1H, J = 2 Hz), 2,85 - 2,75 (m, 1H), 2,6 - 2,4 (m, 2H), 2,2 - 1,6 (m, 4H). IR (mull) 2900, 2100, 1450, 1300 cm⁻¹. ESIMS 497,4 ([M+H], 100%), 993,4 ([2M+H], 50%). ESIMS con ion-source fragmentación: 519,3 ([M+Na], 100%), 491,3 (100%), 480,1 ([M-NH₂], 90%), 452,2 ([M-NH₂-CO], 20%), 424,2 (20%), 385,1 ([M-Pra], 50%), 357,1 ([MPra-CO], 40%), 238,0 ([M-Pra-Phe], 100%).

15 Ciclación de Azidoacetil-Gly-Pro-Phe-Pra-NH₂:



20 El péptido azidoacetilo (31 mg, 0,62 mmol) se disolvió en MeCN (30 mL). Se añadieron diisopropiletilamina (DIEA, 1 mL) y Cu(MeCN)₄PF₆ (1 mg). Después de la agitación durante 1,5 h, la solución se evaporó y el residuo resultante se tomó en 20% de MeCN/H₂O. Después de la centrifugación para extraer sales insolubles, la solución se sometió a HPLC de fase inversa preparativa. El péptido cíclico deseado se aisló como un sólido blanco (10 mg, 32%). ¹H RMN

(DMSO-d₆, 400 MHz): 8,28 (t, 1H, J = 5 Hz), 7,77 (s, 1H), 7,2 - 6,9 (m, 9H), 4,98 (m, 2H), 4,48 (m, 1H), 4,28 (m, 1H), 4,1-3,9 (m, 2H), 3,63 (dd, 1H, J = 5 Hz, 16 Hz), 3,33 (m, 2H), 3,0 (m, 3H), 2,48 (dd, 1H, J = 11 Hz, 14 Hz), 1,75 (m, 1H), 1,55 (m, 1H), 1,32 (m, 1H), 1,05 (m, 1H). IR (mull) 2900, 1475, 1400 cm⁻¹. ESIMS 497,2 ([M+H], 100%), 993,2 ([2M+11], 30%), 1015,2 ([2M+Na], 15%). ESIMS con ion-source fragmentación: 535,2 (70%), 519,3 ([M+Na], 100%), 497,2 ([M+H], 80%), 480,1 ([M-NH₂], 30%), 452,2 ([M-NH₂-CO], 40%), 208,1 (60%).

Preparación de azidoacetil-Gly-Pro-Phe-Pra-Gly-OH:

Por medio de 0,3 mmol de resina de Glicina-Wang, la secuencia indicada se sintetizó por medio de aminoácidos protegidos con Fmoc y HATU como el agente de activación.

Se usó ácido azidoacético en la última etapa de acoplamiento para terminar el pentapéptido. La escisión del péptido se obtuvo por medio de 50% de TFA/DCM durante 2 h. La purificación por RP HPLC proporcionó el péptido como un sólido blanco (83 mg; 50%). ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): 8,4 - 7,9 (m, 4H), 7,2 (m, 5H), 4,7 - 4,2 (m, 3H), 4,0 - 3,7 (m, 4H), 3,5 - 3,3 (m, 2H), 3,1 (m, 1H), 2,91 (dd, 1H, J = 4 Hz, 16 Hz), 2,84 (t, 1H, J = 2,5 Hz), 2,78 (m, 1H), 2,6 - 2,4 (m, 2H), 2,2 - 1,6 (m, 4H). IR (mull) 2900, 2100, 1450, 1350 cm⁻¹. ESIMS 555,3 ([M+H], 100%). ESIMS con fragmentación de la fuente iónica: 577,1 ([M+Na], 90%), 555,3 ([M+H], 80%), 480,1 ([M-Gly], 100%), 385,1 ([M-Gly-Pra], 70%), 357,1 ([M-Gly-Pra-CO], 40%), 238,0 ([M-Gly-Pra-Phe], 80%).

Ciclación de azidoacetil-Gly-Pro-Phe-Pra-Gly-OH:

El péptido (32 mg, 0,058 mmol) se disolvió en MeCN (60 mL). Se añadieron diisopropiletilamina (1 mL) y Cu(MeCN)₄PF₆ (1 mg) y la solución se agitó durante 2 h. El disolvente se evaporó y el producto bruto se sometió a RP HPLC para eliminar dímeros y trímeros. El monómero cíclico se aisló como un cristal incoloro (6 mg, 20%). ESIMS 555,6 ([M+H], 100%), 1109,3 ([2M+H], 20%), 1131,2 ([2M+Na], 15%).

ESIMS con fragmentación de la fuente iónica: 555,3 ([M+H], 100%), 480,4 ([M-Gly], 30%), 452,2 ([M-Gly-CO], 25%), 424,5 ([M-Gly-2CO], 10%, solo posible en una estructura cíclica).

Conjugación de péptido lineal al ADN:

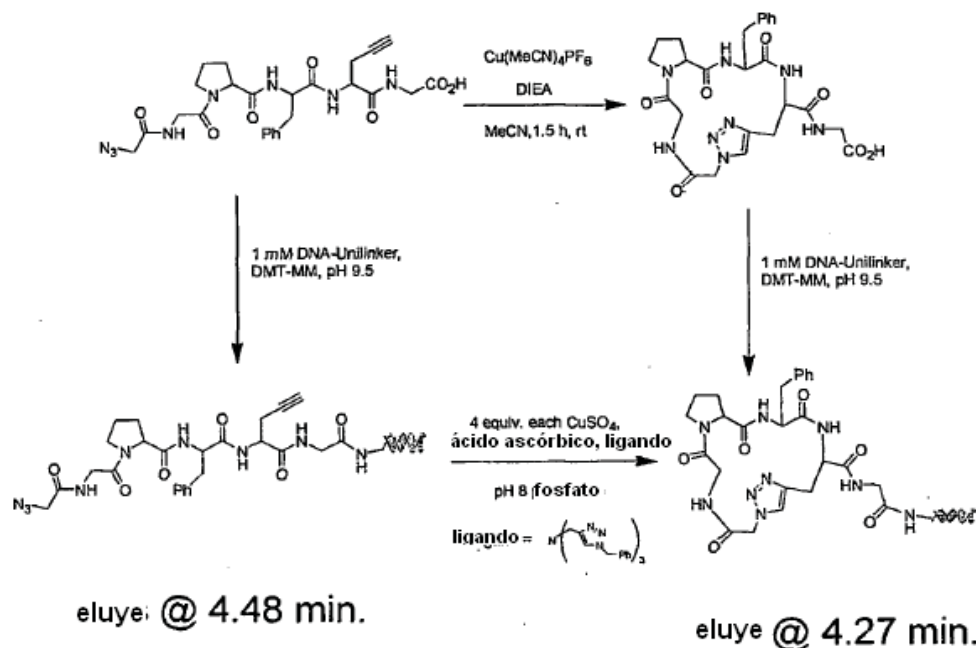
El compuesto 2 (45 nmol) se disolvió en 45 µL de buffer de borato de sodio (pH 9,4; 150 mM). A 4° C, se añadió péptido lineal (18 µL de un patrón de 100 mM en DMF; 180 nmol; 40 equiv.), seguido por DMT-MM (3,6 µL de un patrón de 500 mM en agua; 180 nmol; 40 equiv.). Después de agitar durante 2 horas, LCMS mostró reacción completa, y el producto se aisló por precipitación con etanol. ESIMS 1823,0 ([M-3H]/3, 20%), 1367,2 ([M-4H]/4, 20%), 1093,7 ([M-5H]/5, 40%), 911,4 ([M-6H]/6, 100%).

Conjugación del péptido cíclico al ADN:

El Compuesto 2 (20 nmol) se disolvió en 20 µL de buffer de borato de sodio (pH 9,4, 150 mM). A 4° C, se añadió péptido lineal (8 µL de un patrón de 100 mM DMF; 80 nmol; 40 equiv.), seguido por DMT-MM (1,6 µL de un patrón de 500 mM en agua; 80 nmol; 40 equiv.). Después de agitar durante 2 h, LCMS mostró reacción completa, y el producto se aisló por precipitación con etanol. ESIMS 1823,0 ([M-3H]/3, 20%), 1367,2 ([M-4H]/4, 20%), 1093,7 ([M-5H]/5, 40%), 911,4 ([M-6H]/6, 100%).

Ciclación del péptido ligado a ADN:

El conjugado del péptido lineal-ADN (10 nmol) se disolvió en buffer de fosfato de sodio pH 8 (10 µL, 150 mM). A temperatura ambiente, 4 equivalentes de CuSO₄, ácido ascórbico, y el ligando Sharpless se añadieron (0,2 µL de patrones de 200 mM). La reacción se dejó proceder durante la noche. RP HPLC mostró que el péptido lineal-ADN no estuvo presente y que el producto co-eluyó con el péptido cíclico-ADN auténtico. No se observaron trazas de dímeros u otros oligómeros.



Condiciones LC: Targa C18, 2,1 x 40 mm, 10-40% de MeCN en 40 mM de agua. TEAA durante 8 min.

Ejemplo 6: Aplicación de reacciones de sustitución nucleófila aromática a la síntesis del resto funcional

Procedimiento general para la arilación de Compuesto 3 con cloruro cianúrico:

- 5 El Compuesto 2 se disuelve en buffer de borato de sodio pH 9,4 a una concentración de 1 mM. La solución se enfría a 4°C y 20 equivalentes de cloruro cianúrico se añade posteriormente como una solución 500 mM en MeCN. Después de 2 horas, la reacción completa se confirma por LCMS y el conjugado de diclorotriazina-ADN resultante se aísla por precipitación con etanol.

Procedimiento para sustitución de amina de diclorotriazina-ADN:

- 10 El conjugado diclorotriazina-ADN se disuelve en buffer borato pH 9,5 a una concentración de 1 mM. A temperatura ambiente, 40 equivalentes de una amina alifática se añaden como una solución de DMF. La reacción es seguida por LCMS y está usualmente completa después de 2 h. El conjugado resultante de alquilamino-monoclorotriazina-ADN se aísla por precipitación con etanol.

Procedimiento para substitución de amina de monoclorotriazina-ADN:

- 15 El conjugado alquilamino-monoclorotriazina-ADN se disuelve en buffer borato pH 9,5 a una concentración de 1 mM. A 42°C, 40 equivalentes de una segunda amina alifática se añaden como una solución de DMF. La reacción es seguida por LCMS y está usualmente completa después de 2 h. El conjugado resultante de diaminotriazina-ADN se aísla por precipitación con etanol.

Ejemplo 7: Aplicación de reacciones de aminación reductora en la síntesis del resto funcional

- 20 Procedimiento general para aminación reductora de un ligador de ADN que contiene una amina secundaria con un bloque de construcción de aldehído:

El Compuesto 2 se acopló a un residuo de prolina N-terminal. El compuesto resultante se disolvió en buffer de fosfato de sodio (50 μ L, 150 mM, pH 5,5) a una concentración de 1 mM. A esta solución se añadieron 40 equivalentes de un bloque de construcción de aldehído en DMF (8 μ L, 0,25M) y cianoborohidruro de sodio en DMF (8 μ L, 0,25M) y la solución se calentó a 80°C durante 2 horas. Después de la alquilación, la solución se purificó por precipitación con etanol.

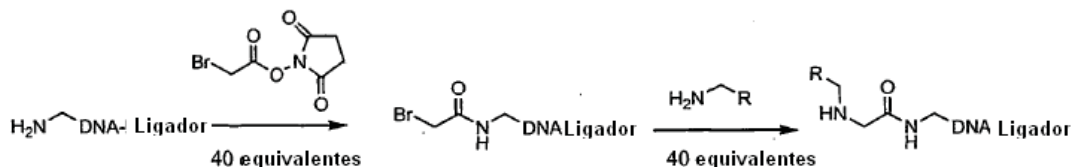
Procedimiento general para afinaciones reductoras del ADN-ligador que contiene un aldehído con bloques de construcción de amina:

El compuesto 2 acoplado a un bloque de construcción que comprende un grupo aldehído se disolvió en buffer de

fosfato de sodio (50 μ L, 250 mM, pH 5,5) a una concentración de 1 mM. A esta solución se añadieron 40 equivalentes de un bloque de construcción de amina en DMF (8 μ L, 0,25 M) y cianoborohidruro de sodio en DMF (8 μ L, 0,25 M) y la solución se calentó a 80°C durante 2 horas. Después de la alquilación, la solución se purificó por precipitación con etanol.

5 Ejemplo 8: Aplicación de reacciones de construcción de peptido en la síntesis del resto funcional

Procedimiento general para síntesis de peptido en el ADN-ligador:



EI

10 compuesto 2 se disolvió en buffer de borato de sodio (50 μ L, 150 mM, pH 9,4) a una concentración de 1 mM y se enfrió a 4°C. A esta solución se añadieron 40 equivalentes de bromoacetato de N-hidroxisuccinimido en DMF (13 μ L, 0,15 M) y la solución se agitó suavemente a 4°C durante 2 horas. Después de la acilación, el ADN-Ligador se purificó por precipitación con etanol y se redisolvió en buffer de borato de sodio (50 μ L, 150 mM, pH 9,4) a una concentración de 1 mM y se enfrió a 4°C. A esta solución se añadieron 40 equivalentes de un bloque de construcción de amina en DMF (13 μ L, 0,15 M) y la solución se agitó suavemente a 4°C durante 16 horas. Después de la alquilación, el ADN-ligador se purificó por precipitación con etanol y se redisolvió en buffer de borato de sodio (50 μ L, 150 mM, pH 9,4) a una concentración de 1 mM y se enfrió a 4°C. La síntesis de peptido continuó por la adición escalonada de bromoacetato de N-hidroxisuccinimido seguido por la adición de un bloque de construcción de amina.

Ejemplo 9: Aplicación de la reacción de cicloadición de azida-alquino a la síntesis del resto funcional

Procedimiento general

20 Un conjugado que contiene alquino se disuelve en buffer fosfato pH 8,0 a una concentración de aprox 1 mM. A esta mezcla se añaden 10 equivalentes de una azida orgánica y 5 equivalentes de sulfato de cobre (II), ácido ascórbico, y el ligando de (tris-((1-benciltriazol-4-il)metil)amina a temperatura ambiente. La reacción es seguida por LCMS, y usualmente se completa después de 1 - 2 h. El conjugado de triazol-ADN resultante se puede aislar por precipitación con etanol.

25 Ejemplo 10 Identificación de un ligando para Ab1 quinasa de una biblioteca codificada

La capacidad para enriquecer moléculas de interés en un ADN-biblioteca codificada por encima de los miembros de biblioteca no deseables es gran importancia para identificar compuestos únicos con propiedades definidas contra blancos terapéuticos de interés. Para demostrar esta capacidad de enriquecimiento se sintetizó una molécula de unión conocida (descrita por Shah et al., Science 305, 399-401 (2004), incorporada en la presente memoria por referencia) a rhAbl quinasa (GenBank U07563). Este compuesto se unió a un oligonucleótido de ADN bicatenario por medio del ligador descrito en los ejemplos precedentes por medio de procedimientos químicos estándares para producir una molécula similar (resto funcional ligado a un oligonucleótido) a las producidas por medio de los procedimientos descritos en los Ejemplos 1 y 2. Una biblioteca generalmente producida como se describe en el Ejemplo 2 y el ADN-ligado al agente de unión de Abl-quinasa se diseñaron con secuencias únicas de ADN que permitieron el análisis qPCR de ambas especies. El ADN-ligado al agente de unión de Abl-quinasa se mezcló con la biblioteca en una relación de 1:1000. Esta mezcla se equilibró con la rhAbl quinasa, y la enzima fue capturada en una fase sólida, se lavó para eliminar los miembros de la biblioteca de no unión y se eluyeron las moléculas de unión. La relación de las moléculas de la biblioteca al ADN-ligado al inhibidor de Abl quinasa en el eluato fue 1:1, lo que indica un enriquecimiento mayor de 500 veces del ADN-ligado al agente de unión de Abl-quinasa en un exceso de 1000 veces de las moléculas de la biblioteca.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Praecis Pharmaceuticals, Inc.	
5	<120> MÉTODOS PARA LA SÍNTESIS DE GENOTECAS CODIFICADAS	
	<130> PPI-156CPPC	
	<150> 11/015458	
10	<151> 2004-12-17	
	<150> 60/530854	
	<151> 2003-12-17	
15	<150> 60/540681	
	<151> 2004-01-30	
	<150> 60/553715	
20	<151> 2004-03-15	
	<150> 60/588672	
	<151> 2004-07-16	
	<150> 60/689466	
25	<151> 2005-06-09	
	<150> 60/731041	
	<151> 2005-10-28	
30	<160> 890	
	<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0	
	<210> 1	
35	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
40	<223> constructo sintético	
	<400> 1	
	gcaacgaag	9
45	<210> 2	
	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> constructo sintético	
	<400> 2	
	tcgttgcca	9
55	<210> 3	
	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> constructo sintético	
	<400> 3	
65	gcgtacaag	9

5 <210> 4
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 4
 tgtacgcca 9
 <210> 5
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 5
 gctctgtag 9
 <210> 6
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 6
 acagagcca 9
 <210> 7
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 7
 gtgcatag 9
 45 <210> 8
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 8
 atggcacca 9
 55 <210> 9
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 9
 65 gttgaccag 9

5 <210> 10
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 10
 ggtcaacca 9
 <210> 11
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 11
 cgactgac 9
 <210> 12
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 12
 acgctgaac 9
 <210> 13
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 13
 cgtagtcag 9
 45 <210> 14
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 14
 gactacgca 9
 55 <210> 15
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 15
 65 ccagcatag 9

5 <210> 16
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 16
 atgctggca 9
 <210> 17
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 17
 cctacagag 9
 <210> 18
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 18
 ctgtaggca 9
 <210> 19
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 19
 ctgaacgag 9
 45 <210> 20
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 20
 acgacttgc 9
 55 <210> 21
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 21
 65 ctccagtag 9

5 <210> 22
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 22
 actggagca 9
 <210> 23
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 23
 taggtccag 9
 <210> 24
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 24
 ggacctaca 9
 <210> 25
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 25
 gcgtgtgt 9
 45 <210> 26
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 26
 aacacgcct 9
 55 <210> 27
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 27
 65 gcttggagt 9

5 <210> 28
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 28
 tccaagcct 9
 <210> 29
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 29
 gtcaagcgt 9
 <210> 30
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 30
 gcttgacct 9
 <210> 31
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 31
 caagagcgt 9
 45 <210> 32
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 32
 gctcttgct 9
 55 <210> 33
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 33
 65 cagttcggt 9

<210> 34
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 10
 <400> 34
 cgaactgct 9
 <210> 35
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 35
 cgaaggagt 9
 <210> 36
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 36
 tccttcgct 9
 <210> 37
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 37
 cggtgtgt 9
 45 <210> 38
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 38
 aacaccgct 9
 55 <210> 39
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 39
 65 cggtgctgt 9

5 <210> 40
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 40
 agcaacgct 9
 <210> 41
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 41
 ccgatctgt 9
 <210> 42
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 42
 agatcggct 9
 <210> 43
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 43
 ccttctcgt 9
 45 <210> 44
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 44
 55 gagaaggct 9
 <210> 45
 <211> 9
 <212> DNA
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 65 <400> 45
 tgagtccgt 9

5 <210> 46
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 46
 ggactcact 9
 <210> 47
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 47
 tgctacggt 9
 <210> 48
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 48
 cgtagact 9
 <210> 49
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 49
 gtgcgttga 9
 45 <210> 50
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 50
 aacgcacac 9
 55 <210> 51
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 51
 65 gttgcaga 9

5 <210> 52
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 52
 tgccaacac 9
 <210> 53
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 53
 cctgtagga 9
 <210> 54
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 54
 ctacaggac 9
 <210> 55
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 55
 ctgcgtaga 9
 45 <210> 56
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 56
 tacgcagac 9
 55 <210> 57
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 57
 65 cttacgcga 9

5 <210> 58
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 58
 gcgtaagac 9
 <210> 59
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 59
 tggtcacga 9
 <210> 60
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 60
 gtgaccaac 9
 <210> 61
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 61
 tcagagcga 9
 45 <210> 62
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 62
 gctctgaac 9
 55 <210> 63
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 63
 65 ttgctcga 9

5 <210> 64
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 64
 cgagcaaac 9
 <210> 65
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 65
 gcagttgga 9
 <210> 66
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 66
 caactgcac 9
 <210> 67
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 67
 gcctgaaga 9
 45 <210> 68
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 68
 ttcaggcac 9
 55 <210> 69
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 69
 65 gtagccaga 9

5 <210> 70
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 70
 tggctacac 9
 <210> 71
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 71
 gtcgcttga 9
 <210> 72
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 72
 aagcgacac 9
 <210> 73
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 73
 gcctaagtt 9
 45 <210> 74
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 74
 cttaggctc 9
 55 <210> 75
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 75
 65 gtagtgctt 9

5 <210> 76
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 76
 gcactactc 9
 <210> 77
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 77
 gtcgaagtt 9
 <210> 78
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 78
 cttcgactc 9
 <210> 79
 <211> 9.
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 79
 gtttcggtt 9
 45 <210> 80
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 80
 ccgaaactc 9
 55 <210> 81
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 81
 65 cagcgtttt 9

<210> 82
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 10
 <400> 82
 aacgctgtc 9
 <210> 83
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 83
 catacgctt 9
 <210> 84
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 84
 gcgtatgtc 9
 <210> 85
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 85
 cgatctgtt 9
 45 <210> 86
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 86
 cagatcgtc 9
 55 <210> 87
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 87
 65 cgctttgtt 9

5 <210> 88
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 88
 caaagcgtc 9
 <210> 89
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 89
 ccacagttt 9
 <210> 90
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 90
 actgtggtc 9
 <210> 91
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 91
 cctgaagtt 9
 45 <210> 92
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 92
 cttcaggtc 9
 55 <210> 93
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 93
 65 ctgacgatt 9

5 <210> 94
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 94
 tcgtcagtc 9
 <210> 95
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 95
 ctccacttt 9
 <210> 96
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 96
 agtggagtc 9
 <210> 97
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 97
 accagagcc 9
 45 <210> 98
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 98
 ctctggtaa 9
 55 <210> 99
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 99
 65 atccgcacc 9

5 <210> 100
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 100
 tgcggataa 9
 <210> 101
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 101
 gacgacacc 9
 <210> 102
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 102
 tgtcgtcaa 9
 <210> 103
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 103
 ggatggacc 9
 45 <210> 104
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 104
 tccatccaa 9
 55 <210> 105
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 105
 65 gcagaagcc 9

5 <210> 106
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 106
 cttctgcaa 9
 <210> 107
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 107
 gccatgtcc 9
 <210> 108
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 108
 acatggcaa 9
 <210> 109
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 109
 gtctgctcc 9
 45 <210> 110
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 110
 agcagacaa 9
 55 <210> 111
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 111
 65 cgacagacc 9

5 <210> 112
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 112
 tctgtcgaa 9
 <210> 113
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 113
 cgctactcc 9
 <210> 114
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 114
 agtagcgaa 9
 <210> 115
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 115
 ccacagacc 9
 45 <210> 116
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 116
 55 tctgtggaa 9
 <210> 117
 <211> 9
 <212> DNA
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 65 <400> 117
 cctctctcc 9

5 <210> 118
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 118
 agagaggaa 9
 <210> 119
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 119
 ctcgtagcc 9
 <210> 120
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 120
 ctacgagaa- 9
 <210> 121
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 121
 aaatcgatgt ggtcactcag 20
 45 <210> 122
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 122
 gagtgaccac atcgatttg 20
 55 <210> 123
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 123
 65 aaatcgatgt ggactaggag 20

<210> 124
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 124
 10 cctagtccac atcgattgg 20
 <210> 125
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 125
 aaatcgatgt gccgatgag 20
 <210> 126
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 126
 catacggcac atcgattgg 20
 <210> 127
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 127
 aaatcgatgt gctgaaggag 20
 45 <210> 128
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 128
 55 ccttcagcac atcgattgg 20
 <210> 129
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 129
 65 aaatcgatgt ggactagcag 20

5 <210> 130
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 130
 gctagtccac atcgattgg 20
 <210> 131
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 131
 aaatcgatgt gcgctaagag 20
 <210> 132
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 132
 cttagcgcad atcgattgg 20
 <210> 133
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 133
 aaatcgatgt gagccgagag 20
 45 <210> 134
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 134
 ctcggctcac atcgattgg 20
 55 <210> 135
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 135
 65 aaatcgatgt gccgtatcag 20

<210> 136
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 136
 10 gatacggcac atcgattgg 20
 <210> 137
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 137
 aaatcgatgt gctgaagcac 20
 <210> 138
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 138
 gcttcagcac atcgattgg 20
 <210> 139
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 139
 aaatcgatgt gtgcgagtag 20
 45 <210> 140
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 140
 55 actcgacac atcgattgg 20
 <210> 141
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 141
 65 aaatcgatgt gttggcgag 20

<210> 142
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 142
 10 cgccaaacac atcgatttg 20
 <210> 143
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 143
 aaatcgatgt gcgctaacag 20
 <210> 144
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 144
 gttagcgcac atcgatttg 20
 <210> 145
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 145
 aaatcgatgt gagccgacag 20
 45 <210> 146
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 146
 gtcggctcac atcgatttg 20
 55 <210> 147
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 147
 65 aaatcgatgt gagccgaaag 20

<210> 148
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 148
 10 ttcggctcac atcgatttgg 20
 <210> 149
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 149
 aaatcgatgt gtcggttagag 20
 <210> 150
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 150
 ctaccgacac atcgatttgg 20
 <210> 151
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 151
 aaatcgatgt ggttgccgag 20
 45 <210> 152
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 152
 55 cggcaaccac atcgatttgg 20
 <210> 153
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 153
 65 aaatcgatgt gtagtcgtag 20

<210> 154
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 154
 10 acgcactcac atcgatttg 20
 <210> 155
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 155
 aaatcgatgt ggttgccaag 20
 <210> 156
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 156
 tggcaaccac atcgatttg 20
 <210> 157
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 157
 aaatcgatgt gtgcgaggag 20
 45 <210> 158
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 158
 55 cctcgcacac atcgatttg 20
 <210> 159
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 159
 65 aaatcgatgt ggaacacgag 20

<210> 160
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 160
 10 cgtgtccac atcgattgg 20
 <210> 161
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 161
 aaatcgatgt gctgtcgag 20
 <210> 162
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 162
 cgacaagcac atcgattgg 20
 <210> 163
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 163
 aaatcgatgt gttccggtag 20
 45 <210> 164
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 164
 accggaacac atcgattgg 20
 55 <210> 165
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 165
 65 aaatcgatgt gtgcgagcag 20

5 <210> 166
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 166
 gctcgcacac atcgattgg 20
 <210> 167
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 167
 aaatcgatgt ggtcaggtag 20
 <210> 168
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 168
 acctgaccac atcgattgg 20
 <210> 169
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 169
 aaatcgatgt ggcctgtag 20
 45 <210> 170
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 170
 aacaggccac atcgattgg 20
 55 <210> 171
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 171
 65 aaatcgatgt ggaacaccag 20

5 <210> 172
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 172
 ggtgtccac atcgattgg 20
 <210> 173
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 173
 aaatcgatgt gctgtccag 20
 <210> 174
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 174
 ggacaagcac atcgattgg 20
 <210> 175
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 175
 aaatcgatgt gtgcgagaag 20
 45 <210> 176
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 176
 55 tctcgacac atcgattgg 20
 <210> 177
 <211> 20
 <212> DNA
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 177
 65 aaatcgatgt gagtgcggag 20

<210> 178
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 178
 10 ccgcactcac atcgatttg 20
 <210> 179
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 179
 aaatcgatgt gttgtccgag 20
 <210> 180
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 180
 cggacaacac atcgatttg 20
 <210> 181
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 181
 aaatcgatgt gtggaacgag 20
 45 <210> 182
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 182 20
 55 cgttcacac atcgatttg 20
 <210> 183
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 183 20
 65 aaatcgatgt gtagtgcgaag 20

<210> 184
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 184
 10 tcgcactcac atcgatttgg 20
 <210> 185
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 185
 aaatcgatgt gtgaaccag 20
 <210> 186
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 186
 ggtccacac atcgatttgg 20
 <210> 187
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 187
 aaatcgatgt gtaggcgag 20
 45 <210> 188
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 188
 55 cgcctaacac atcgatttgg 20
 <210> 189
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 189
 65 aaatcgatgt ggcctgtgag 20

<210> 190
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 190
 10 cacagggcac atcgatttg 20
 <210> 191
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 191
 aaatcgatgt gtcctgtag 20
 <210> 192
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 192
 acaggagcac atcgatttg 20
 <210> 193
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 193
 aaatcgatgt ggtaggcag 20
 45 <210> 194
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 194
 55 gctgaccac atcgatttg 20
 <210> 195
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 195
 65 aaatcgatgt ggtaggaag 20

<210> 196
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 196
 10 tcctgaccac atcgatttgg 20
 <210> 197
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 197
 aaatcgatgt ggtagccgag 20
 <210> 198
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 198
 cggctaccac atcgatttgg 20
 <210> 199
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 199
 aaatcgatgt ggcctgtaag 20
 45 <210> 200
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 200
 55 tacaggccac atcgatttgg 20
 <210> 201
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 201
 65 aaatcgatgt gcttcggag 20

<210> 202
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 202
 10 ccgaaagcac atcgatttg 20
 <210> 203
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 203
 aaatcgatgt gcgtaaggag 20
 <210> 204
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 204
 ccttacgcac atcgatttg 20
 <210> 205
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 205
 aaatcgatgt gagagcgtag 20
 45 <210> 206
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 206
 55 acgctctcac atcgatttg 20
 <210> 207
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 207
 65 aaatcgatgt ggacggcaag 20

5 <210> 208
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 208
 tgccgtccac atcgattgg 20
 <210> 209
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 209
 aaatcgatgt gcttcgcag 20
 <210> 210
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 210
 gcgaaagcac atcgattgg 20
 <210> 211
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 211
 aaatcgatgt gcgtaagcag 20
 45 <210> 212
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 212
 gcttacgcac atcgattgg 20
 55 <210> 213
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 213
 65 aaatcgatgt ggctatggag 20

<210> 214
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 214
 10 ccatagccac atcgattgg 20
 <210> 215
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 215
 aaatcgatgt gactctggag 20
 <210> 216
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 216
 ccagagtcac atcgattgg 20
 <210> 217
 <211> 19
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 217
 aaatcgatgt gctggaaag 19
 45 <210> 218
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 218
 55 ttccagcaca tcgattgg 19
 <210> 219
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 219
 65 aaatcgatgt gccgaagtag 20

<210> 220
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 220
 10 acttcggcac atcgattgg 20
 <210> 221
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 221
 aaatcgatgt gtcctgaag 20
 <210> 222
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 222
 tcaggagcac atcgattgg 20
 <210> 223
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 223
 aaatcgatgt gtccagtcag 20
 45 <210> 224
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 224
 55 gactggacac atcgattgg 20
 <210> 225
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 225
 65 aaatcgatgt gagacggag 20

<210> 226
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 226
 10 ccgctctcac atcgatttg 20
 <210> 227
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 227
 aaatcgatgt gagagcgaag 20
 <210> 228
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 228
 tcgctctcac atcgatttg 20
 <210> 229
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 229
 aaatcgatgt gccgaaggag 20
 45 <210> 230
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 230
 55 ccttcggcac atcgatttg 20
 <210> 231
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 231
 65 aaatcgatgt gccgaagcag 20

<210> 232
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 232
 10 gcttcggcac atcgattgg 20
 <210> 233
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 233
 aaatcgatgt gtgtccgag 20
 <210> 234
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 234
 cggaacacac atcgattgg 20
 <210> 235
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 235
 aaatcgatgt gtctggcgag 20
 45 <210> 236
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 236
 cgccagacac atcgattgg 20
 55 <210> 237
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 237
 65 aaatcgatgt gctatcgag 20

<210> 238
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 238
 10 ccgatagcac atcgattgg 20
 <210> 239
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 239
 aaatcgatgt gcgaaaggag 20
 <210> 240
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 240
 ccttcgcac atcgattgg 20
 <210> 241
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 241
 aaatcgatgt gccgaagaag 20
 45 <210> 242
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 242
 55 tcttcgcac atcgattgg 20
 <210> 243
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 243
 65 aaatcgatgt gggtgcagag 20

<210> 244
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 244
 10 ctgcaaccac atcgattgg 20
 <210> 245
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 245
 aaatcgatgt ggatggtgag 20
 <210> 246
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 246
 caccatccac atcgattgg 20
 <210> 247
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 247
 aaatcgatgt gctatcgag 20
 45 <210> 248
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 248
 55 gcgatagcac atcgattgg 20
 <210> 249
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 249
 65 aaatcgatgt gcgaaagcag 20

<210> 250
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 250
 10 gcttcgcac atcgatttg 20
 <210> 251
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 251
 aaatcgatgt gacactggag 20
 <210> 252
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 252
 ccagtgac atcgatttg 20
 <210> 253
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 253
 aaatcgatgt gtctggcaag 20
 45 <210> 254
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 254
 55 tgccagacac atcgatttg 20
 <210> 255
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 255
 65 ggatggtcag 20

<210> 256
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 256
 10 gaccatccac atcgatttg 20
 <210> 257
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 257
 aaatcgatgt ggtgcacag 20
 <210> 258
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 258
 gtgcaaccac atcgatttg 20
 <210> 259
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 259
 aaatcgatgt gggcatcgag 20
 45 <210> 260
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 260
 55 cgatgccccca tccgatttg 20
 <210> 261
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 261
 65 aaatcgatgt gtgcctccag 20

<210> 262
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 262
 10 ggaggcacac atcgatttg 20
 <210> 263
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 263
 aaatcgatgt gtcctcaag 20
 <210> 264
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 264
 tgaggcacac atcgatttg 20
 <210> 265
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 265
 aaatcgatgt gggcatccag 20
 45 <210> 266
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 266
 55 ggatgccac atcgatttg 20
 <210> 267
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 267
 65 aaatcgatgt gggcatcaag 20

<210> 268
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 268
 10 tgatgccac atcgattgg 20
 <210> 269
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 269
 aaatcgatgt gcctgtcag 20
 <210> 270
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 270
 cgacaggcac atcgattgg 20
 <210> 271
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 271
 aaatcgatgt ggacgtag 20
 45 <210> 272
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 272
 atccgtccac atcgattgg 20
 55 <210> 273
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 273
 65 aaatcgatgt gcctgtcag 20

5 <210> 274
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 274
 ggacaggcac atcgatttgg 20
 <210> 275
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 275
 aaatcgatgt gaagcacgag 20
 <210> 276
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 276
 cgtgcttcac atcgatttgg 20
 <210> 277
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 277
 aaatcgatgt gcctgtcaag 20
 45 <210> 278
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 278
 55 tgacaggcac atcgatttgg 20
 <210> 279
 <211> 20
 <212> DNA
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 279
 65 aaatcgatgt gaagcaccag 20

<210> 280
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 280
 10 ggtgcttcac atcgatttg 20
 <210> 281
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 281
 aaatcgatgt gccttcgtag 20
 <210> 282
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 282
 acgaaggcac atcgatttg 20
 <210> 283
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 283
 aaatcgatgt gtcgtccgag 20
 45 <210> 284
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 284
 55 cggacgacac atcgatttg 20
 <210> 285
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 285
 65 aaatcgatgt ggagtctgag 20

<210> 286
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 286
 10 cagactccac atcgatttg 20
 <210> 287
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 287
 aaatcgatgt gtgatccgag 20
 <210> 288
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 288
 cggatcacac atcgatttg 20
 <210> 289
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 289
 aaatcgatgt gtcaggcgag 20
 45 <210> 290
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 290
 55 cgctgacac atcgatttg 20
 <210> 291
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 291
 65 aaatcgatgt gtcgtccaag 20

<210> 292
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 292
 10 tggacgacac atcgatttg 20
 <210> 293
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 293
 aaatcgatgt ggacggagag 20
 <210> 294
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 294
 ctccgtccac atcgatttg 20
 <210> 295
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 295
 aaatcgatgt ggtagcagag 20
 45 <210> 296
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 296
 55 ctgctaccac atcgatttg 20
 <210> 297
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 297
 65 aaatcgatgt ggctgtgtag 20

<210> 298
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 298
 10 acacagccac atcgatttg 20
 <210> 299
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 299
 aaatcgatgt ggacggacag 20
 <210> 300
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 300
 gtccgtccac atcgatttg 20
 <210> 301
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 301
 aaatcgatgt gtcaggcaag 20
 45 <210> 302
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 302
 55 tgcctgacac atcgatttg 20
 <210> 303
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 303
 65 aaatcgatgt ggctcgaaag 20

<210> 304
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 304
 10 ttcgagccac atcgattgg 20
 <210> 305
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 305
 aaatcgatgt gccttcgag 20
 <210> 306
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 306
 ccgaaggcac atcgattgg 20
 <210> 307
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 307
 aaatcgatgt ggtacacag 20
 45 <210> 308
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 308
 55 gtgctaccac atcgattgg 20
 <210> 309
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 309
 65 aaatcgatgt ggaaggtcag 20

<210> 310
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 310
 10 gacctccac atcgattgg 20
 <210> 311
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 311
 aaatcgatgt ggtgctgtag 20
 <210> 312
 <211> 20
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 312
 acagcaccac atcgattgg 20
 <210> 313
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 313
 gttgcctgt 9
 45 <210> 314
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 314
 55 aggcaacct 9
 <210> 315
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 315
 65 caggacggt 9

5 <210> 316
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 316
 cgtcctgct 9
 <210> 317
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 317
 agacgtggt 9
 <210> 318
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 318
 cacgtctct 9
 <210> 319
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 319
 caggaccgt 9
 45 <210> 320
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 320
 ggtcctgct 9
 55 <210> 321
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 321
 65 caggacagt 9

<210> 322
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 322
 10 tgtcctgct 9
 <210> 323
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 323
 cactctggt 9
 <210> 324
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 324
 cagagtgt 9
 <210> 325
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 325
 gacggctgt *9
 45 <210> 326
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 326
 agccgtcct 9
 55 <210> 327
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 327
 65 cactctcgt 9

5 <210> 328
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 328
 gagagtgt 9
 <210> 329
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 329
 gtagcctgt 9
 <210> 330
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 330
 aggctacct 9
 <210> 331
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 331
 gccacttgt 9
 45 <210> 332
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 332
 aagtggcct 9
 55 <210> 333
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 333
 65 catcgctgt 9

<210> 334
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 10
 <400> 334
 agcgtgct 9
 <210> 335
 <211> 9
 <212> DNA
 15
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20
 <400> 335
 cactggtgt 9
 <210> 336
 <211> 9
 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30
 <400> 336
 accagtgt 9
 <210> 337
 <211> 9
 35
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40
 <223> constructo sintético
 <400> 337
 gccactgt 9
 45
 <210> 338
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 338
 cagtggcct 9
 55
 <210> 339
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 339
 65
 tctggctgt 9

<210> 340
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 10
 <400> 340
 agccagact 9
 <210> 341
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 341
 gccactcgt 9
 <210> 342
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 342
 gagtggcct 9
 <210> 343
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 343
 tgcctctgt 9
 45 <210> 344
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 344
 agaggcact 9
 55 <210> 345
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 345
 65 catcgcagt 9

<210> 346
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 346
 10 tgcgatgct 9
 <210> 347
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 347
 caggaaggt 9
 <210> 348
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 348
 ctctctgct 9
 <210> 349
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 349
 ggcactctgt 9
 45 <210> 350
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 350
 55 agatgccct 9
 <210> 351
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 351
 65 cggtagctgt 9

<210> 352
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 10
 <400> 352
 agcaccgct 9
 <210> 353
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20
 <400> 353
 cactggcgt 9
 <210> 354
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30
 <400> 354
 gccagtgt 9
 <210> 355
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 355
 ttcctcgt 9
 45 <210> 356
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 356
 gaggagact 9
 55
 <210> 357
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 357
 65 cctgtctgt 9

5 <210> 358
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 358
 agacaggct 9
 <210> 359
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 359
 caacgctgt 9
 <210> 360
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 360
 agcgttgct 9
 <210> 361
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 361
 tgcctcggt 9
 45 <210> 362
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 362
 cgaggcact 9
 55 <210> 363
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 363
 65 aactgcgt 9

5 <210> 364
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 364
 gcagtgct 9
 <210> 365
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 365
 tcgtcctgt 9
 <210> 366
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 366
 aggacgact 9
 <210> 367
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 367
 gctgccagt 9
 45 <210> 368
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 368
 55 tggcagcct 9
 <210> 369
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 369
 65 tcaggctgt 9

5 <210> 370
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 370
 agcctgact 9
 <210> 371
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 371
 gccagggtg 9
 <210> 372
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 372
 acctggcct 9
 <210> 373
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético.
 <400> 373
 cggacctgt 9
 45 <210> 374
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 374
 aggtccgct 9
 55 <210> 375
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 375
 65 caacgcagt 9

5 <210> 376
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 376
 tgcgttgct 9
 <210> 377
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 377
 cacacgagt 9
 <210> 378
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 378
 tcgtgtgct 9
 <210> 379
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 379
 atggcctgt 9
 45 <210> 380
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 380
 aggccatct 9
 55 <210> 381
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 381
 65 ccagtctgt 9

5 <210> 382
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 382
 agactggct 9
 <210> 383
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 383
 ccaggagt 9
 <210> 384
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 384
 tcctggcct 9
 <210> 385
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 385
 cggaccagt 9
 45 <210> 386
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 386
 55 tgggccgct 9
 <210> 387
 <211> 9
 <212> DNA
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 65 <400> 387
 ccttcgct 9

<210> 388
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 10
 <400> 388
 gcgaaggct 9
 <210> 389
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20
 <400> 389
 gcagccagt 9
 <210> 390
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30
 <400> 390
 tggctgcct 9
 <210> 391
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 391
 ccagtcggt 9
 45 <210> 392
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 392
 cgactggct 9
 55 <210> 393
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 393
 65 actgagcgt 9

5 <210> 394
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 394
 gctcagtct 9
 <210> 395
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 395
 ccagtcggt 9
 <210> 396
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 396
 ggactggct 9
 <210> 397
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 397
 ccagtcagt 9
 45 <210> 398
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 398
 55 tgactggct 9
 <210> 399
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 399
 65 catcgaggt 9

<210> 400
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 10
 <400> 400
 ctcgatgct 9
 <210> 401
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 401
 ccatcggt 9
 <210> 402
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 402
 acgatggct 9
 <210> 403
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 403
 gtgctgcgt 9
 45 <210> 404
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 404
 gcagcacct 9
 55 <210> 405
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 405
 65 gactacggt 9

<210> 406
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> constructo sintético
 10
 <400> 406
 cgtagtcct 9
 <210> 407
 <211> 9
 <212> DNA
 15
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20
 <400> 407
 gtgctgagt 9
 <210> 408
 <211> 9
 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30
 <400> 408
 tcagcacct 9
 <210> 409
 <211> 9
 35
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 40
 <400> 409
 gctgcatgt 9
 <210> 410
 <211> 9
 45
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50
 <223> constructo sintético
 <400> 410
 atgcagcct 9
 55
 <210> 411
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 411
 gagtgggtgt 9
 65
 <210> 412

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 412
 accactcct 9

15 <210> 413
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> constructo sintético

25 <400> 413
 gactaccgt 9

30 <210> 414
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 414
 ggtagtcct 9

45 <210> 415
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> constructo sintético

55 <400> 415
 cggatgatgt 9

60 <210> 416
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> constructo sintético

70 <400> 416
 atcaccgct 9

75 <210> 417
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

80 <220>
 <223> constructo sintético

85 <400> 417
 tgcgactgt 9

90 <210> 418

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 418
 agtcgcact 9

 <210> 419
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 419
 tctggaggt 9

 <210> 420
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 420
 ctccagact 9

 <210> 421
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 421
 agcactggt 9

 <210> 422
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 422
 cagtgctct 9

 <210> 423
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 423
 tcgcttggt 9

65 <210> 424

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 424
 caagcgact 9

 <210> 425
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 425
 agcactcgt 9

 <210> 426
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 426
 gagtgtct 9

 <210> 427
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 427
 gcgattggt 9

 <210> 428
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 428
 caatcgct 9

55 <210> 429
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

65 <400> 429
 ccatcgct 9

 <210> 430

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 430
 gcgatggct 9

 <210> 431
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 431
 tcgcttcgt 9

 <210> 432
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 432
 gaagcgact 9

 <210> 433
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 433
 atgcctgt 9

 <210> 434
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 434
 aggactct 9

 <210> 435
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 435
 ggcataggt 9

65 <210> 436

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 436
 ctatgccct 9

 <210> 437
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 437
 gcgattcgt 9

 <210> 438
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 438
 gaatcgcct 9

 <210> 439
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 439
 tgcgacggt 9

 <210> 440
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 440
 cgtcgcact 9

 <210> 441
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 441
 gagtggcgt 9

65 <210> 442

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 442
 gccactcct 9

 <210> 443
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 443
 cggtgaggt 9

 <210> 444
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 444
 ctcaccgct 9

 <210> 445
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 445
 gctgcaagt 9

 <210> 446
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 446
 ttgcagcct 9

 <210> 447
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 447
 ttccgctgt 9

65 <210> 448

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 448
 agcggaact 9

 <210> 449
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 449
 gagtggagt 9

 <210> 450
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 450
 tccactcct 9

 <210> 451
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 451
 acagagcgt 9

 <210> 452
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 452
 gctctgtct 9

 <210> 453
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 453
 tgcgaccgt 9

65 <210> 454

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 454
 ggtcgact 9

 <210> 455
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 455
 cctgtaggt 9

 <210> 456
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 456
 ctacaggct 9

 <210> 457
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 457
 tagccgtgt 9

 <210> 458
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 458
 acggctact 9

 <210> 459
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 459
 tgcgacagt 9

65 <210> 460

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 460
 tgtcgact 9

 <210> 461
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 461
 ggtctgtgt 9

 <210> 462
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 462
 acagaccct 9

 <210> 463
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 463 9
 cggatgaagt 9

 <210> 464
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 464 9
 ttcaccgct 9

 <210> 465
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 465
 caacgaggt 9

65 <210> 466

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 466
 ctcggtgct 9

 <210> 467
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 467
 gcagcatgt 9

 <210> 468
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 468
 atgctgcct 9

 <210> 469
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 469
 tcgtcaggt 9

 <210> 470
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 470
 ctgacgact 9

 <210> 471
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 471
 agtgccagt 9

65 <210> 472

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 472
 tggcactct 9

 <210> 473
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 473
 tagaggcgt 9

 <210> 474
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 474
 gcctctact 9

 <210> 475
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 475 9
 gtcagcggt 9

 <210> 476
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 476
 cgctgacct 9

55 <210> 477
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

 <400> 477
 tcaggaggt 9

65 <210> 478

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 478
 ctctgact 9

10 <210> 479
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 479
 agcaggtgt 9

<210> 480
 <211> 9
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 480 9
 acctgctct 9

<210> 481
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 481
 ttccgcagt 9

45 <210> 482
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 482
 tgcggaact 9

55 <210> 483
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 483
 gtcagccgt 9

65 <210> 484

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 484
 ggctgacct 9

 <210> 485
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 485
 ggtctgcgt 9

 <210> 486
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 486
 gcagaccct 9

 <210> 487
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 487
 tagccgagt 9

 <210> 488
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 488
 tcggctact 9

 <210> 489
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 489
 gtcagcagt 9

65 <210> 490

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 490
 tgctgacct 9

 <210> 491
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 491
 ggtctgagt 9

 <210> 492
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 492
 tcagaccct 9

 <210> 493
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 493
 cggacaggt 9

 <210> 494
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 494
 ctgtccgct 9

 <210> 495
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 495
 ttagccggt 9

65 <210> 496

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 496
 cggctaact 9

 <210> 497
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 497
 gagacgagt 9

 <210> 498
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 498
 tcgtctcct 9

 <210> 499
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 499
 cgtaaccgt 9

 <210> 500
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 500
 ggttacgct 9

 <210> 501
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 501
 ttggcgtgt 9

65 <210> 502

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 502
 acgccaact 9

10 <210> 503
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 503
 atggcaggt 9

<210> 504
 <211> 9
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 504
 ctgccatct 9

<210> 505
 <211> 9
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 505
 cagctacga 9

<210> 506
 <211> 9
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 506
 gtagctgac 9

55 <210> 507
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 507
 ctctgcga 9

65 <210> 508

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 508
 gcaggagac 9

 <210> 509
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 509
 gctgcctga 9

 <210> 510
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 510
 aggcagcac 9

 <210> 511
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 511
 caggaacga 9

 <210> 512
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 512
 gttcctgac 9

 <210> 513
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 513
 cacacgcga 9

65 <210> 514

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 514
 gcgtgtgac 9

 <210> 515
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 515
 gcagcctga 9

 <210> 516
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 516
 aggctgcac 9

 <210> 517
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 517
 ctgaacgga 9

 <210> 518
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 518
 cgttcagac 9

 <210> 519
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 519
 ctgaaccga 9

65 <210> 520

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 520
 ggttcagac 9

 <210> 521
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 521
 tctggacga 9

 <210> 522
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 522
 gtccagaac 9

 <210> 523
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 523
 tgcctacga 9

 <210> 524
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 524
 gtaggcaac 9

55 <210> 525
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

65 <400> 525
 ggcatacga 9

 <210> 526

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 526
 gtatgccac 9

 <210> 527
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 527
 cggtgacga 9

 <210> 528
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 528
 gtcaccgac 9

 <210> 529
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 529
 caacgacga 9

 <210> 530
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 530
 gtcgttgac 9

 <210> 531
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 531
 ctcctctga 9

65 <210> 532

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 532
 agaggagac 9

 <210> 533
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 533
 tcaggacga 9

 <210> 534
 <211> 9
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 534
 gtcctgaac 9

 <210> 535
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 535
 aaaggcgga 9

 <210> 536
 45 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <223> constructo sintético

 <400> 536
 cgcctttac 9

55 <210> 537
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

 <400> 537
 65 ctctcggga 9

 <210> 538

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 538
 cgaggagac 9

10 <210> 539
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 539
 cagatgcga 9

<210> 540
 <211> 9
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 540
 gcatctgac 9

<210> 541
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 541
 gcagcaaga 9

<210> 542
 <211> 9
 45 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 50 <223> constructo sintético

<400> 542
 ttgctgcac 9

55 <210> 543
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 543
 gtggagtga 9

65 <210> 544

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 544
 actccacac 9

15 <210> 545
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> constructo sintético

25 <400> 545
 ccagtagga 9

30 <210> 546
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 546
 ctactggac 9

45 <210> 547
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> constructo sintético

55 <400> 547
 atggcacga 9

60 <210> 548
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> constructo sintético

70 <400> 548
 gtgccatac 9

75 <210> 549
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

80 <220>
 <223> constructo sintético

85 <400> 549
 ggactgtga 9

90 <210> 550

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 550
 acagtccac 9

 <210> 551
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 551
 ccgaactga 9

 <210> 552
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 552
 agttcggac 9

 <210> 553
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 553
 ctcctcaga 9

 <210> 554
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 554
 tgaggagac 9

 <210> 555
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 555
 cactgctga 9

65 <210> 556

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 556
 agcagtgac 9

 <210> 557
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 557
 agcaggcga 9

 <210> 558
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 558
 gcctgctac 9

 <210> 559
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 559
 agcaggaga 9

 <210> 560
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 560
 tcctgctac 9

 <210> 561
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 561
 agagccaga 9

65 <210> 562

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 562
 10 tggctctac 9

<210> 563
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 563
 20 gtcgttga 9

<210> 564
 <211> 9
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 564
 caacgacac 9

<210> 565
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 565
 ccgaacgga 9

<210> 566
 45 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 50 <223> constructo sintético

<400> 566
 cgttcggac 9

55 <210> 567
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 567
 65 cactgcgga 9

<210> 568

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 568
 cgcagtgac 9

 <210> 569
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 569
 gtggagcga 9

 <210> 570
 <211> 9
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 570
 gctccacac 9

 <210> 571
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 571
 gtggagaga 9

 <210> 572
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> constructo sintético

 <400> 572
 tctccacac 9

55 <210> 573
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

 <400> 573
 ggactgcga 9

65 <210> 574

<211>
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 574
 gcagtcac 9

 <210> 575
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 575
 ccgaaccga 9

 <210> 576
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 576
 ggttcggac 9

 <210> 577
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 577
 *cactgccga 9

 <210> 578
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 578
 ggcagtgac 9

 <210> 579
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 579
 cgaaacgga 9

65 <210> 580

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 580
 cgtttcgac 9

10 <210> 581
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 581
 ggactgaga 9

<210> 582
 <211> 9
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 582
 tcagtcac 9

<210> 583
 <211> 9
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 583
 ccgaacaga 9

45 <210> 584
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 50 <223> constructo sintético

<400> 584
 tgttcggac 9

55 <210> 585
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 585
 cgaaaccga 9

65 <210> 586

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 586
 ggtttcgac 9
 10 <210> 587
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 587
 20 ctggctga 9
 <210> 588
 <211> 9
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 588
 aagccagac 9
 <210> 589
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 40 <400> 589
 cacacctga 9
 <210> 590
 <211> 9
 45 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> constructo sintético
 <400> 590
 aggtgtgac 9
 55 <210> 591
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 591
 aacgaccga 9
 65 <210> 592

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 592
 ggtcgttac 9

10 <210> 593
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 593
 atccagcga 9

<210> 594
 <211> 9
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 594
 gctggatac 9

<210> 595
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 595
 tgcgaagga 9

<210> 596
 <211> 9
 45 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 50 <223> constructo sintético

<400> 596
 cttcgcaac 9

55 <210> 597
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 597
 tgccaacga 9

65 <210> 598

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 598
 gttcgcaac 9

 <210> 599
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 599
 ctggctgga 9

 <210> 600
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 600
 cagccagac 9

 <210> 601
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 601
 cacaccgga 9

 <210> 602
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 602
 cgggtgtgac 9

55 <210> 603
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

 <400> 603
 agtcagga 9

65 <210> 604

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 604
 ctgcactac 9

 <210> 605
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 605
 gaccgttga 9

 <210> 606
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 606
 aacggtcac 9

 <210> 607
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 607
 ggtgagtga 9

 <210> 608
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 608
 actcaccac 9

 <210> 609
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 609
 ccttcctga 9

65 <210> 610

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 610
 aggaaggac 9

 <210> 611
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 611
 ctggctaga 9

 <210> 612
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 612
 tagccagac 9

 <210> 613
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 613
 cacaccaga 9

 <210> 614
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 614
 tgggtgtgac 9

 <210> 615
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 615
 agcggtaga 9

65 <210> 616

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 616
 taccgctac 9
 10 <210> 617
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 617
 20 gtcagagga 9
 <210> 618
 <211> 9
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 618
 ctctgacac 9
 <210> 619
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 40 <400> 619
 ttccgacga 9
 <210> 620
 45 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> constructo sintético
 <400> 620
 gtcggaac 9
 55 <210> 621
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 621
 65 aggcgtaga 9
 <210> 622

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 622
 tacgcctac 9

10 <210> 623
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 623
 ctcgactga 9

<210> 624
 <211> 9
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 624
 agtcgagac 9

<210> 625
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 625
 tacgctgga 9

<210> 626
 <211> 9
 45 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 50 <223> constructo sintético

<400> 626
 cagcgtaac 9

55 <210> 627
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 627
 gttcgggtga 9

65 <210> 628

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 628
 accgaacac 9

 <210> 629
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 629
 gccagcaga 9

 <210> 630
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 630
 tgctggcac 9

 <210> 631
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 631
 gaccgtaga 9

 <210> 632
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 632
 tacggtcac 9

 <210> 633
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 633
 gtgctctga 9

65 <210> 634

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 634
 agagcacac 9

 <210> 635
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 635
 ggtgagcga 9

 <210> 636
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 636
 gctcaccac 9

 <210> 637
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 637
 ggtgagaga 9

 <210> 638
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 638
 tctcaccac 9

55 <210> 639
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

 <400> 639
 ccttcaga 9

65 <210> 640

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 640
 10 tggaaggac 9

<210> 641
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 641
 20 ctctacga 9

<210> 642
 <211> 9
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 642
 gtaggagac 9

<210> 643
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 643
 ctcgacgga 9

<210> 644
 <211> 9
 45 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 50 <223> constructo sintético

<400> 644
 cgtcgagac 9

55 <210> 645
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 645
 65 gccgtttga 9

<210> 646

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 646
 aaacggcac 9

 <210> 647
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 647
 gcggagtga 9

 <210> 648
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 648
 actccgcac 9

 <210> 649
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 649
 cgtgcttga 9

 <210> 650
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 650
 aagcacgac 9

55 <210> 651
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

 <400> 651
 ctcgaccga 9

65 <210> 652

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 652
 ggtcgagac 9
 <210> 653
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 653
 agagcagga 9
 <210> 654
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 654
 ctgctctac 9
 <210> 655
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 655
 gtgctcgga 9
 <210> 656
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 656
 cgagcacac 9
 <210> 657
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 657
 ctcgacaga 9
 <210> 658

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 658
 tgtcgagac 9

 <210> 659
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 659
 ggagagtga 9

 <210> 660
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 660
 actctccac 9

 <210> 661
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 661
 aggctgtga 9

 <210> 662
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 662
 acagcctac 9

55 <210> 663
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

65 <400> 663
 agagcacga 9

 <210> 664

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 664
 gtgctctac 9

10 <210> 665
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 665
 ccatcctga 9

<210> 666
 <211> 9
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 666
 aggatggac 9

<210> 667
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 667
 gttcggaga 9

<210> 668
 <211> 9
 45 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 50 <223> constructo sintético

<400> 668
 tccgaacac 9

55 <210> 669
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 669
 tggtagcga 9

65 <210> 670

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 670
 gctaccaac 9

10 <210> 671
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 671
 gtgctccga 9

<210> 672
 <211> 9
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 672
 ggagcacac 9

<210> 673
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 673
 gtgctcaga 9

<210> 674
 <211> 9
 45 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 50 <223> constructo sintético

<400> 674
 tgagcacac 9

55 <210> 675
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 675
 gccgttgga 9

65 <210> 676

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 676
 caacggcac 9

 <210> 677
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 677
 gagtgtga 9

 <210> 678
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 678
 agcactcac 9

 <210> 679
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 679
 gctcctga 9

 <210> 680
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 680
 aaggagcac 9

55 <210> 681
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

65 <400> 681
 ccgaaagga 9

 <210> 682

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 682
 ctttcggac 9

 <210> 683
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 683
 cactgagga 9

 <210> 684
 <211> 9
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 684
 ctcaagtac 9

 <210> 685
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 685
 cgtgctgga 9

 <210> 686
 45 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <223> constructo sintético

 <400> 686
 cagcacgac 9

55 <210> 687
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

 <400> 687
 65 ccgaaacga 9

 <210> 688

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 688
 gtttcggac 9

 <210> 689
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 689
 gcggagaga 9

 <210> 690
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 690
 tctccgcac 9

 <210> 691
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 691
 gccgttaga 9

 <210> 692
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 692
 taacggcac 9

 <210> 693
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 693
 tctcgtgga 9

65 <210> 694

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 694
 cacgagaac 9

 <210> 695
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 695
 cgtgctaga 9

 <210> 696
 <211> 9
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 696
 tagcacgac 9

 <210> 697
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 697
 gcctgtctt 9

45 <210> 698
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> constructo sintético

 <400> 698
 gacaggctc 9

55 <210> 699
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

 <400> 699
 65 ctctctggtt 9

 <210> 700

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 700
 ccaggagtc 9

 <210> 701
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 701
 actctgctt 9

 <210> 702
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 702
 gcagagttc 9

 <210> 703
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 703
 catcgcctt 9

 <210> 704
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 704
 ggcgatgtc 9

55 <210> 705
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

65 <400> 705
 gccactatt 9

 <210> 706

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 706
 tagtggtc 9

 <210> 707
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 707
 cacacggtt 9

 <210> 708
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 708
 ccgtgtgtc 9

 <210> 709
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 709
 caacgcctt 9

 <210> 710
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 710
 ggcgttgtc 9

 <210> 711
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 711
 actgaggtt 9

65 <210> 712

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 712
 cctcagttc 9

 <210> 713
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 713
 gtgctggtt 9

 <210> 714
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 714
 ccagcactc 9

 <210> 715
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 715
 catcgactt 9

 <210> 716
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 716
 gtcgatgtc 9

 <210> 717
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 717
 ccatcggtt 9

65 <210> 718

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 718
 ccgatggtc 9

 <210> 719
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 719
 gctgcactt 9

 <210> 720
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 720
 gtgcagctc 9

 <210> 721
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 721
 acagaggtt 9

 <210> 722
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 722
 cctctgttc 9

 <210> 723
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 723
 agtgccgtt 9

65 <210> 724

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 724
 cggcacttc 9

 <210> 725
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 725
 cggacattt 9

 <210> 726
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 726
 atgtccgtc 9

 <210> 727
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 727
 ggtctggtt 9

 <210> 728
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 728
 ccagacctc 9

 <210> 729
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 729
 gagacggtt 9

65 <210> 730

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 730
 ccgtctctc 9
 <210> 731
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 731
 ctttccggt 9
 <210> 732
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 732
 cggaaagtc 9
 <210> 733
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 733
 cagatgggt 9
 <210> 734
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 734
 ccatctgtc 9
 <210> 735
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 735
 cggacactt 9
 <210> 736

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 736
 gtgtccgtc 9

 <210> 737
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 737
 actctcgtt 9

 <210> 738
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 738
 cgagagttc 9

 <210> 739
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 739
 gcagcactt 9

 <210> 740
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 740
 gtgctgctc 9

55 <210> 741
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

 <400> 741
 actctcctt 9

65 <210> 742

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 742
 ggagagttc 9

 <210> 743
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 743
 accttggtt 9

 <210> 744
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 744
 ccaaggttc 9

 <210> 745
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 745
 agagccggtt 9

 <210> 746
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 746
 cggctcttc 9

 <210> 747
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 747
 accttgctt 9

65 <210> 748

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 748
 gcaagggtc 9

 <210> 749
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 749
 aagtccggt 9

 <210> 750
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 750
 cggactttc 9

 <210> 751
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 751
 ggactgggt 9

 <210> 752
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 752
 ccagtcctc 9

 <210> 753
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 753
 gtcgttctt 9

65 <210> 754

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 754
 gaacgactc 9

 <210> 755
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 755
 cagcatctt 9

 <210> 756
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 756
 gatgctgtc 9

 <210> 757
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 757
 ctatccgtt 9

 <210> 758
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 758
 cggatagtc 9

 <210> 759
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 759
 acactcggtt 9

65 <210> 760

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 760
 cgagtgttc 9

 <210> 761
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 761
 atccaggt 9

 <210> 762
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 762
 cctggattc 9

 <210> 763
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 763
 gttcctgtt 9

45 <210> 764
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> constructo sintético

 <400> 764
 caggaactc 9

55 <210> 765
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

 <400> 765
 acactcctt 9

65 <210> 766

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 766
 ggagtgttc 9

 <210> 767
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 767
 gttcctctt 9

 <210> 768
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 768
 gaggaactc 9

 <210> 769
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 769
 ctggctctt 9

 <210> 770
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 770
 gagccagtc 9

55 <210> 771
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

 <400> 771
 acggcattt 9

65 <210> 772

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 772
 atgccggtc 9

 <210> 773
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 773
 ggtgaggtt 9

 <210> 774
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 774
 cctcacctc 9

 <210> 775
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 775
 ccttccgtt 9

 <210> 776
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 776
 cggaaggtc 9

 <210> 777
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 777
 tacgctctt 9

65 <210> 778

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 778
 gagcgtatc 9

 <210> 779
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 779
 acggcagtt 9

 <210> 780
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 780
 ctgccggttc 9

 <210> 781
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 781
 actgacggt 9

 <210> 782
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 782
 cgtcaggttc 9

55 <210> 783
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

65 <400> 783
 acggcactt 9

 <210> 784

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 784
 gtgccgttc 9

 <210> 785
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 785
 actgacctt 9

 <210> 786
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 786
 ggtcagttc 9

 <210> 787
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 787
 tttgcggtt 9

 <210> 788
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 788
 ccgcaaadc 9

 <210> 789
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 789
 tggtaggtt 9

65 <210> 790

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 790
 cctaccatc 9

 <210> 791
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 791
 gttcggctt 9

 <210> 792
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 792
 gccgaactc 9

 <210> 793
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 793
 gccgttctt 9

 <210> 794
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 794
 gaacggctc 9

55 <210> 795
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

65 <400> 795
 ggagaggtt 9

 <210> 796

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 796
 cctctcctc 9

 <210> 797
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 797
 cactgactt 9

 <210> 798
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 798
 gtcagtgctc 9

 <210> 799
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 799
 cgtgctctt 9

 <210> 800
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 800
 gagcacgctc 9

 <210> 801
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 801
 aatccgctt 9

65 <210> 802

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 802
 gcggatttc 9

 <210> 803
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 803
 aggctggtt 9

 <210> 804
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 804
 ccagccttc 9

 <210> 805
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 805
 gctagtgtt 9

 <210> 806
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 806
 cactagctc 9

 <210> 807
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 807
 ggagagctt 9

65 <210> 808

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 808
 gctctcctc 9

 <210> 809
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 809
 ggagagatt 9

 <210> 816
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 816
 tggatggtc 9

 <210> 817
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 817
 gctagtctt 9

 <210> 818
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 818
 gactagctc 9

 <210> 819
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 819
 aggctgatt 9

65 <210> 820

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 820
 tcagccttc 9

 <210> 821
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 821
 acagacgtt 9

 <210> 810
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 810
 tctctctc 9

 <210> 811
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 811
 aggctgctt 9

 <210> 812
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 812
 gcagccttc 9

 <210> 813
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 813
 gagtgcggtt 9

65 <210> 814

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 814
 cgactctc 9

15 <210> 815
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> constructo sintético

25 <400> 815
 ccatccatt 9

30 <210> 822
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 822
 cgtctgttc 9

45 <210> 823
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> constructo sintético

55 <400> 823
 gactgcctt 9

60 <210> 824
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> constructo sintético

70 <400> 824
 ggactctc 9

75 <210> 825
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

80 <220>
 <223> constructo sintético

85 <400> 825
 acagacctt 9

90 <210> 826

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 826
 aatctattc 9

15 <210> 827
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> constructo sintético

25 <400> 827
 cgagctttt 9

30 <210> 828
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 828
 aagctcgtc 9

45 <210> 829
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> constructo sintético

55 <400> 829
 ttagcgggt 9

60 <210> 830
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> constructo sintético

70 <400> 830
 ccgctaadc 9

75 <210> 831
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

80 <220>
 <223> constructo sintético

85 <400> 831
 cctcttggt 9

90 <210> 832

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 832
 caagaggtc 9

 <210> 833
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 833
 ggtctcttt 9

 <210> 834
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 834
 agagacctc 9

 <210> 835
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 835
 gccagattt 9

 <210> 836
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 836
 atctggctc 9

 <210> 837
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 837
 gagacctt 9

65 <210> 838

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 838
 aggtctctc 9

10 <210> 839
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 839
 cacacagtt 9

<210> 840
 <211> 9
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 840
 ctgtgtgtc 9

<210> 841
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 841
 cctcttctt 9

<210> 842
 <211> 9
 45 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 50 <223> constructo sintético

<400> 842
 gaagaggtc 9

55 <210> 843
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 843
 tagagcgtt 9

65 <210> 844

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 844
 cgctctatc 9

 <210> 845
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 845
 gcacctttt 9

 <210> 846
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 846
 aaggtgctc 9

 <210> 847
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 847
 ggcttgttt 9

 <210> 848
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 848
 acaagcctc 9

 <210> 849
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 849
 gacgcgatt 9

65 <210> 850

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 850
 tcgcgctctc 9

 <210> 851
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 851
 cgagctggt 9

 <210> 852
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 852
 cagctcgtc 9

 <210> 853
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 853
 tagagcctt 9

 <210> 854
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 854
 ggctctatc 9

 <210> 855
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 855
 catccgttt 9

65 <210> 856

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 856
 acggatgtc 9

 <210> 857
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 857
 ggtctcggt 9

 <210> 858
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 858
 cgagacctc 9

 <210> 859
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 859
 gccagagtt 9

 <210> 860
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 860
 ctctggctc 9

 <210> 861
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 861
 gagaccggt 9

65 <210> 862

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 862
 cggtctctc 9
 10 <210> 863
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 863
 20 cgagctatt 9
 <210> 864
 <211> 9
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 864
 tagctcgctc 9
 <210> 865
 <211> 9
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 40 <400> 865
 gcaagtgtt 9
 <210> 866
 <211> 9
 45 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> constructo sintético
 <400> 866
 cacttgctc 9
 55 <210> 867
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 867
 65 ggtctcctt 9
 <210> 868

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 868
 ggagacctc 9

 <210> 869
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 869
 gccagactt 9

 <210> 870
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 870
 gtctggctc 9

 <210> 871
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 871
 ggtctcatt 9

 <210> 872
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 872
 tgagacctc 9

55 <210> 873
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

 <400> 873
 gagaccatt 9

65 <210> 874

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 874
 tggctctc 9

 <210> 875
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 875
 ccttcagtt 9

 <210> 876
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 876
 ctgaaggctc 9

 <210> 877
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 877
 gcacctgtt 9

 <210> 878
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

50 <400> 878
 caggtgctc 9

 <210> 879
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> constructo sintético

60 <400> 879
 aaaggcgtt 9

65 <210> 880

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> constructo sintético

10 <400> 880
 cgccctttc 9

 <210> 881
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> constructo sintético

20 <400> 881
 cagatcggt 9

 <210> 882
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> constructo sintético

30 <400> 882
 cgatctgtc 9

 <210> 883
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> constructo sintético

40 <400> 883
 cataggctt 9

45 <210> 884
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> constructo sintético

 <400> 884
 gcctatgtc 9

55 <210> 885
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> constructo sintético

65 <400> 885
 ccttcactt 9

5 <210> 886
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 886
 gtgaaggctc 9
 <210> 887
 <211> 9
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 887
 gcacctctt 9
 <210> 888
 <211> 9
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 888
 gaggtgctc 9
 <210> 889
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> constructo sintético
 <400> 889
 25 cagaagacag acaagcttca cctgc
 45 <210> 890
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> constructo sintético
 <400> 890
 gcagggaag cttgtctgtc ttctgaa 27
 55 PPI-156CP
 2

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de sintetizar una molécula que comprende un resto funcional que está unido operativamente a un oligonucleótido codificador que identifica la estructura del resto funcional, dicho procedimiento que comprende las etapas de:
 - 5 (a) proporcionar un compuesto iniciador que consiste en un resto funcional inicial que comprende n bloques de construcción, en el que n es un número entero de 1 o mayor, donde el resto funcional inicial comprende al menos un grupo reactivo, y está unido operativamente a un oligonucleótido inicial, en el que el resto funcional inicial comprende al menos un grupo reactivo, y está unido operativamente a un oligonucleótido inicial; en el que el resto funcional inicial y el oligonucleótido inicial se unen con un resto ligador y en el que el oligonucleótido inicial es bicatenario y el resto ligador se acopla covalentemente al resto funcional inicial y a ambas cadenas del oligonucleótido inicial;
 - (b) hacer reaccionar el compuesto iniciador con un bloque de construcción deseado que comprende al menos un grupo reactivo complementario, en el que al menos un grupo reactivo complementario es complementario con el grupo reactivo de la etapa (a), en las condiciones adecuadas para la reacción del grupo reactivo complementario para formar un enlace covalente;
 - (c) hacer reaccionar el oligonucleótido inicial con un oligonucleótido entrante que identifica el bloque de construcción de la etapa (b) en presencia de una enzima que cataliza el ligamiento del oligonucleótido inicial y el oligonucleótido entrante, en condiciones adecuadas para el ligamiento del oligonucleótido entrante y el oligonucleótido inicial para formar un oligonucleótido codificador, en el que el último de dichos oligonucleótidos entrantes comprende una secuencia capuchón que comprende una secuencia de nucleótidos que contiene nucleótidos degenerados;

de este modo se produce una molécula que comprende un resto funcional que comprende n+1 bloques de construcción que está unido operativamente a un oligonucleótido codificador que identifica la estructura del resto funcional.
- 25 2. Un procedimiento de sintetizar una biblioteca de compuestos, en la que los compuestos comprenden un resto funcional que comprende dos o más bloques de construcción que están unidos operativamente a un oligonucleótido codificador que identifica la estructura del resto funcional, dicho procedimiento que comprende las etapas de
 - 30 (a) proporcionar una solución que comprende m iniciadores del compuesto de la reivindicación 1, en la que m es un número entero de 1 o mayor;
 - (b) dividir la solución de la etapa (a) en r recipientes de reacción, en el que r es un número entero de 2 o mayor, de este modo se producen r alícuotas de la solución;
 - (c) hacer reaccionar los iniciadores del compuesto en cada recipiente de reacción con uno de los r bloques de construcción, dichos bloques de construcción que comprenden al menos un grupo reactivo complementario, en los que al menos un grupo reactivo complementario es complementario con el grupo reactivo de la etapa (a), en condiciones adecuadas para la reacción del grupo reactivo complementario para formar un enlace covalente, de este modo se producen r alícuotas que comprenden compuestos que consiste en un resto funcional que comprende n+1 bloques de construcción unidos operativamente al oligonucleótido inicial; y
 - 40 (d) hacer reaccionar el oligonucleótido inicial en cada alícuota con uno de un conjunto de r oligonucleótidos entrantes distintos que corresponden al bloque de construcción de la etapa (c) en presencia de una enzima que cataliza el ligamiento del oligonucleótido entrante y el oligonucleótido inicial, en condiciones adecuadas para ligamiento enzimático del oligonucleótido entrante y el oligonucleótido inicial para formar un oligonucleótido codificador, en el que el último de dichos r oligonucleótidos entrantes distintos comprenden una secuencia capuchón, dicha secuencia capuchón que comprende una secuencia de nucleótidos que contiene nucleótidos degenerados;
 - 45 de este modo se producen r alícuotas que comprenden moléculas que consisten en un resto funcional que comprende n+1 bloques de construcción unidos operativamente a un oligonucleótido codificador que identifica la estructura del resto funcional que comprende los n+1 bloques de construcción,
3. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el resto funcional de la etapa (c) comprende un grupo reactivo, y las etapas (a) a (c) se repiten una vez o más veces, de este modo se forman ciclos 1 a i, donde i es un número entero de 2 o mayor, donde el producto de la etapa (c) de un ciclo s, donde s es un número entero de i-1 o menor, es el compuesto iniciador del ciclo s + 1.
4. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la etapa (c) precede a la etapa (b) o la etapa (b) precede a la etapa (c).
5. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que al menos uno de los bloques de construcción es un

aminoácido o un aminoácido activado.

6. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la enzima se selecciona del grupo que consiste en un ADN ligasa, una ARN ligasa, una ADN polimerasa, un ARN polimerasa y una topoisomerasa.

5 7. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el oligonucleótido inicial comprende una secuencia del cebador de PCR.

8. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el oligonucleótido entrante tiene 3 a 10 nucleótidos de longitud.

9. El procedimiento de la reivindicación 3, que además comprende después del ciclo i, la etapa de

10 (e) ciclar el resto funcional; opcionalmente en el que el resto funcional comprende un grupo alquínico y un grupo azido, y el compuesto se somete a condiciones adecuadas para cicloadición del grupo alquínico y el grupo azido para formar un grupo triazol, de este modo se cicla el resto funcional.

10. El procedimiento de la reivindicación 2, que además comprende la etapa de

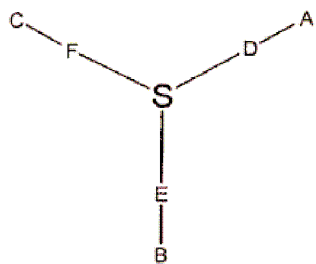
15 (e) combinar dos o más de las r alícuotas, de este modo se produce una solución que comprende moléculas que consisten en un resto funcional que comprende $n + 1$ bloques de construcción, que está unido operativamente a un oligonucleótido codificador que identifica la estructura del resto funcional que comprende los $n + 1$ bloques de construcción.

11. El procedimiento de la reivindicación 10 en el que se combinan r alícuotas.

20 12. El procedimiento de la reivindicación 10 en el que las etapas (a) a (e) se realizan una o más veces para producir ciclos 1 a i, donde i es un número entero de 2 o mayor, en el que en el ciclo $s+1$, donde s es un número entero de $i-1$ o menor, la solución que comprende m iniciadores del compuesto de la etapa (a) es la solución de la etapa (e) del ciclo s, opcionalmente en el que en al menos uno de los ciclos 1 a i de la etapa (d) precede a la etapa (c).

25 13. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el resto ligador comprende un primer grupo funcional adaptado para unirse con un bloque de construcción, un segundo grupo funcional adaptado para unirse al extremo 5' de un oligonucleótido, y un tercer grupo funcional adaptado para unirse al extremo 3' de un oligonucleótido.

14. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que el resto ligador es de la estructura



en el que

A es un grupo funcional adaptado a unirse a un bloque de construcción;

30 B es un grupo funcional adaptado a unirse al extremo 5' de un oligonucleótido;

C es un grupo funcional adaptado a unirse al extremo 3' de un oligonucleótido;

S es un átomo o un armazón;

D es una estructura química que conecta A a S;

E es una estructura química que conecta B a S; y

35 F es una estructura química que conecta C a S; opcionalmente en el que

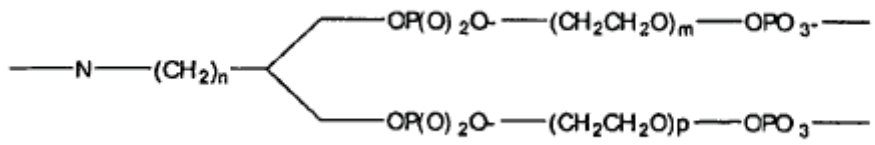
(i) A es un grupo amino;

B es un grupo fosfato; y

C es un grupo fosfato; o

(ii) en el que D, E y F son cada uno de modo independiente, un grupo alquileo o un grupo oligo(etilenglicol); o

(iii) en el que S es un átomo de carbono, un átomo de nitrógeno, un átomo de fósforo, un átomo de boro, un grupo fosfato, un grupo cíclico o un grupo policíclico; opcionalmente en el que el resto ligador es de la estructura

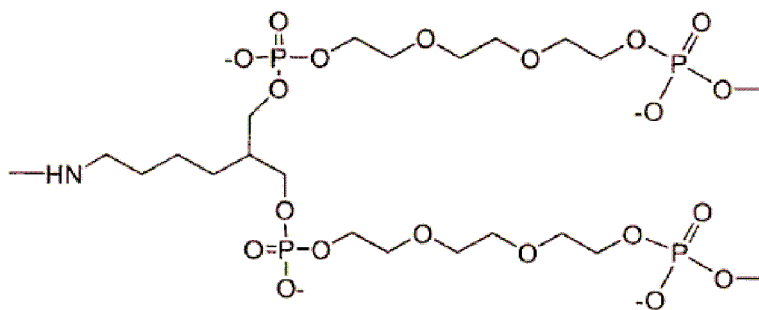


en el que cada uno

5 de n, m y p es, de modo independiente, un número entero de 1 a aproximadamente 20; opcionalmente

(A) en el que cada uno de n, m y p es de modo independiente un número entero de 2 a ocho, opcionalmente en el que cada uno de n, m y p es de modo independiente un número entero de 3 a 6; o

(B) en el que el resto ligador tiene la estructura



10 15. El procedimiento de la reivindicación 9, que además comprende el siguiente ciclo i, la etapa de: (f) ciclar uno o más de los restos funcionales; opcionalmente en el que un resto funcional de la etapa (f) comprende un grupo azido y un grupo alquínico; opcionalmente en el que el resto funcional se mantiene en condiciones adecuadas para la cicloadición del grupo azido y el grupo alquínico para formar un grupo triazol, de este modo forma un resto funcional cíclico; opcionalmente en el que la reacción de cicloadición se realiza en la presencia de un catalizador de cobre; 15 opcionalmente en el que al menos uno del uno o más restos funcionales de la etapa (f) comprende al menos dos grupos sulfhidrido, y dicho resto funcional se mantiene en condiciones adecuadas para la reacción de los dos grupos sulfhidrido para formar un grupo disulfuro, de este modo cicla el resto funcional.

16. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el grupo reactivo y el grupo reactivo complementario se seleccionan del grupo que consiste en

20 (i) un grupo amino; un grupo carboxilo; un grupo sulfonilo; un grupo fosfonilo; un grupo epóxido; un grupo aziridina; y un grupo isocianato; o

(ii) un grupo hidroxilo; un grupo carboxilo; un grupo sulfonilo; un grupo fosfonilo; un grupo epóxido; un grupo aziridina; y un grupo isocianato; o

25 (iii) un grupo amino y un grupo aldehído o cetona, opcionalmente en el que la reacción entre el grupo reactivo y el grupo reactivo complementario se realiza en condiciones reductoras; o

(iv) un grupo iluro de fósforo y un grupo aldehído o cetona.

17. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el grupo reactivo y el grupo reactivo complementario reacciona por medio de la cicloadición para formar una estructura cíclica, opcionalmente en el que el grupo reactivo y el grupo reactivo complementario se seleccionan del grupo que consiste en

30 (i) un alquino y una azida; o

(ii) un grupo heteroaromático halogenado y un nucleófilo; opcionalmente en el que el grupo heteroaromático halogenado se selecciona del grupo que consiste en pirimidinas cloradas, triazinas cloradas y purinas cloradas; o en el que el nucleófilo es un grupo amino.

35 18. Un procedimiento para identificar uno o más compuestos que unen a un blanco biológico, dicho procedimiento que comprende las etapas de:

- (a) poner en contacto el blanco biológico con una biblioteca de compuestos preparada por el procedimiento de la reivindicación 2 en condiciones adecuadas para al menos un miembro de la biblioteca de compuestos para unirse al blanco;
- (b) eliminar miembros de biblioteca que no se unen al blanco;
- 5 (c) amplificar los oligonucleótidos codificadores del al menos un miembro de la biblioteca de compuestos que se une al blanco;
- (d) secuenciar los oligonucleótidos codificadores de la etapa (c); y
- (e) usar las secuencias determinadas en la etapa (d) para determinar la estructura de los restos funcionales de los miembros de la biblioteca de compuestos que se unen al blanco biológico;
- 10 de este modo se identifican uno o más compuestos que se unen al blanco biológico.
19. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha secuencia capuchón comprende la siguiente secuencia: 3'- AA GTCGCAAGCT NNNNN GTCTGTTCGAAGTGGACG - 5', en el que N es cualquiera de A, T, G o C.
- 15 20. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha secuencia capuchón comprende la siguiente secuencia:
- 3' - AA GTCGCAAGCTACG ABBBABBBABBBA GACTACCGCGCTCCCTCCG - 5', en el que B es cualquiera de T, G, o C.
21. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que las reacciones se realizan en solución.
22. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la molécula sintetizada es un compuesto polimérico.
- 20 23. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la molécula sintetizada es un compuesto no polimérico.

Figura 1

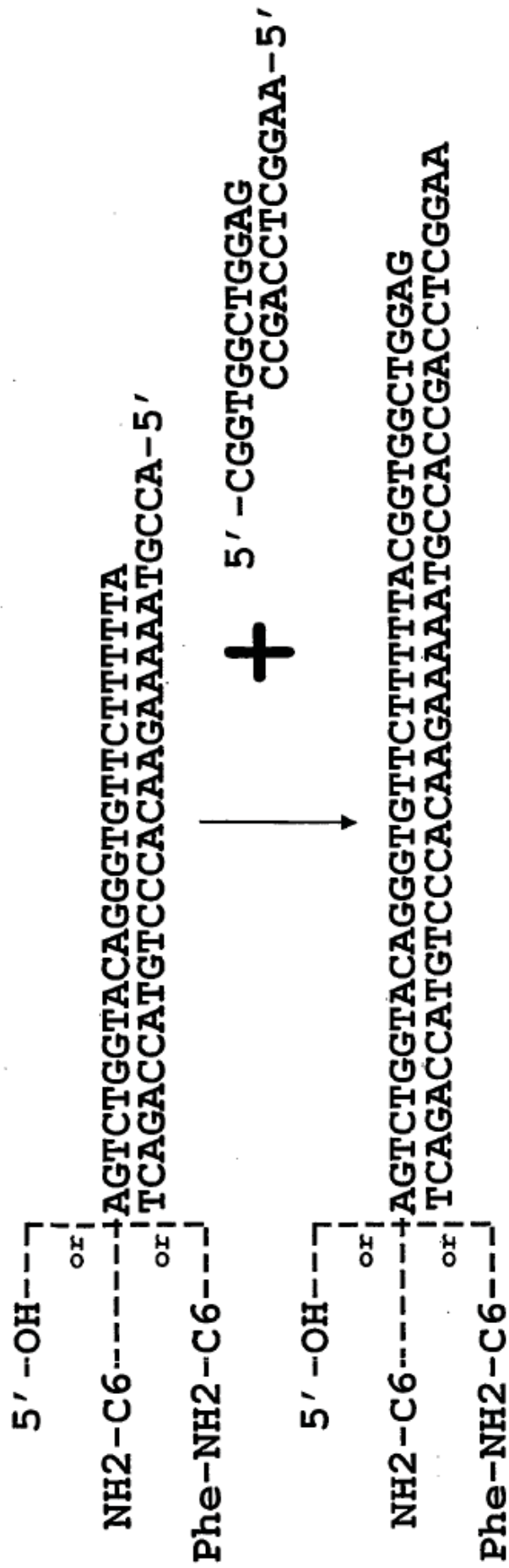


Figura 2

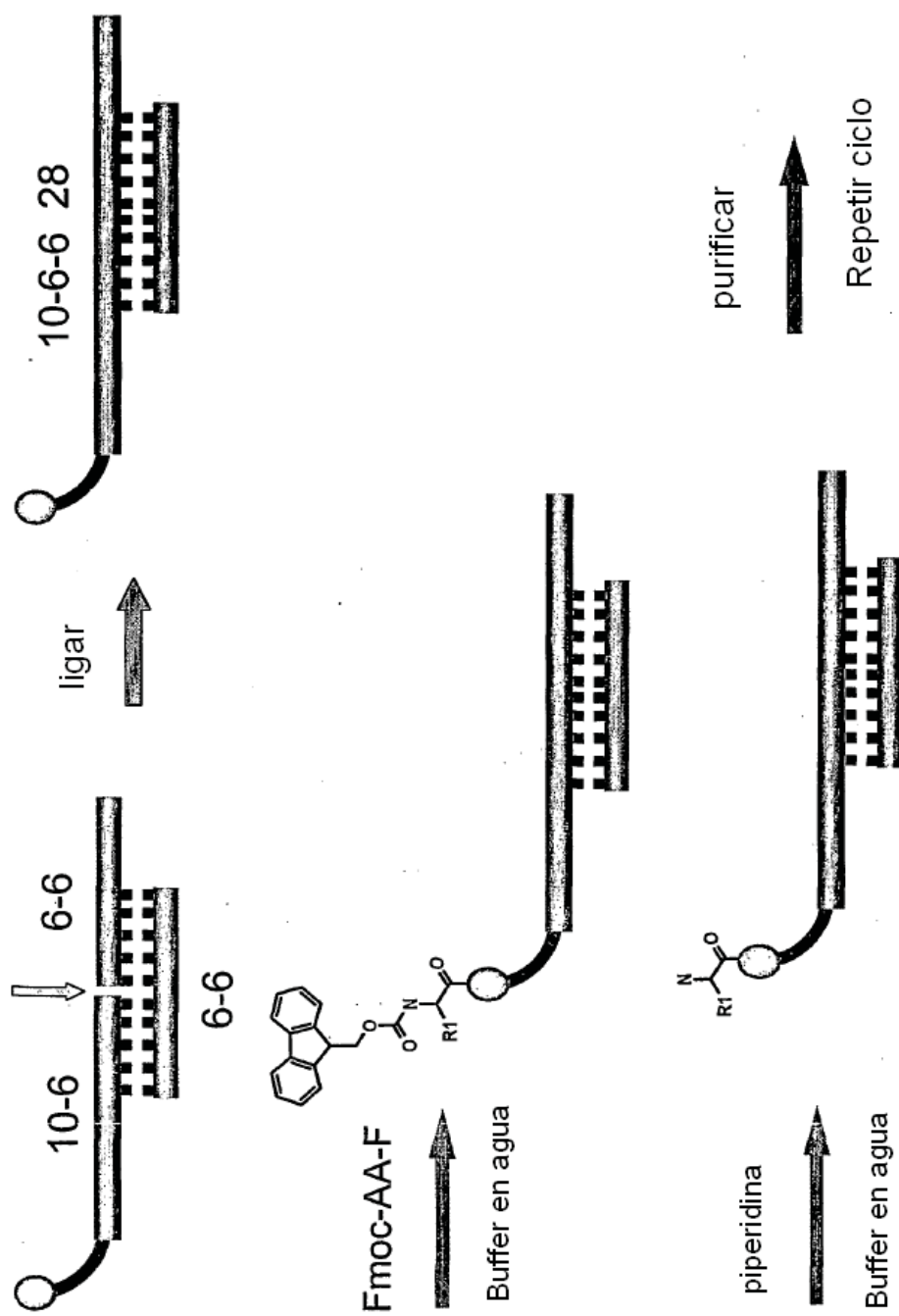


Figura 3

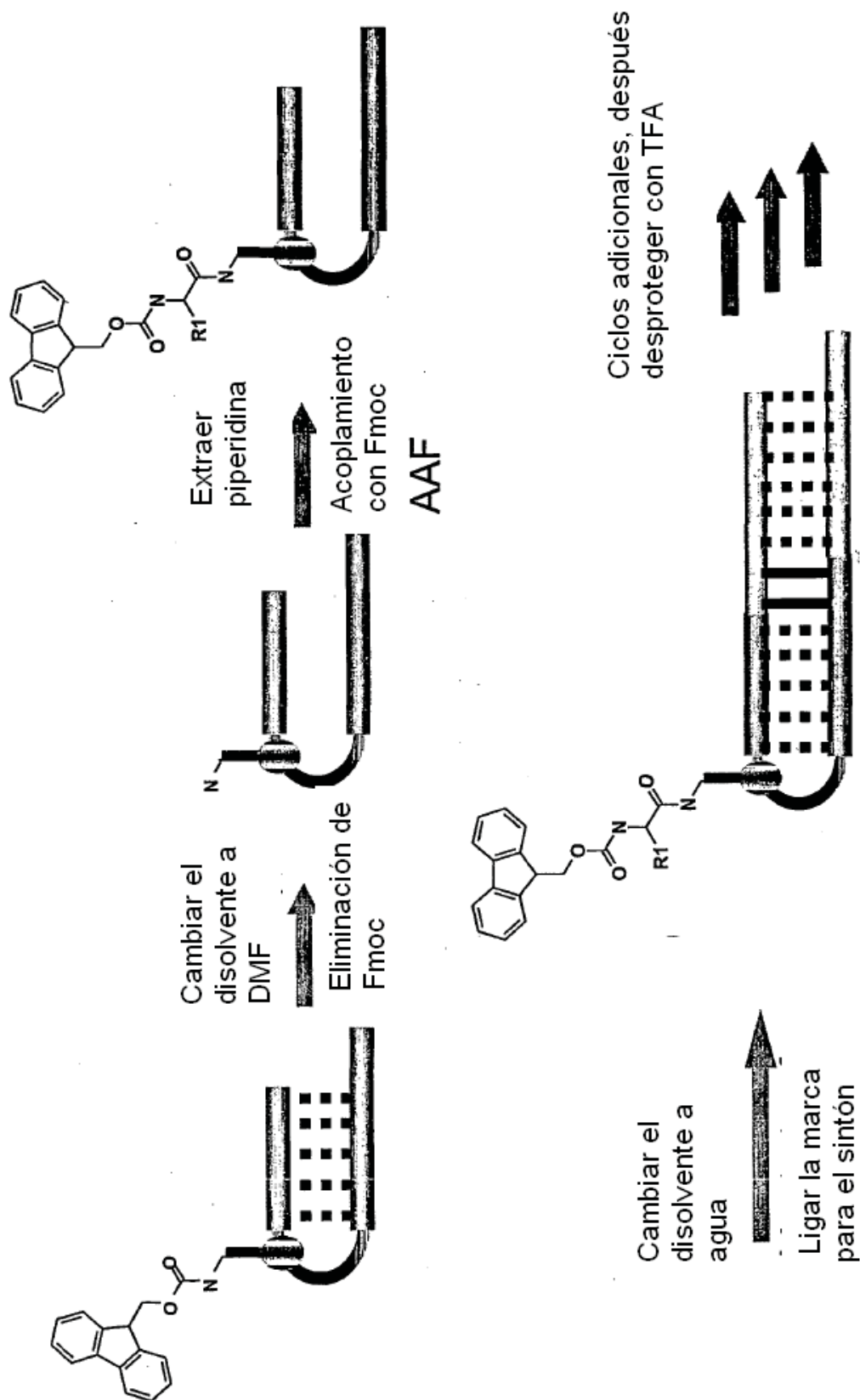


Figura 4

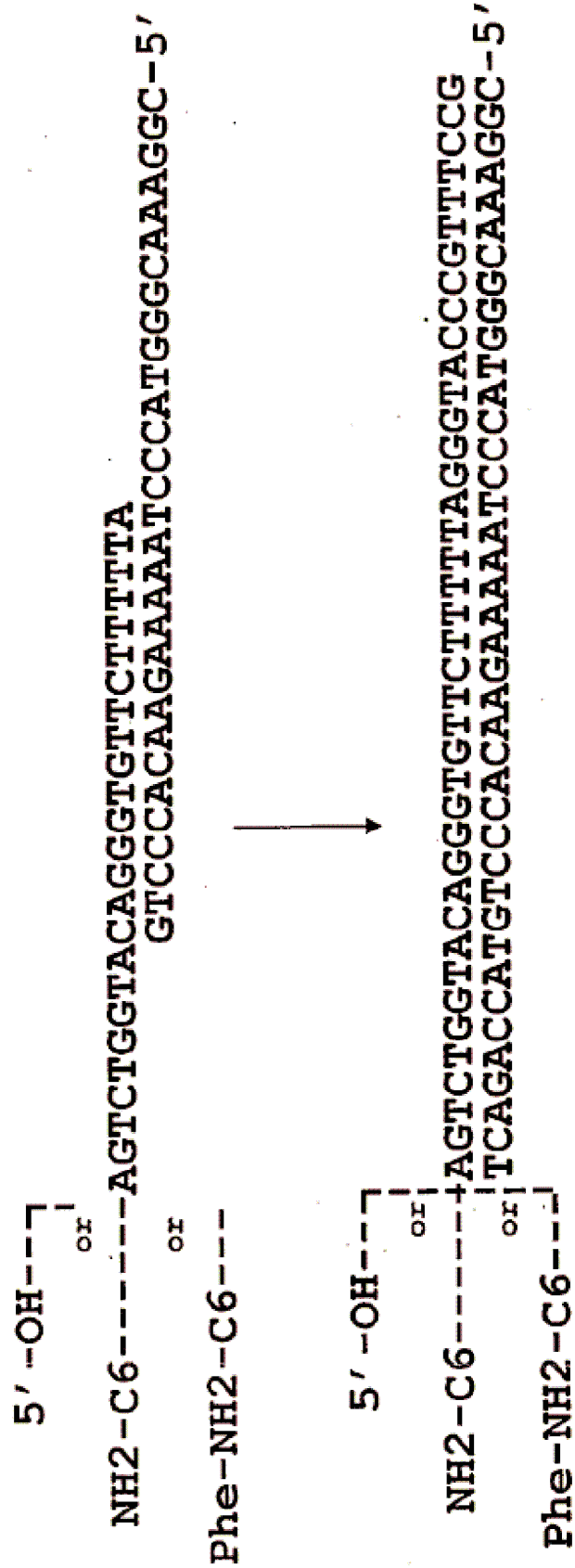


Figura 5

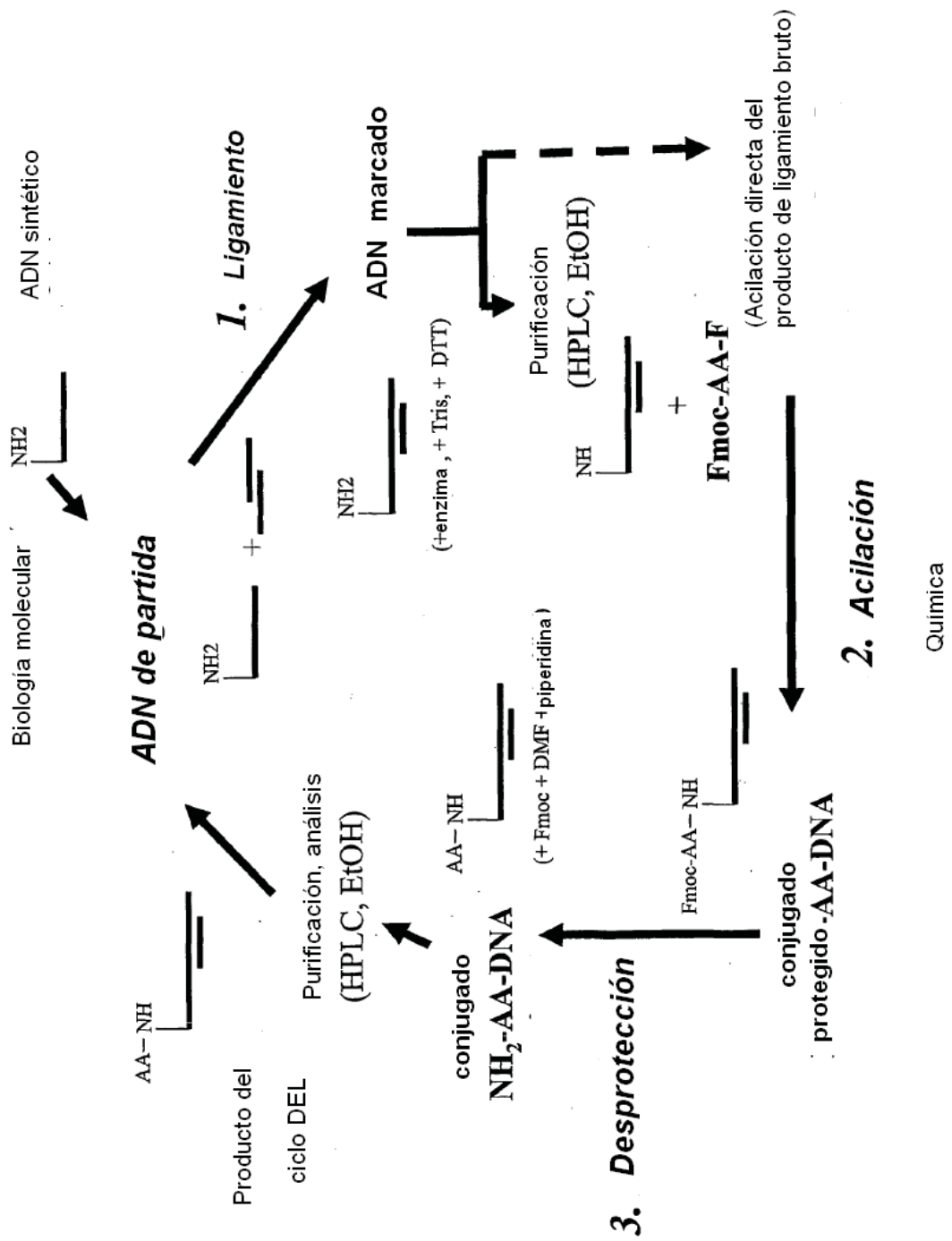
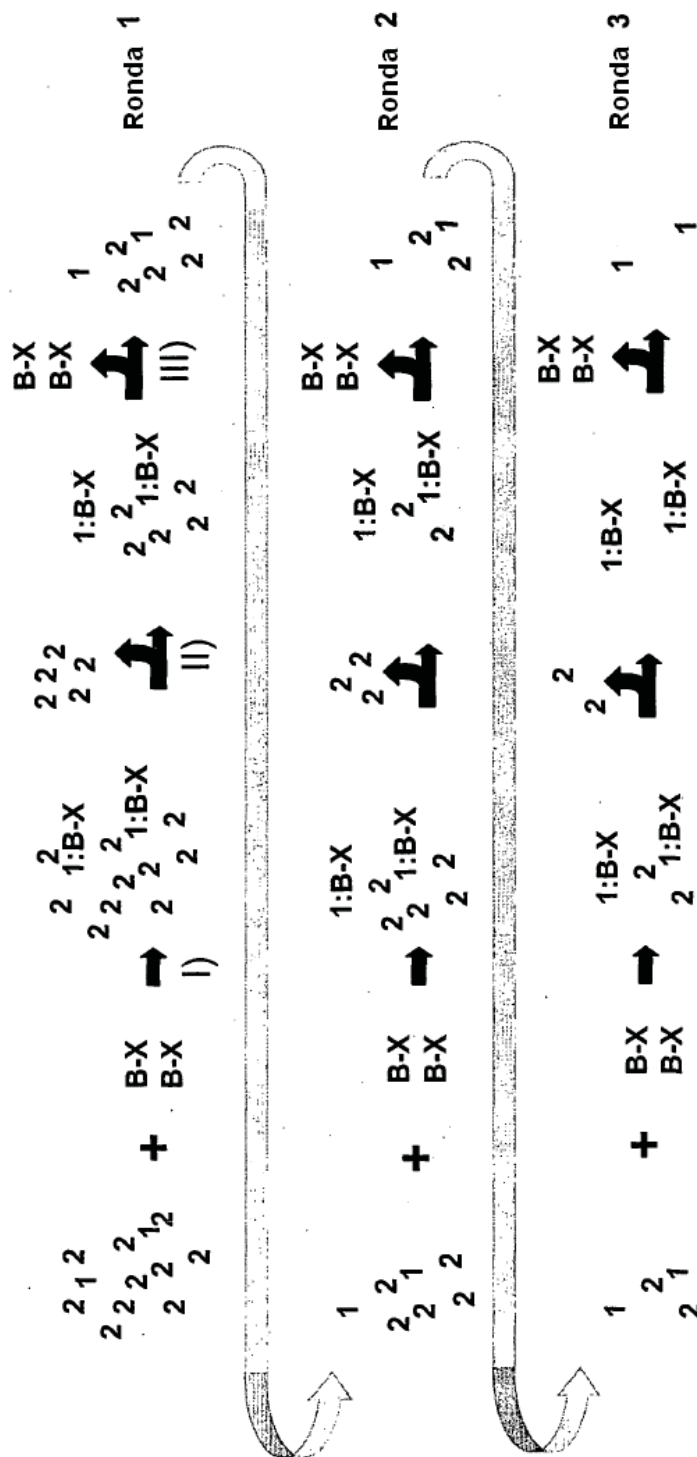


Figura 6



Leyenda

- 1 define un miembro de la biblioteca de unión a B
- 2 define un miembro de la biblioteca de no unión a B
- B define un blanco para el que se desea un miembro de la biblioteca de unión
- X define un componente que se puede separar físicamente de 1 y 2
- I) Define un evento que permite la unión de 1 a B [Unión]
- II) Define una separación física de X de los componentes de 1) [captura/lavado]
- III) Define una liberación de 1 de B [elución]

Figura 7

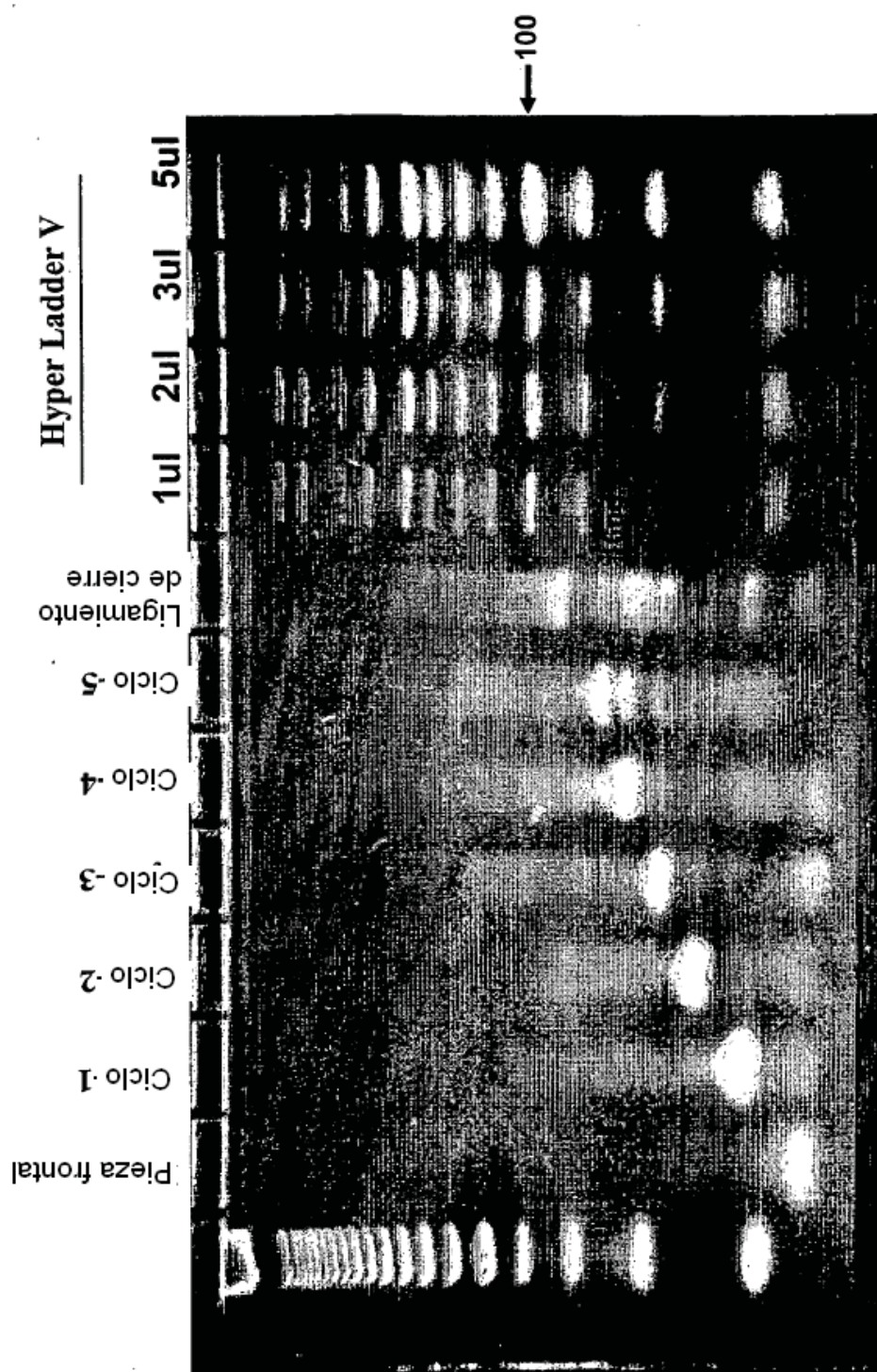


Figura 8

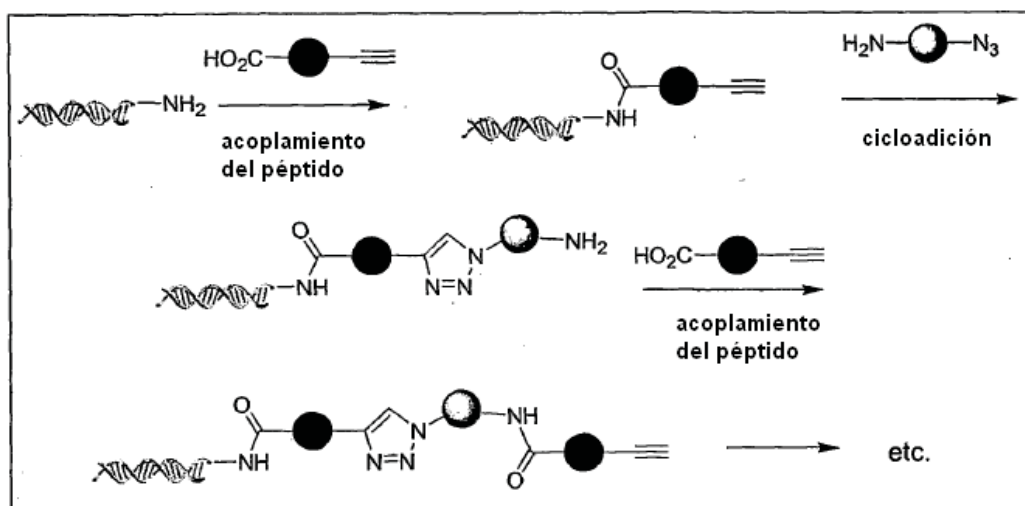


Figura 9

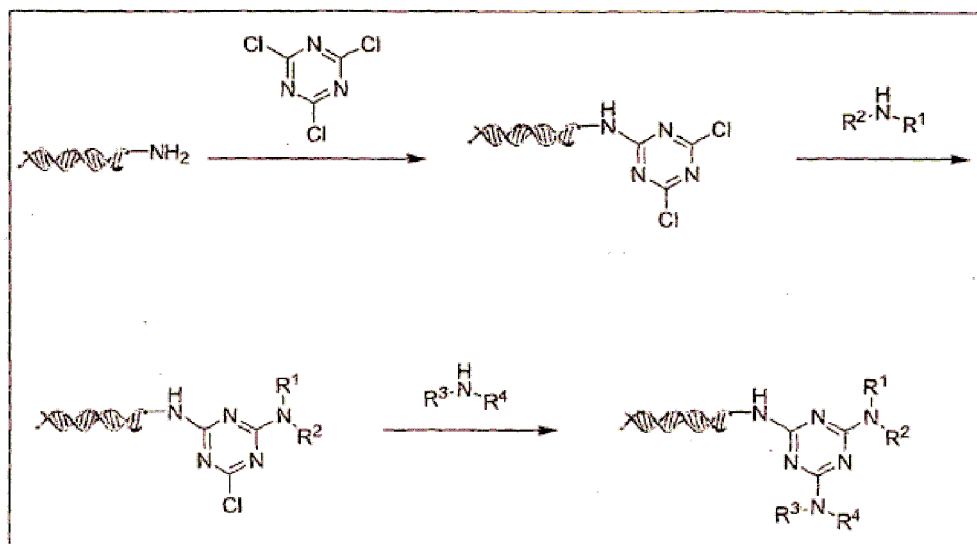


Figura 10

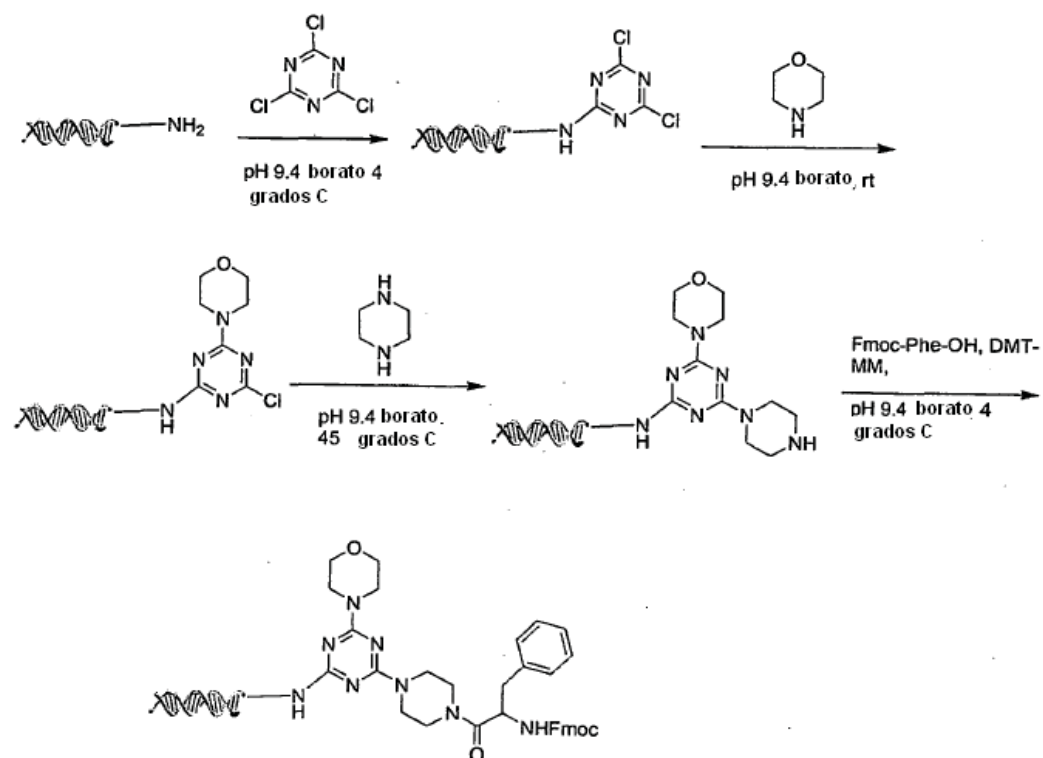


Figura 11

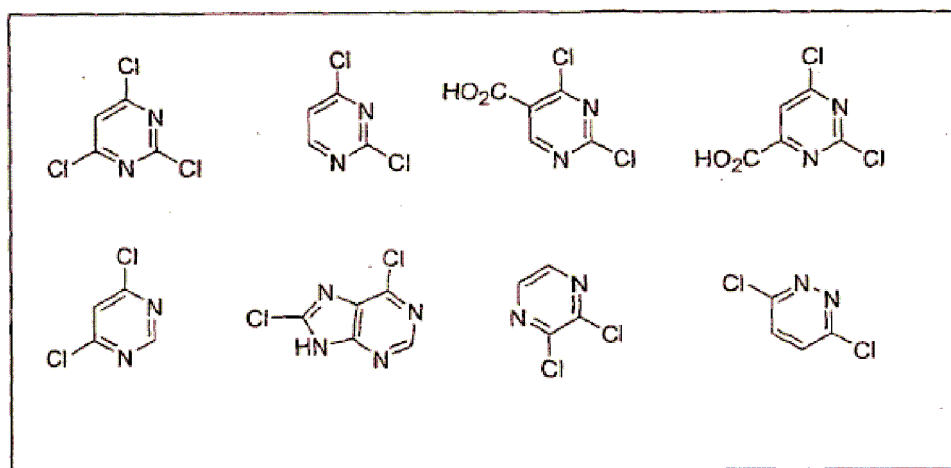


Figura 12

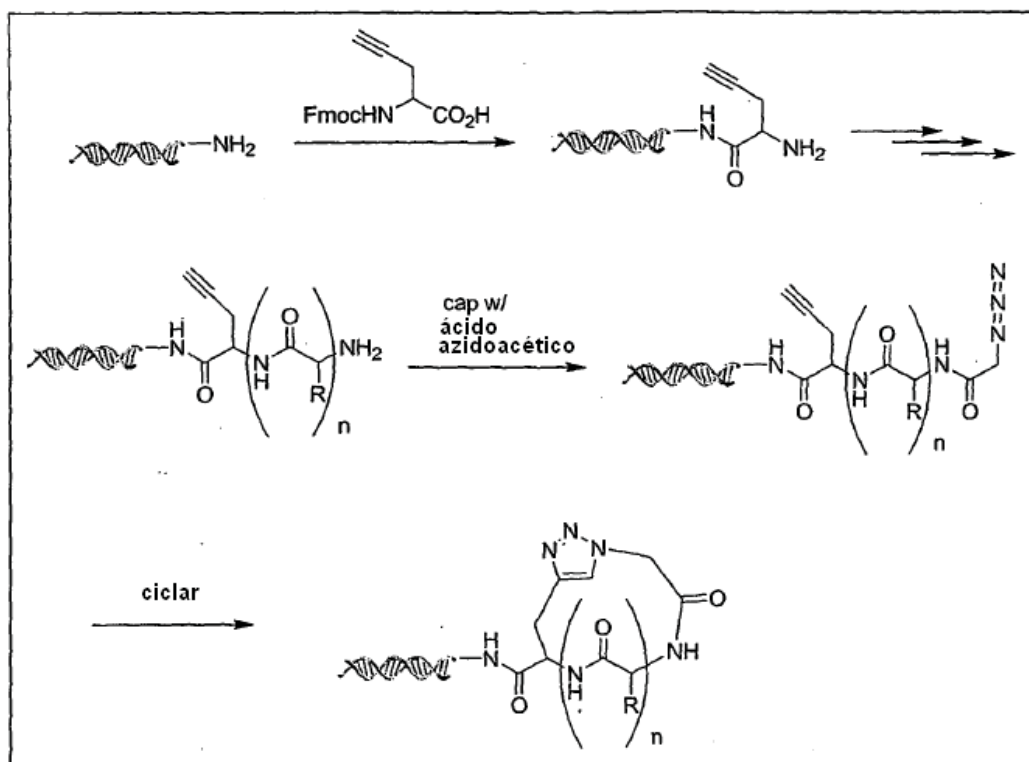


Figura 13

