

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 485**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2006 E 10075295 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 2258870**

54 Título: **Método de identificación de compuestos que se unen a una molécula diana biológica**

30 Prioridad:

09.06.2005 US 689466 P

28.10.2005 US 731041 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.04.2013

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE LLC (100.0%)
One Franklin Plaza 200 North 16th Street
Philadelphia, PA 19102, 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/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 401 485 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de identificación de compuestos que se unen a una molécula diana biológica.

Antecedentes de la invención

5 La búsqueda de métodos más eficaces de identificación de compuestos con actividades biológicas útiles ha conducido al desarrollo de métodos para cribar un gran número de compuestos distintos, presentes en colecciones denominadas bibliotecas combinatorias. Tales bibliotecas pueden incluir 10^5 o más compuestos distintos. Existe una variedad de métodos para producir bibliotecas combinatorias, y se han descrito síntesis combinatorias de péptidos, peptidomiméticos y moléculas orgánicas pequeñas.

10 Los dos desafíos principales en el uso de enfoques combinatorios en el descubrimiento de fármacos son la síntesis de bibliotecas de suficiente complejidad y la identificación de moléculas que sean activas en los cribados utilizados. 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. Por lo tanto, la química empleada en la síntesis de bibliotecas debe ser capaz de producir un gran número de compuestos dentro de un plazo de tiempo razonable. Sin embargo, para una concentración formal o global dada, el aumento del número de miembros distintos dentro de la biblioteca disminuye la concentración de cualquier miembro concreto de la biblioteca. Esto complica la identificación de moléculas activas de las bibliotecas de alta complejidad.

20 Un enfoque para superar estos obstáculos ha sido el desarrollo de bibliotecas codificadas, y especialmente bibliotecas en las que cada compuesto incluye una etiqueta amplificable. Tales bibliotecas incluyen bibliotecas codificadas por ADN, en las que puede amplificarse una etiqueta de ADN que identifica un miembro de la biblioteca utilizando técnicas de biología molecular, tal como la reacción en cadena de la polimerasa. Sin embargo, el uso de tales métodos para producir bibliotecas muy grandes está aún por demostrar, y está claro que para la realización del potencial de este enfoque para el descubrimiento de fármacos se necesitan métodos mejorados para producir tales bibliotecas.

25 El documento WO 2004/039825 se refiere a la codificación enzimática. El documento describe un método para obtener un complejo bifuncional que comprende una parte de molécula de presentación y una parte codificante, en el que un complejo bifuncional naciente que comprende un sitio de reacción química y un sitio de cebado para la adición enzimática de una etiqueta se hace reaccionar en el sitio de reacción química con uno o más reaccionantes, y provisto de la(s) etiqueta(s) respectiva(s) que identifica(n) el(los) reaccionante(s) en el sitio de cebado utilizando una o más enzimas. Además, el documento describe un método para identificar una molécula de presentación que tiene una propiedad preseleccionada, que comprende las etapas de: (i) someter la biblioteca formada a una circunstancia, en la que una molécula de presentación o un subconjunto de moléculas de presentación que tienen una propiedad predeterminada se separa del resto de la biblioteca, y (ii) identificar la(s) molécula(s) de presentación que tenga(n) una propiedad preseleccionada codificando la parte codificante del complejo.

35 El documento WO 2004/083427 se refiere a la codificación por ligación de moléculas pequeñas. El documento describe un método para sintetizar un complejo bifuncional que comprende una molécula codificada y un polinucleótido identificador que identifica las entidades químicas que han participado en la síntesis de la molécula codificada, comprendiendo dicho método una serie de etapas.

40 El Journal of the American Chemical Society, 126, 5090-5092 (2004) se refiere a la traducción de ADN a N-aciloxazolidinas sintéticas. El documento describe que la síntesis orgánica con molde de ADN (DTS) puede intervenir en diversas reacciones de síntesis para generar estructuras no relacionadas con la cadena principal de ADN, dirigir la síntesis en varias etapas de polímeros y moléculas pequeñas, permitir nuevos modos de controlar la reactividad de la síntesis que no pueden realizarse utilizando los métodos de síntesis tradicionales, y permitir la traducción, la selección *in vitro*, y la amplificación de las bibliotecas de oligonucleótidos de ADN que codifican moléculas pequeñas sintéticas. El documento también describe que el desarrollo de una síntesis con molde de ADN en varias etapas cada vez más sofisticada es fundamental para maximizar el potencial funcional de las moléculas descubiertas por métodos basados en la selección y la DTS.

50 Science, 305, 1601-1605 (2004) se refiere a la síntesis orgánica con molde de ADN y a la selección de una biblioteca de macrociclos. El documento describe un estudio en el que la traducción de bibliotecas de ácidos nucleicos a los correspondientes compuestos sintéticos permite la aplicación de los principios de selección y amplificación a moléculas hechas por el ser humano.

55 Nature, 431, 545-549, (2004) se refiere al descubrimiento de reacciones posibilitado por la síntesis con molde de ADN y la selección *in vitro*. El documento describe una reacción eficaz y moderada formadora de enlaces carbono-carbono que genera una enona a partir de un alquino y alqueno utilizando un catalizador inorgánico de paladio.

Angewandte Chemie, International Edition, 41, 4104-4108 (2002) se refiere a dirigir reacciones, de otro modo incompatibles, en una única solución utilizando la síntesis orgánica con molde de ADN. El documento describe

que los moldes de ADN pueden dirigir con especificidad de secuencia una amplia variedad de reacciones químicas sin ningún requisito estructural aparente.

Current Opinion in Chemical Biology, 8, 645-653 (2004) se refiere a la síntesis con molde de ácidos nucleicos como un sistema modelo para la antigua traducción. El documento describe que la traducción de ácidos nucleicos a estructuras sintéticas con potencial funcional ampliado ha sido objeto de una considerable investigación, con aplicaciones que incluyen la detección, el descubrimiento de la reacción y la evolución de polímeros y moléculas pequeñas. En este caso, los autores revisan las propiedades de la síntesis con molde de ácidos nucleicos en el contexto de los requisitos para la traducción prebiótica. Este análisis destaca las posibilidades químicas de los antiguos sistemas de traducción, así como los retos que estos sistemas pueden haber enfrentado.

El documento WO 2004/016767 se refiere a la evolución de una nueva función molecular. El documento describe que la naturaleza hace evolucionar moléculas biológicas tales como las proteínas por rondas repetidas de diversificación, selección y amplificación. El poder de la naturaleza y la flexibilidad de la síntesis orgánica se combinan en una síntesis con molde de ácidos nucleicos. El documento describe una variedad de arquitecturas de molde para llevar a cabo la síntesis con molde de ácidos nucleicos, métodos para aumentar la selectividad de las reacciones con molde de ácidos nucleicos, métodos para llevar a cabo reacciones con molde de ácidos nucleicos estereoselectivas, métodos de selección de los productos de reacción resultantes de la síntesis con molde de ácidos nucleicos y métodos de identificación de nuevas reacciones químicas basadas en la síntesis con molde de ácidos nucleicos.

El Journal of the American Chemical Society, 115, 3808-9, (1993) se refiere a la ligación química de oligonucleótidos en presencia y en ausencia de un molde. El documento describe un procedimiento para la construcción de sistemas de polinucleótidos complejos, permitiendo la metodología de síntesis el acoplamiento eficaz de los bloques de oligonucleótidos en ausencia, así como en presencia, de un molde.

El Journal of the American Chemical Society, 123, 8618-5619, (2001) se refiere al ensamblaje dirigido por molde de ácidos nucleicos de conjugados de metalosalen-ADN. El documento describe un esquema para la síntesis dirigida por molde de metalosalen-ADN.

El documento WO 2005/026387 se refiere a un método para obtener información estructural acerca de una molécula codificada y un método para seleccionar compuestos. El documento describe un método para obtener información estructural sobre una molécula codificada que puede producirse mediante una reacción de una pluralidad de entidades químicas y puede ser capaz de estar conectada a un oligonucleótido identificador que contiene codones informativos de la identidad de las entidades químicas que han participado en la formación de la molécula codificada.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un método de síntesis de bibliotecas de moléculas que incluyen una etiqueta de oligonucleótidos codificante. El método utiliza una estrategia de "separar y agrupar" en la que se divide ("se separa") en fracciones múltiples una solución que comprende un iniciador, que comprende un primer componente básico unido a un oligonucleótido codificante. En cada fracción, se hace reaccionar el iniciador con un segundo componente básico único, y un segundo oligonucleótido único que identifica el segundo componente básico. Estas reacciones pueden ser simultáneas o secuenciales y, si son secuenciales, cualquiera de las reacciones puede preceder a la otra. Las moléculas dimericas producidas en cada una de las fracciones se combinan ("se agrupan") y a continuación se dividen de nuevo en fracciones múltiples. A continuación se hace reaccionar cada una de estas fracciones con un tercer componente básico único (específico de fracción) y un tercer oligonucleótido único que codifica el componente básico. El número de moléculas únicas presentes en la biblioteca de productos es una función (1) del número de diferentes componentes básicos utilizados en cada etapa de la síntesis, y (2) del número de veces que se repite el proceso de división y agrupación.

En una forma de realización, la invención proporciona un método para sintetizar una molécula que comprende o consiste en un resto funcional que está unido operativamente a un oligonucleótido codificante. El método incluye las etapas de: (1) proporcionar un compuesto iniciador que consiste en un resto funcional que comprende n componentes básicos, donde n es un número entero igual a 1 o mayor, en el que el resto funcional comprende al menos un grupo reactivo y en el que el resto funcional está unido operativamente a un oligonucleótido inicial; (2) hacer reaccionar el compuesto iniciador con un componente básico que comprende al menos un grupo reactivo complementario, en el que el al menos un grupo reactivo complementario es complementario al grupo reactivo de la etapa (1), en condiciones adecuadas para la reacción del grupo reactivo y el grupo reactivo complementario para formar un enlace covalente; (3) hacer reaccionar el oligonucleótido inicial con un oligonucleótido entrante que identifica el componente básico de la etapa (b) en presencia de una enzima que cataliza la ligación del oligonucleótido inicial y el oligonucleótido entrante, en condiciones adecuadas para la ligación del oligonucleótido entrante y el oligonucleótido inicial, produciendo de ese modo una molécula que comprende o consiste en un resto funcional que comprende $n+1$ componentes básicos que está unida operativamente a un oligonucleótido codificante. Si el resto funcional de la etapa (3) comprende un grupo reactivo, pueden repetirse las etapas 1-3 una o más veces, formando de este modo los ciclos 1 a i , donde i es un número entero igual a 2 o mayor,

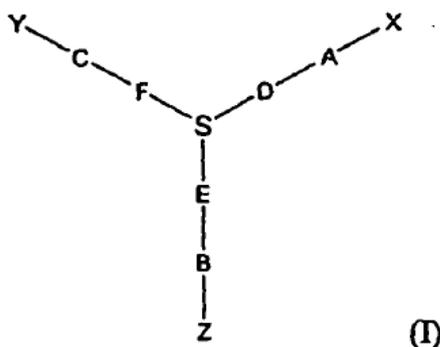
convirtiéndose el producto de la etapa (3) de un ciclo s , donde s es un número entero igual a $i-1$ o menor, en el compuesto iniciador del ciclo $s+1$.

5 En una forma de realización, la invención proporciona un método para sintetizar una biblioteca de compuestos, en la que los compuestos comprenden un resto funcional que comprende dos o más componentes básicos que está unido operativamente a un oligonucleótido que identifica la estructura del resto funcional. El método comprende las etapas de (1) proporcionar una solución que comprende m compuestos iniciadores, en la que m es un número entero igual a 1 o mayor, en la que los compuestos iniciadores consisten en un resto funcional que comprende n componentes básicos, donde n es un número entero igual a 1 o mayor, que está unido operativamente a un oligonucleótido inicial que identifica los n componentes básicos; (2) dividir la solución de la etapa (1) en r fracciones, donde r es un número entero igual a 2 o mayor; (3) hacer reaccionar los compuestos iniciadores en cada fracción con uno de los r componentes básicos, produciendo de ese modo r fracciones que comprenden compuestos que consisten en un resto funcional que comprende $n+1$ componentes básicos unidos operativamente al oligonucleótido inicial; (4) hacer reaccionar el oligonucleótido inicial en cada fracción con uno de un conjunto de r oligonucleótidos entrantes distintos en presencia de una enzima que cataliza la ligación del oligonucleótido entrante y el oligonucleótido inicial, en condiciones adecuadas para la ligación enzimática del oligonucleótido entrante y el oligonucleótido inicial, produciendo así r alícuotas que comprenden moléculas que consisten en un resto funcional que comprende $n+1$ componentes básicos unidos operativamente a un oligonucleótido alargado que codifica los $n+1$ componentes básicos. Opcionalmente, el método puede incluir adicionalmente la etapa de (5) recombinar las r fracciones producidas en la etapa (4), produciendo de ese modo una solución que comprende compuestos que consisten en un resto funcional que comprende $n+1$ componentes básicos, que está unido operativamente a un oligonucleótido alargado. Las etapas (1) a (5) pueden llevarse a cabo una o más veces para producir los ciclos 1 a i , donde i es un número entero igual a 2 o mayor. En el ciclo $s+1$, donde s es un número entero igual a $i-1$ o menor, la solución que comprende m compuestos iniciadores de la etapa (1) es la solución de la etapa (5) del ciclo s . Análogamente, los compuestos iniciadores de la etapa (1) del ciclo $s+1$ son los compuestos de la etapa (5) del ciclo s .

En una forma de realización preferente, los componentes básicos se acoplan en cada etapa utilizando reacciones químicas convencionales. Los componentes básicos pueden acoplarse para producir oligómeros o polímeros lineales o ramificados, tales como péptidos, peptidomiméticos, y peptoides, o moléculas no oligoméricas, tales como moléculas que comprenden una estructura de armazón a la que se fijan uno o más restos químicos adicionales. Por ejemplo, si los componentes básicos son restos de aminoácidos, los componentes básicos pueden acoplarse utilizando estrategias convencionales de síntesis de péptidos, tales como la síntesis en fase de solución o en fase sólida utilizando estrategias de protección/desprotección adecuadas como las conocidas en el campo. Preferentemente, los componentes básicos se acoplan utilizando la química en fase de solución. Los oligonucleótidos codificantes son oligonucleótidos monocatenarios o bicatenarios, preferentemente oligonucleótidos bicatenarios. Los oligonucleótidos codificantes son preferentemente oligonucleótidos de 4 a 12 bases o pares de bases por componente básico; los oligonucleótidos codificantes pueden acoplarse utilizando la metodología convencional de síntesis de oligonucleótidos en fase de solución o en fase sólida, pero preferentemente se acoplan utilizando un proceso enzimático en fase de solución. Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden acoplarse utilizando una topoisomerasa, una ligasa, o una ADN polimerasa, si la secuencia de los oligonucleótidos codificantes incluye una secuencia de iniciación para la ligación mediante una de estas enzimas. El acoplamiento enzimático de los oligonucleótidos codificantes ofrece las ventajas de (1) mayor precisión de adición en comparación con el acoplamiento sintético (no enzimático) convencional; y (2) el uso de una estrategia de protección/desprotección más simple.

En otro aspecto, la invención proporciona compuestos de Fórmula I:

45



50

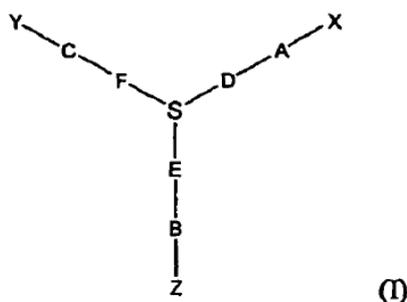
55

en la que X es un resto funcional que comprende uno o más componentes básicos; Z es un oligonucleótido fijado en su extremo terminal 3' a B ; Y es un oligonucleótido que está fijado en su extremo terminal 5' 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, independientemente, un

grupo de unión bifuncional; y S un átomo o un armazón molecular. Tales compuestos incluyen aquellos que se sintetizan utilizando los métodos de la invención.

La invención se refiere adicionalmente a una biblioteca de compuestos que comprende compuestos que comprenden un resto funcional que comprende dos o más componentes básicos que está unido operativamente a un oligonucleótido que codifica la estructura del resto funcional. Tales bibliotecas pueden comprender de aproximadamente 10^2 a aproximadamente 10^{12} o más miembros distintos, por ejemplo, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} o más miembros distintos, es decir, distintas estructuras moleculares.

En una forma de realización, la biblioteca de compuestos comprende compuestos que tienen cada uno independientemente la Fórmula I:



en la que X es un resto funcional que comprende uno o más componentes básicos; Z es un oligonucleótido fijado en su extremo terminal 3' a B; Y es un oligonucleótido que está fijado en su extremo terminal 5' 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, independientemente, un grupo de unión bifuncional; y S un átomo o un armazón molecular. Tales bibliotecas incluyen aquellas que se sintetizan utilizando los métodos de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para identificar un compuesto que se une a una diana biológica, comprendiendo dicho método las etapas de: (a) poner en contacto la diana biológica con una biblioteca de compuestos de la invención, en la que la biblioteca de compuestos incluye compuestos que comprenden un resto funcional que comprende dos o más componentes básicos que está unido operativamente a un oligonucleótido que codifica la estructura del resto funcional. Este etapa se lleva a cabo en condiciones adecuadas para que al menos un miembro de la biblioteca de compuestos se una a la diana; (2) separar los miembros de la biblioteca que no se unen a la diana; (3) amplificar los oligonucleótidos codificantes del al menos un miembro de la biblioteca de compuestos que se une a la diana; (4) secuenciar los oligonucleótidos codificantes de la etapa (3); y utilizar 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 a la diana biológica.

La presente invención proporciona varias ventajas en la identificación de moléculas que tienen una propiedad deseada. Por ejemplo, los métodos de la invención permiten el uso de una variedad de reacciones químicas para construir las moléculas en presencia de la etiqueta de oligonucleótidos. Los métodos de la invención también proporcionan un medio de gran fidelidad de incorporación de etiquetas de oligonucleótidos en las estructuras químicas así producidas. Además, permiten la síntesis de bibliotecas que tienen un gran número de copias de cada miembro, permitiendo de ese modo rondas múltiples de selección contra un diana biológica dejando al mismo tiempo un número suficiente de moléculas tras la ronda final para la amplificación y la secuencia de las etiquetas de oligonucleótidos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática de la ligación de oligonucleótidos bicatenarios, en la que el oligonucleótido inicial tiene una protuberancia que es complementaria a la protuberancia del oligonucleótido entrante. La hebra inicial se representa como libre, conjugada a un conector aminohexilo o conjugada a un resto de fenilalanina por medio de un conector aminohexilo.

La Figura 2 es una representación esquemática de la ligación de oligonucleótidos utilizando una hebra tablilla. En esta forma de realización, la tablilla es un oligonucleótido 12-mer con secuencias complementarias al oligonucleótido monocatenario inicial y al oligonucleótido entrante monocatenario.

La Figura 3 es una representación esquemática de la ligación de un oligonucleótido inicial y un oligonucleótido entrante, cuando el oligonucleótido inicial es bicatenario con hebras unidas covalentemente, y el oligonucleótido entrante es bicatenario.

5 La Figura 4 es una representación esquemática del alargamiento de oligonucleótidos utilizando una polimerasa. La hebra inicial se representa como libre, conjugada a un conector aminohexilo o conjugada a un resto de fenilalanina por medio de un conector aminohexilo.

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

10 La Figura 6 es una representación esquemática de un proceso de selección de rondas múltiples utilizando las bibliotecas de la invención.

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

15 La Figura 8 es una representación esquemática del acoplamiento de los componentes básicos utilizando la cicloadición de azida-alquino.

Las figuras 9 y 10 ilustran el acoplamiento de los componentes básicos por medio de la sustitución aromática nucleófila en una triazina clorada.

20 La Figura 11 muestra las estructuras heteroaromáticas cloradas representativas adecuadas para uso en la síntesis de los restos funcionales.

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

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

25 La Figura 13b es un espectro de masas de la biblioteca producida como se describe en el Ejemplo 2 tras el Ciclo 4.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención se refiere a métodos de producción de compuestos y bibliotecas combinatorias de compuestos, a los compuestos y a las bibliotecas producidas por medio de los métodos de la invención, y a métodos para utilizar las bibliotecas para identificar compuestos que tienen una propiedad deseada, tal como una actividad biológica deseada. La invención se refiere adicionalmente a los compuestos identificados utilizando estos métodos.

35 Se han adoptado una variedad de enfoques para producir y cribar bibliotecas combinatorias químicas. Los ejemplos incluyen métodos en los que los miembros individuales de la biblioteca están físicamente separados uno del otro, como cuando se sintetiza un único compuesto en cada uno de una multitud de recipientes de reacción. Sin embargo, estas bibliotecas se criban por lo general para un compuesto a la vez, o en a lo sumo, varios compuestos a la vez y, por lo tanto, no dan como resultado el proceso de cribado más eficaz. En otros métodos, los compuestos se sintetizan sobre soportes sólidos. Tales soportes sólidos incluyen microplacas en las que los compuestos específicos ocupan zonas específicas de la microplaca o membrana ("de posiciones direccionables"). En otros métodos, los compuestos se sintetizan en perlas, conteniendo cada perla una estructura química diferente.

40 Dos dificultades que surgen en el cribado de bibliotecas grandes son (1) el número de compuestos distintos que pueden cribarse; y (2) la identificación de los compuestos que sean activos en el cribado. En un método, los compuestos que son activos en el cribado se identifican reduciendo la biblioteca original a fracciones y subfracciones cada vez más pequeñas, seleccionando en cada caso la fracción o subfracción que contenga compuestos activos y subdividiendo adicionalmente hasta lograr una subfracción activa que contenga un conjunto de compuestos que sea suficientemente pequeño para que todos los miembros del subconjunto puedan ser individualmente sintetizados y evaluados para la actividad deseada. Esta es una actividad tediosa y lenta.

45 Otro método de realizar la deconvolución de los resultados de un cribado de la biblioteca combinatoria es utilizar bibliotecas en las que los miembros de la biblioteca están marcados con un marcador de identificación, es decir, cada marcador presente en la biblioteca se asocia con una estructura de compuesto discreta presente en la biblioteca, de manera que la identificación del marcador indica la estructura de la molécula marcada. Un enfoque para las bibliotecas marcadas utiliza etiquetas de oligonucleótidos, tal como se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N^{os}. 5.573.905, 5.708.153, 5.723.598, 6.060.596, las solicitudes PCT publicadas WO 93/06121, WO 93/20242, WO 94/13623, WO 00/23458, WO 02/074929 y WO 02/103008, y de Brenner y Lerner (Proc. Natl.

Acad. Sci. EE.UU. 89, 5381-5383 (1992), Nielsen y Janda (Métodos: A Companion to Methods in Enzymology 6, 361-371 (1994), y Nielsen, Brenner y Janda (J. Am. Chem. Soc. 115, 9812-9813 (1993)).

5 Tales etiquetas pueden amplificarse utilizando, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa, para producir muchas copias de la etiqueta e identificar la etiqueta por secuenciación. La secuencia de la etiqueta identifica a continuación la estructura de la molécula de unión, que puede sintetizarse en forma pura y someterse a ensayo. La presente invención proporciona una mejora en los métodos para producir bibliotecas codificadas por ADN, así como los primeros ejemplos de bibliotecas grandes (10^5 miembros o más) de moléculas codificadas por ADN en las que el resto funcional se sintetiza utilizando métodos de síntesis en fase de solución.

10 La presente invención proporciona métodos que permiten una síntesis fácil de bibliotecas combinatorias codificadas por oligonucleótidos, y permite un medio eficaz y de gran fidelidad de añadir una etiqueta de oligonucleótidos de este tipo a cada miembro de una vasta colección de moléculas.

15 Los métodos de la invención incluyen métodos para sintetizar moléculas bifuncionales que comprenden un primer resto ("resto funcional") compuesto por componentes básicos, y un segundo resto unido operativamente al primer resto, que comprende una etiqueta de oligonucleótidos que identifica la estructura del primer resto, es decir, la etiqueta de oligonucleótidos indica qué componentes básicos se utilizaron en la construcción del primer resto, así como el orden en el que se unieron los componentes básicos. En general, la información proporcionada por la etiqueta de oligonucleótidos es suficiente para determinar los componentes básicos utilizados para construir el resto activo. En determinadas formas de realización, la secuencia de la etiqueta de oligonucleótidos es suficiente para determinar la disposición de los componentes básicos en el resto funcional, por ejemplo, para los restos peptídicos, la secuencia de aminoácidos.

20 La expresión "resto funcional" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un resto químico que comprende uno o más componentes básicos. Preferentemente, los componentes básicos en el resto funcional no son ácidos nucleicos. El resto funcional puede ser un oligómero o polímero lineal o ramificado o cíclico o una molécula orgánica pequeña.

25 La expresión "componente básico", tal como se utiliza en el presente documento, es una unidad estructural química que está unida a otras unidades estructurales químicas o puede estar unida a otras unidades de este tipo. Cuando el resto funcional es polimérico u oligomérico, los componentes básicos son las unidades monoméricas del polímero u oligómero. Los componentes básicos pueden incluir también una estructura de armazón ("componente básico de armazón") a la que están, o pueden estar, fijadas una o más estructuras adicionales ("componentes básicos periféricos").

30 Debe entenderse que la expresión "componente básico" se utiliza en el presente documento para referirse a una unidad estructural química tal como existe en un resto funcional y también en la forma reactiva utilizada para la síntesis del resto funcional. Dentro del resto funcional, existirá un componente básico sin que se pierda ninguna porción del componente básico como consecuencia de la incorporación del componente básico en el resto funcional. Por ejemplo, en los casos en los que la reacción de formación del enlace libera una molécula pequeña (véase más adelante), el componente básico tal como existe en el resto funcional es un "resto de componente básico", es decir, el remanente del componente básico utilizado en la síntesis tras la pérdida de los átomos con los que contribuye a la molécula liberada.

35 Los componentes básicos pueden ser cualquier compuesto químico que sea complementario, es decir, los componentes básicos deben ser capaces de reaccionar entre sí para formar una estructura que comprenda dos o más componentes básicos. Por lo general, todos los componentes básicos utilizados tendrán al menos dos grupos reactivos, aunque es posible que algunos de los componentes básicos utilizados (por ejemplo, el último componente básico en un resto funcional oligomérico) tengan sólo un grupo reactivo cada uno. Los grupos reactivos en dos componentes básicos diferentes deberían 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 así sucesivamente.

40 Para los fines presentes, dos grupos reactivos son complementarios si son capaces de reaccionar entre sí para formar un enlace covalente. En una forma de realización preferente, las reacciones formadoras de enlaces se dan rápidamente en condiciones ambientales sin formación sustancial de productos secundarios. Preferentemente, un grupo reactivo dado reaccionará con un grupo reactivo complementario dado exactamente una vez. En una forma de realización, los grupos reactivos complementarios de dos componentes básicos reaccionan, por ejemplo, por medio de la sustitución nucleófila, para formar un enlace covalente. En una forma de realización, un miembro de un par de grupos reactivos complementarios es un grupo electrófilo y el otro miembro del par es un grupo nucleófilo.

45 Los grupos electrófilos y nucleófilos complementarios incluyen dos grupos cualesquiera que reaccionan por medio de la sustitución nucleófila en condiciones adecuadas para formar un enlace covalente. En la técnica se conoce una variedad de reacciones adecuadas formadoras de enlaces. Véase, por ejemplo, March, Advanced Organic Chemistry, cuarta edición, Nueva York: John Wiley and Sons (1992), capítulos 10 a 16; Carey y Sundberg,

Advanced Organic Chemistry, Parte B, Plenum (1990), capítulos 1-11; y Collman *et al.*, Principles and Applications of Organotransition Metal Chemistry, Universidad Science Books, Mill Valley, California (1987), capítulos 13 a 20.

5 Ejemplos de grupos electrófilos incluyen grupos carbonilo reactivos, tales como grupos cloruro de acilo, grupos éster, incluyendo ésteres de pentafluorofenilo carbonilo y ésteres de succinimida, grupos cetona y grupos aldehído; grupos sulfonilo reactivos, tales como grupos cloruro de sulfonilo, y grupos fosfonilo reactivos. Otros grupos electrófilos incluyen grupos isocianato, grupos haluro de alquilo y grupos epóxido terminales. Grupos nucleófilos adecuados incluyen grupos amino primarios y secundarios y grupos hidroxilo y grupos carboxilo.

10 Más adelante se exponen grupos reactivos complementarios adecuados. Un experto en la materia puede determinar fácilmente otros pares de grupos reactivos que pueden utilizarse en el presente método, y los ejemplos proporcionados en el presente documento no pretenden ser limitativos.

En una primera forma de realización, los grupos reactivos complementarios incluyen grupos carboxilo activados, grupos sulfonilo reactivos o grupos fosfonilo reactivos, o una combinación de los mismos, y grupos amino primarios o secundarios. En esta forma de realización, los grupos reactivos complementarios reaccionan en condiciones adecuadas para formar un enlace amida, sulfonamida o fosfonamidato.

15 En una segunda forma de realización, los grupos reactivos complementarios incluyen grupos epóxido y grupos amino primarios o secundarios. Un componente básico que contiene epóxido reacciona con un componente básico que contiene amina, en condiciones adecuadas para formar un enlace carbono-nitrógeno, lo que da como resultado un β -aminoalcohol.

20 En otra forma de realización, los grupos reactivos complementarios incluyen grupos aziridina y grupos amino primarios o secundarios. En condiciones adecuadas, un componente básico que contiene aziridina reacciona con un componente básico que contiene amina para formar un enlace carbono-nitrógeno, lo que da como resultado una 1,2-diamina. En una tercera forma de realización, los grupos reactivos complementarios incluyen grupos isocianato y grupos amino primarios o secundarios. Un componente básico que contiene isocianato reaccionará con un componente básico que contiene amino en condiciones adecuadas para formar un enlace carbono-nitrógeno, lo que da como resultado un grupo urea.

25 En una cuarta forma de realización, los grupos reactivos complementarios incluyen grupos isocianato y grupos hidroxilo. Un componente básico que contiene isocianato reaccionará con un componente básico que contiene hidroxilo, en condiciones adecuadas para formar un enlace carbono-oxígeno, lo que da como resultado un grupo carbamato.

30 En una quinta forma de realización, los grupos reactivos complementarios incluyen grupos amino y grupos que contienen 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.

35 En una sexta forma de realización, los grupos reactivos complementarios incluyen grupos iluro de fósforo y grupos aldehído o cetona. Un componente básico que contiene iluro de fósforo reaccionará con un componente básico que contiene aldehído o cetona en condiciones adecuadas para formar un doble enlace carbono-carbono, lo que da como resultado un alqueno.

40 En una séptima forma de realización, los grupos reactivos complementarios reaccionan por medio de la 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 de anillo de triazol. En la Figura 8 se ilustra un ejemplo del uso de esta reacción para unir dos componentes básicos. Las condiciones adecuadas para tales reacciones son conocidas en la técnica e incluyen las descritas en el documento WO 03/101972.

45 En una octava forma de realización, los grupos reactivos complementarios son un haluro de alquilo y un nucleófilo, tal 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 un carbono oxígeno (haluro de alquilo más un grupo hidroxilo o carboxilo).

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

55 Reacciones formadoras de enlaces adicionales que pueden utilizarse para unir componentes básicos en la síntesis de las moléculas y bibliotecas de la invención incluyen las que se muestran más adelante. Las reacciones que se muestra más adelante enfatizan los grupos funcionales reactivos. En los reaccionantes pueden estar

presentes diversos sustituyentes, incluyendo aquellos denominados R₁, R₂, R₃ y R₄. Las posiciones posibles que pueden estar sustituidas incluyen, pero no se limitan a, las indicadas mediante R₁, R₂, R₃ y R₄. Estos sustituyentes pueden incluir cualquier resto químico adecuado, pero se limitan preferentemente a los que no interfieran con o inhiban significativamente la reacción indicada, y, a menos que se especifique lo contrario, pueden incluir hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcoxi, ariloxi, arilalquilo, arilalquilo sustituido, amino, amino sustituido y otros como se conoce en la técnica. Los sustituyentes adecuados en estos grupos incluyen alquilo, arilo, heteroarilo, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, amino, mercapto, carboxilo, y carboxamida. Cuando se especifique, los grupos aceptores de electrones adecuados incluyen nitro, carboxilo, haloalquilo, tal como trifluorometilo y otros como se conoce en la técnica. Ejemplos de grupos donadores de electrones adecuados incluyen alquilo, alcoxi, hidroxilo, amino, halógeno, acetamido y otros como se conoce en la técnica. La adición de una amina primaria a un alqueno:

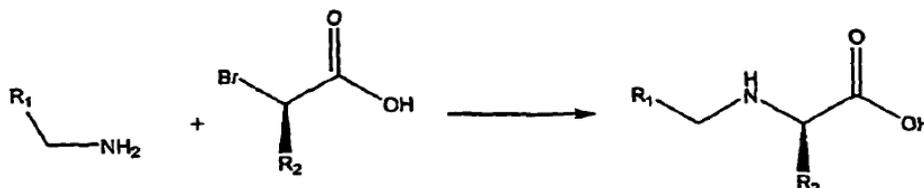
5

10



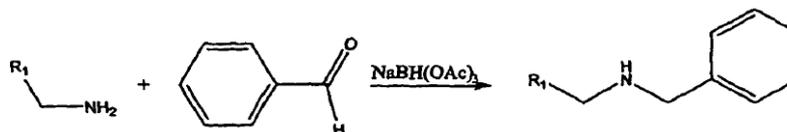
15

Sustitución nucleófila:

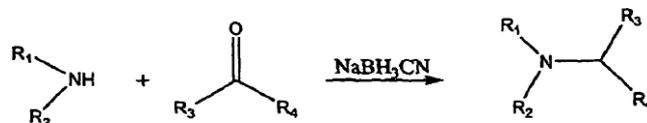


20

La alquilación reductora de una amina:

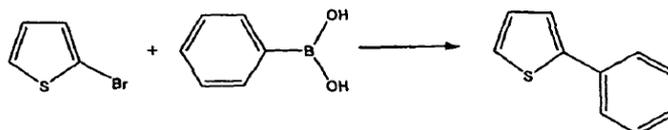


25

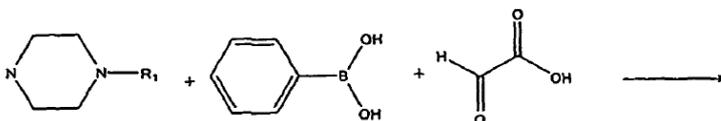


30

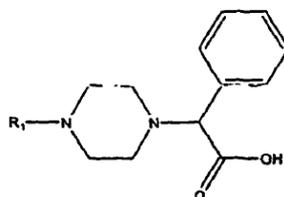
Reacciones formadoras de enlaces carbono-carbono catalizadas por paladio:



35

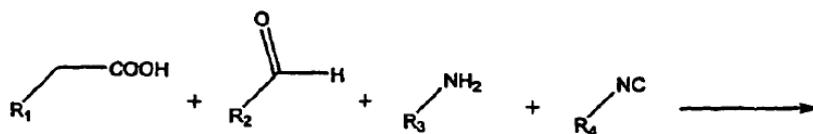


40

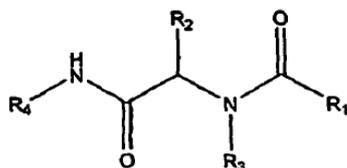


Reacciones de condensación de Ugi:

5

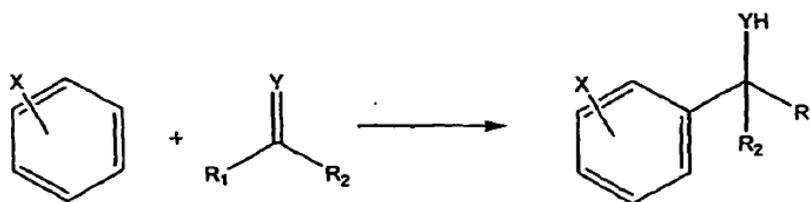


10



Reacciones de sustitución aromática electrófila:

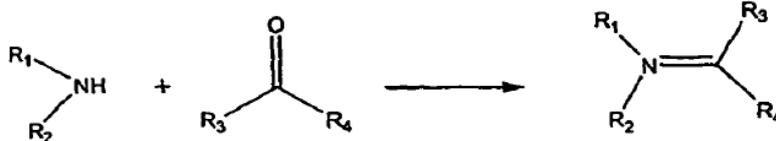
15



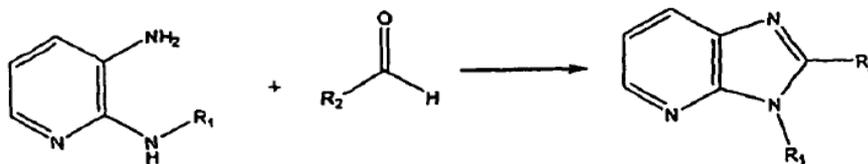
X es un grupo donador de electrones.

Reacciones formadoras de imina/iminio/enamina:

20



25

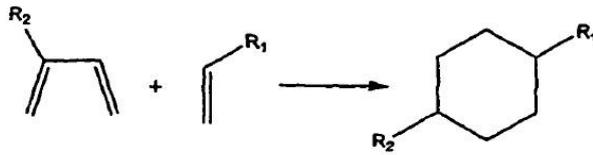


Reacciones de cicloadición:

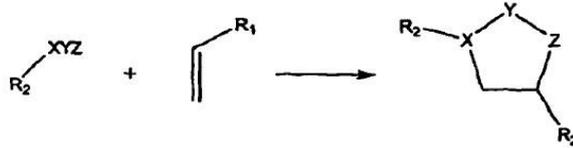
30

35

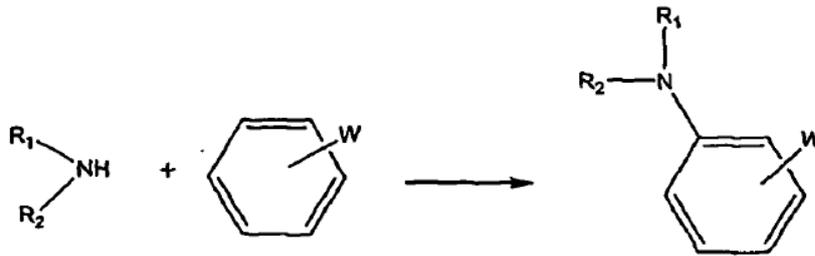
Cicloadición de Diels-Alder



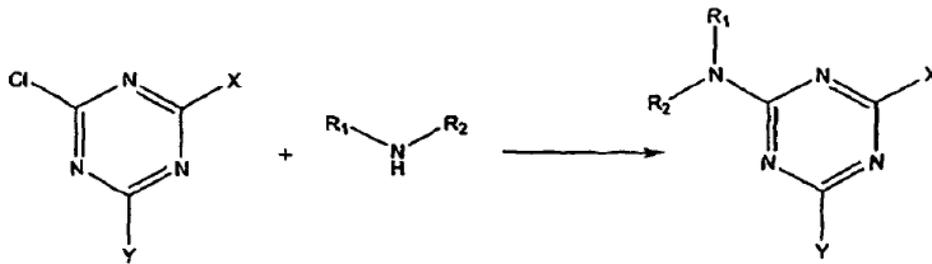
Cicloadición 1,3-dipolar, X-Y-Z = C-N-O, C-N-S, N3



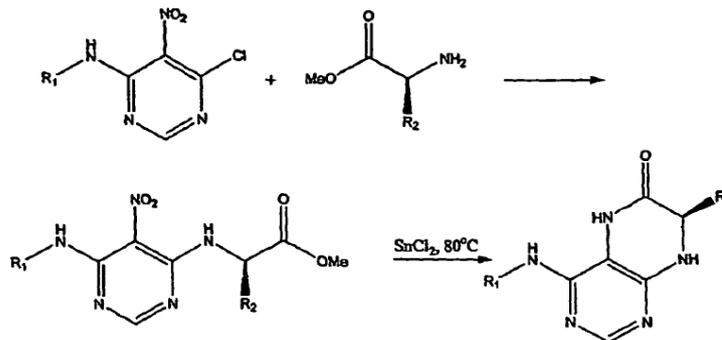
Reacciones de sustitución aromática nucleófila:



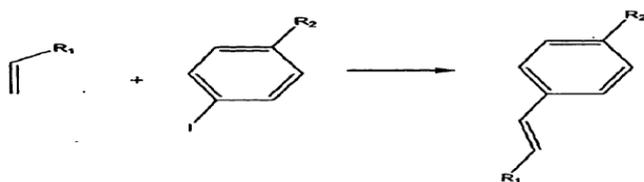
W es un grupo aceptor de electrones



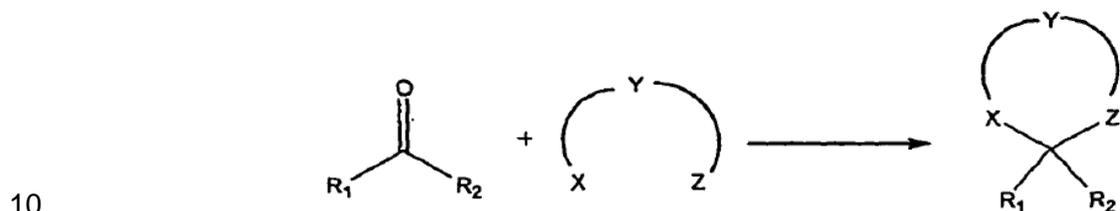
Ejemplos de sustituyentes X e Y adecuados incluyen amino sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, tioalcoxi sustituido o no sustituido, ariloxi sustituido o no sustituido y tioariloxi sustituido y no sustituido.



Reacción de Heck:

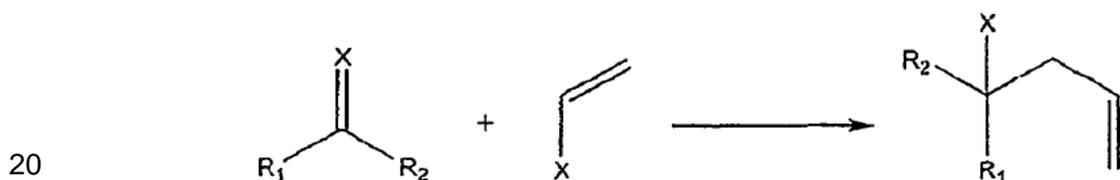


5 Formación de acetal:



Ejemplos de sustituyentes X e Y adecuados incluyen amino sustituido y no sustituido, hidroxilo y sulfhidrilo; Y es un conector que conecta X e Y, y es adecuado para formar la estructura de anillo que se encuentra en el producto de la reacción.

15 Reacciones aldólicas:



Ejemplos de sustituyentes X adecuados incluyen O, S y NR₃.

Los componentes básicos de armazón que pueden utilizarse para formar las moléculas y bibliotecas de la invención incluyen aquellos que tienen dos o más grupos funcionales que pueden participar en reacciones formadoras de enlaces con componentes básicos periféricos precursores, por ejemplo, utilizando una o más de las reacciones formadoras de enlaces analizadas anteriormente. También pueden sintetizarse restos de armazón durante la construcción de las bibliotecas y las moléculas de la invención, por ejemplo, utilizando precursores de componentes básicos que pueden reaccionar de maneras específicas para formar moléculas que comprenden un resto molecular central al que se añaden grupos funcionales periféricos. En una forma de realización, una biblioteca de la invención comprende moléculas que comprenden un resto de armazón constante, pero diferentes restos periféricos o diferentes disposiciones de restos periféricos. En determinadas bibliotecas, todos los miembros de la biblioteca comprenden un resto de armazón constante; otras bibliotecas pueden comprender moléculas que tienen dos o más restos de armazón diferentes. En la Tabla 8 se exponen ejemplos de reacciones formadoras de resto de armazón que pueden utilizarse en la construcción de las moléculas y bibliotecas de la invención.

Los grupos R₁, R₂, R₃ y R₄ están limitados sólo en cuanto a que no deben interferir con, 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 como se conoce en la técnica. Los sustituyentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, alquilo, alcoxi, tioalcoxi, nitro, hidroxilo, sulfhidrilo, ariloxi, S-arilo, halógeno, carboxi, amino, alquilamino, dialquilamino, arilamino, ciano, cianato, nitrilo, isocianato, tiocianato, carbamilo, y carbamilo sustituido.

Debe entenderse que la síntesis de un resto funcional puede continuar por medio de un tipo concreto de reacción de acoplamiento, tal como, pero sin limitarse a, una de las reacciones analizadas anteriormente, o por medio de una combinación de dos o más reacciones de acoplamiento, tales como dos o más de las reacciones de acoplamiento analizadas anteriormente. Por ejemplo, en una forma de realización, los componentes básicos se unen mediante una combinación de formación de enlace amida (grupos complementarios amino y ácido carboxílico) y aminación reductora (grupos complementarios amino y aldehído o cetona). Puede utilizarse cualquier química de acoplamiento, siempre que sea compatible con la presencia de un oligonucleótido. Las etiquetas de oligonucleótidos bicatenarios (dúplex), tal como se utilizan en determinadas formas de realización de la presente invención, son

químicamente más robustas que las etiquetas monocatenarias, y, por lo tanto, toleran una variedad más amplia de condiciones de reacción y permiten el uso de reacciones formadoras de enlaces que no serían posibles con etiquetas monocatenarias.

5 Un componente básico 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 pueden estar protegidos para evitar reacciones no deseadas de estos grupos funcionales. En la técnica se conocen grupos protectores adecuados para una variedad de grupos funcionales (Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, segunda edición, Nueva York: John Wiley and Sons (1991), incorporado en el presente documento por referencia). Los grupos protectores especialmente útiles incluyen éteres y ésteres de t-butilo, acetales, aminas y éteres de tritilo, ésteres de acetilo, éteres de trimetilsililo, ésteres y éteres de tricloroetilo y carbamatos.

10 En una forma de realización, cada componente básico comprende dos grupos reactivos, que pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, cada componente básico añadido en el ciclo s puede comprender dos grupos reactivos que son iguales, pero que son ambos complementarios a los grupos reactivos de los componentes básicos añadidos en las etapas $s-1$ y $s+1$. En otra forma de realización, cada componente básico comprende dos grupos reactivos que son a su vez complementarios. Por ejemplo, puede producirse una biblioteca que comprenda moléculas de poliamida por medio de reacciones entre componentes básicos que comprenden dos grupos amino primarios y componentes básicos que comprenden dos grupos carboxilo activados. En los compuestos resultantes no hay extremo terminal N- o C-, ya que los grupos amida alternos tienen direccionalidad opuesta. Como alternativa, puede producirse una biblioteca de poliamida utilizando componentes básicos que comprendan cada uno un grupo amino y un grupo carboxilo activado. En esta forma de realización, los componentes básicos añadidos en la etapa n del ciclo tendrán un grupo reactivo libre que es complementario al grupo reactivo disponible en el componente básico $n-1$, mientras que, preferentemente, el otro grupo reactivo en el componente básico de orden n está protegido. Por ejemplo, si los miembros de la biblioteca se sintetizan de la dirección C a la N, los componentes básicos añadidos comprenderán un grupo carboxilo activado y un grupo amino protegido.

25 Los restos funcionales pueden ser restos poliméricos u oligoméricos, tales como péptidos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos peptídicos o peptoides, o pueden ser moléculas pequeñas no poliméricas, por ejemplo, moléculas que tienen una estructura que comprende un armazón central y estructuras dispuestas alrededor de la periferia del armazón. Las bibliotecas oligoméricas o poliméricas lineales serán el resultado del uso de componentes básicos que tienen dos grupos reactivos, mientras que las bibliotecas oligoméricas o poliméricas ramificadas serán el resultado del uso de componentes básicos que tienen tres o más grupos reactivos, opcionalmente en combinación con componentes básicos que tienen sólo dos grupos reactivos. Tales moléculas pueden representarse mediante la Fórmula general $X_1X_2...X_n$, en la que cada X es una unidad monomérica de un polímero que comprende n unidades monoméricas, donde n es un número entero mayor que 1. En el caso de los compuestos oligoméricos o poliméricos, los componentes básicos terminales no necesitan comprender dos grupos funcionales. Por ejemplo, en el caso de una biblioteca de poliamida, el componente básico C-terminal puede comprender un grupo amino, pero la presencia de un grupo carboxilo es opcional. Análogamente, el componente básico en el extremo N-terminal puede comprender un grupo carboxilo, pero no necesita contener un grupo amino.

30 También pueden sintetizarse compuestos poliméricos u oligoméricos ramificados siempre que al menos un componente básico comprenda tres grupos funcionales que reaccionen con otros componentes básicos. Una biblioteca de la invención puede comprender moléculas lineales, moléculas ramificadas o una combinación de las mismas.

35 Las bibliotecas también pueden construirse utilizando, por ejemplo, un componente básico de armazón que tenga dos o más grupos reactivos, en combinación con otros componentes básicos que tengan sólo un grupo reactivo disponible, por ejemplo, en los que cualquier grupo reactivo adicional esté protegido o no reaccione con los demás grupos reactivos presentes en el componente básico de armazón. En una forma de realización, por ejemplo, las moléculas sintetizadas pueden representarse mediante la Fórmula general $X(Y)_n$, en la que X es un componente básico de armazón; cada Y es un componente básico unido a X y n es un número entero al menos igual a dos, y preferentemente un número de 2 a aproximadamente 6. En una forma de realización preferente, el componente básico inicial del ciclo 1 es un componente básico de 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.

40 En una forma de realización, las bibliotecas de la invención comprenden compuestos de poliamida. Los compuestos de poliamida puede estar compuestos de componentes básicos derivados de cualquier aminoácido, incluyendo los veinte α -aminoácidos de origen natural, tales como alanina (Ala; A), glicina (Gly; G), asparagina (Asn; N), ácido aspártico (Asp; D), 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), en los que se dan los códigos de tres letras y de una letra para cada aminoácido. En su forma natural, cada uno de los aminoácidos anteriores existe en la configuración L, que debe presumirse en el presente documento a menos que se indique lo contrario. Sin embargo, en el presente método, también pueden utilizarse las formas de configuración D de estos aminoácidos. Estos D-aminoácidos se indican en el presente documento mediante un código de una o tres letras en minúscula, es decir, ala (a), gly (g), leu (l), gln (q), thr (t), ser (s), y así sucesivamente. Los componentes básicos

también pueden derivarse de otros α -aminoácidos, incluyendo, pero sin limitarse a, 3-arilalaninas, tales como naftilalanina, fenilalaninas sustituidas con fenilo, incluyendo 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 la hidroxiprolina y fluoroprolina; denidroprolina; norleucina; O-metiltirosina; O-metilserina; O-metiltreonina y 3-ciclohexilalanina. Cada uno de los aminoácidos anteriores puede utilizarse en la configuración D- o en la configuración L-.

Los componentes básicos también pueden ser aminoácidos que no sean α -aminoácidos, tales como los α -aza-aminoácidos; β , γ , δ , ϵ ,-aminoácidos, y aminoácidos sustituidos en N, tales como glicina sustituida en N, en la que el sustituyente en N puede ser, por ejemplo, un grupo heteroarilalquilo, arilalquilo, heteroarilo, arilo o alquilo sustituido o no sustituido. En una forma de realización, el sustituyente en N es una cadena lateral de un α -aminoácido de origen natural o de origen no natural.

El componente básico también puede ser una estructura peptidomimética, tal como un mimético de dipéptido, tripéptido, tetrapéptido o pentapéptido. Tales componentes básicos peptidomiméticos se derivan preferentemente de compuestos aminoacilo, de manera que la química de adición de estos componentes básicos al grupo poli(aminoacilo) en crecimiento es la misma que, o similar a, la química utilizada para los demás componentes básicos. Los componentes básicos también pueden ser moléculas que sean capaces de formar enlaces que sean isostéricos con un enlace peptídico, para formar restos funcionales peptidomiméticos que comprenden una modificación de la cadena principal del péptido, 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 $\psi[(\text{E}) \text{ o } (\text{Z}) \text{CH}=\text{CH}]$. En la nomenclatura utilizada anteriormente, ψ indica la ausencia de un enlace amida. La estructura que reemplaza al grupo amida se especifica dentro de los corchetes.

En una forma de realización, la invención proporciona un método para sintetizar un compuesto que comprende o consiste en un resto funcional que está unido operativamente a un oligonucleótido codificante. El método incluye las etapas de: (1) proporcionar un compuesto iniciador que consiste en un resto funcional inicial que comprende n componentes básicos, donde n es un número entero igual a 1 o mayor, en el que el resto funcional inicial comprende al menos un grupo reactivo, y en el que el resto funcional inicial está unido operativamente a un oligonucleótido inicial que codifica los n componentes básicos; (2) hacer reaccionar el compuesto iniciador con un componente básico que comprende al menos un grupo reactivo complementario, en el que el al menos un grupo reactivo complementario es complementario al grupo reactivo de la etapa (1), en condiciones adecuadas para que la reacción del grupo reactivo y el grupo reactivo complementario forme un enlace covalente; (3) hacer reaccionar el oligonucleótido inicial con un oligonucleótido entrante en presencia de una enzima que cataliza la ligación del oligonucleótido inicial y el oligonucleótido entrante, en condiciones adecuadas para la ligación del oligonucleótido entrante y el oligonucleótido inicial, produciendo de ese modo una molécula que comprende o consiste en un resto funcional que comprende n+1 componentes básicos que está unido operativamente a un oligonucleótido codificante. Si el resto funcional de la etapa (3) comprende un grupo reactivo, las etapas 1-3 pueden repetirse una o más veces, formando de este modo los ciclos 1 a i, donde i es un número entero igual a 2 o mayor, convirtiéndose el producto de la etapa (3) de un ciclo s-1, donde s es un número entero igual a i o menor, en el compuesto iniciador de la etapa (1) del ciclo s. En cada ciclo, se añade un componente básico al resto funcional en crecimiento y se añade una secuencia de oligonucleótidos, que codifica el nuevo componente básico, al oligonucleótido codificante en crecimiento.

En una forma de realización, el(los) compuesto(s) iniciador(es) inicial(es) se genera(n) por reacción de un primer componente básico con un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido que incluye secuencias de cebador de PCR o un oligonucleótido inicial) o con un conector al que se fija un oligonucleótido de dicho tipo. En la forma de realización expuesta en la Figura 5, el conector comprende un grupo reactivo para la fijación de un primer componente básico y está fijado a un oligonucleótido inicial. En esta forma de realización, la reacción de un componente básico, o en cada una de varias alícuotas, uno de una colección de componentes básicos, con el grupo reactivo del conector y la adición de un oligonucleótido que codifica el componente básico al oligonucleótido inicial produce el uno o más componentes iniciadores del proceso expuesto anteriormente.

En una forma de realización preferente, cada componente básico individual está asociado con un oligonucleótido distinto, de manera que la secuencia de nucleótidos en el oligonucleótido añadido en un ciclo dado identifica el componente básico añadido en el mismo ciclo.

El acoplamiento de los componentes básicos y la ligación de los oligonucleótidos se darán generalmente a concentraciones similares de reactivos y materiales de partida. Por ejemplo, para tener un acoplamiento eficaz de los componentes básicos, resultan preferentes concentraciones de los reaccionantes del orden de micromoles a milimoles, por ejemplo de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 10 mM.

En determinadas formas de realización, el método comprende adicionalmente, tras la etapa (2), la etapa de neutralización de cualquier resto funcional inicial sin reaccionar. La neutralización de cualquier resto funcional inicial sin reaccionar en un ciclo concreto evita que el resto funcional inicial del ciclo reaccione con un componente básico añadido en un ciclo posterior. Tales reacciones podrían conducir a la generación de restos funcionales a los que les falta uno o más componentes básicos, conduciendo potencialmente a una variedad de estructuras de resto funcional que corresponden a una secuencia de oligonucleótidos concreta. Tal neutralización puede lograrse por reacción de

cualquier resto funcional inicial restante con un compuesto que reacciona con el grupo reactivo de la etapa (2). Preferentemente, el compuesto neutralizante reacciona rápidamente con el grupo reactivo de la etapa (2) y no incluye grupos reactivos adicionales que puedan reaccionar con los componentes básicos añadidos en ciclos posteriores. Por ejemplo, en la síntesis de un compuesto en el que el grupo reactivo de la etapa (2) es un grupo amino, un compuesto neutralizante adecuado es un éster de N-hidroxisuccinimida, tal como el éster de N-hidroxisuccinimida de ácido acético.

En otra forma de realización, la invención proporciona un método para producir una biblioteca de compuestos, en la que cada compuesto comprende un resto funcional que comprende dos o más restos de componente básico que está unido operativamente a un oligonucleótido. En una forma de realización preferente, el oligonucleótido presente en cada molécula proporciona información suficiente para identificar los componentes básicos dentro de la molécula y, opcionalmente, el orden de adición de los componentes básicos. En esta forma de realización, el método de la invención comprende un método para sintetizar una biblioteca de compuestos, en la que los compuestos comprenden un resto funcional que comprende dos o más componentes básicos que está unido operativamente a un oligonucleótido que identifica la estructura del resto funcional. El método comprende las etapas de (1) proporcionar una solución que comprende m compuestos iniciadores, donde m es un número entero igual a 1 o mayor, en los que los compuestos iniciadores consisten en un resto funcional que comprende n componentes básicos, donde n es un número entero igual a 1 o mayor, que está unido operativamente a un oligonucleótido inicial que identifica los n componentes básicos; (2) dividir la solución de la etapa (1) en al menos r fracciones, donde r es un número entero igual a 2 o mayor, (3) hacer reaccionar cada fracción con uno de los r componentes básicos, produciendo de ese modo r fracciones que comprenden compuestos que consisten en un resto funcional que comprende n+1 componentes básicos unidos operativamente al oligonucleótido inicial; (4) hacer reaccionar cada una de las r fracciones de la etapa (3) con uno de un conjunto de r oligonucleótidos entrantes distintos en condiciones adecuadas para la ligación enzimática del oligonucleótido entrante al oligonucleótido inicial, produciendo de ese modo r fracciones que comprenden moléculas que consisten en un resto funcional que comprende n+1 componentes básicos unidos operativamente a un oligonucleótido alargado que codifica los n+1 componentes básicos. Opcionalmente, el método puede incluir adicionalmente la etapa de (5) recombinar las r fracciones, producidas en la etapa (4), produciendo de ese modo una solución que comprende moléculas que consisten en un resto funcional que comprende n+1 componentes básicos, que está unido operativamente a un oligonucleótido alargado que codifica los n+1 componentes básicos. Las etapas (1) a (5) pueden llevarse a cabo una o más veces para producir los ciclos 1 a i, donde i es un número entero igual a 2 o mayor. En el ciclo s+1, donde s es un número entero igual a i-1 o menor, la solución que comprende m compuestos iniciadores de la etapa (1) es la solución de la etapa (5) del ciclo s. Análogamente, los compuestos iniciadores de la etapa (1) del ciclo s+1 son los productos de la etapa (4) del ciclo s.

Preferentemente, la solución de la etapa (2) se divide en r fracciones en cada ciclo de la síntesis de la biblioteca. En esta forma de realización, cada fracción se hace reaccionar con un único componente básico.

En los métodos de la invención, el orden de adición del componente básico y el oligonucleótido entrante no es fundamental, y las etapas (2) y (3) de la síntesis de una molécula, y las etapas (3) y (4) de la síntesis de la biblioteca pueden invertirse, es decir, el oligonucleótido entrante puede ligarse al oligonucleótido inicial antes de añadir el nuevo componente básico. En determinadas formas de realización, puede ser posible llevar a cabo estas dos etapas simultáneamente.

En determinadas formas de realización, el método comprende adicionalmente, tras la etapa (2), la etapa de neutralización de cualquier resto funcional inicial sin reaccionar. La neutralización de cualquier resto funcional inicial sin reaccionar en un ciclo concreto evita que el resto funcional inicial de un ciclo reaccione con un componente básico añadido en un ciclo posterior. Tales reacciones pueden conducir a la generación de restos funcionales a los que le falta uno o más componentes básicos, conduciendo potencialmente a una variedad de estructuras de resto funcional que corresponden a una secuencia de oligonucleótidos concreta. Tal neutralización puede lograrse por reacción de cualquier resto funcional inicial restante con un compuesto que reaccione con el grupo reactivo de la etapa (2). Preferentemente, el compuesto neutralizante reacciona rápidamente con el grupo reactivo de la etapa (2) y no incluye grupos reactivos adicionales que puedan reaccionar con los componentes básicos añadidos en ciclos posteriores. Por ejemplo, en la síntesis de un compuesto en el que el grupo reactivo de la etapa (2) es un grupo amino, un compuesto neutralizante adecuado es un éster de N-hidroxisuccinimida, tal como éster de N-hidroxisuccinimida de ácido acético.

En una forma de realización, los componentes básicos utilizados en la síntesis de la biblioteca se seleccionan a partir de un conjunto de componentes básicos candidatos evaluando la capacidad de los componentes básicos candidatos para reaccionar con los grupos funcionales complementarios adecuados en las condiciones utilizadas para la síntesis de la biblioteca. A continuación pueden seleccionarse los componentes básicos que demuestren ser adecuadamente reactivos en tales condiciones para su incorporación a la biblioteca. Opcionalmente, los productos de un ciclo dado pueden purificarse. Cuando el ciclo es un ciclo intermedio, es decir, cualquier ciclo antes del ciclo final, estos productos son productos intermedios y pueden purificarse antes de iniciarse el siguiente ciclo. Si el ciclo es el ciclo final, los productos del ciclo son los productos finales, y pueden purificarse antes de cualquier uso de los compuestos. Esta etapa de purificación puede separar, por ejemplo, los reaccionantes sin reaccionar o en exceso y la enzima empleada para la ligación de oligonucleótidos. Puede utilizarse cualquier método

que sea adecuado para la separación de los productos de otras especies presentes en solución, incluyendo la cromatografía de líquidos, tal como la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) y la precipitación con un codisolvente adecuado, tal como etanol. Los métodos adecuados para la purificación dependerán de la naturaleza de los productos y del sistema disolvente utilizado para la síntesis.

5 Las reacciones se llevan a cabo, preferentemente, en solución acuosa, tal como una solución acuosa tamponada, pero también pueden llevarse a cabo en medios mixtos acuosos/orgánicos coherentes con las propiedades de solubilidad de los componentes básicos, los oligonucleótidos, los productos intermedios y los productos finales y la enzima utilizada para catalizar la ligación de oligonucleótidos.

10 Debe entenderse que el número teórico de compuestos producidos por un ciclo dado en el método descrito anteriormente es el producto del número de compuestos iniciadores diferentes; m, utilizado en el ciclo y el número de componentes básicos distintas añadidos en el ciclo, r. El número real de compuestos distintos producidos en el ciclo puede ser tan alto como el producto de r y m ($r \times m$), pero podría ser menor, dadas las diferencias de reactividad de determinados componentes básicos con determinados otros componentes básicos. Por ejemplo, la cinética de adición de un componente básico concreto respecto a un compuesto iniciador concreto puede ser tal que
15 en la escala de tiempo del ciclo de síntesis, puede producirse poco o nada del producto de esa reacción.

En determinadas formas de realización, se añade un componente básico común antes del ciclo 1, después del último ciclo o entre dos ciclos cualesquiera. Por ejemplo, cuando el resto funcional es una poliamida, puede añadirse un componente básico de protección N-terminal común tras el ciclo final. También puede introducirse un componente básico común entre dos ciclos cualesquiera, por ejemplo, para añadir un grupo funcional, tal como un grupo azida o alquino, que puede utilizarse para modificar los restos funcionales, por ejemplo, por ciclación, tras la síntesis de la biblioteca.
20

La expresión "unido operativamente", tal como se utiliza en el presente documento, significa que dos estructuras químicas están unidas entre sí de tal manera que permanecen unidas a través de las diversas manipulaciones que se espera que experimenten. Por lo general, el resto funcional y el oligonucleótido codificante están unidos covalentemente por medio de un grupo de unión apropiado. El grupo de unión es un resto bivalente con un sitio de fijación para el oligonucleótido y un sitio de fijación para el resto funcional. Por ejemplo, cuando el resto funcional es un compuesto de poliamida, el compuesto de poliamida puede fijarse 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 al menos un átomo, y preferentemente, más de un átomo, tal como al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis átomos. Preferentemente, el grupo de unión es suficientemente flexible para permitir que el compuesto de poliamida se una a las moléculas diana de una manera que sea independiente del oligonucleótido.
25

En una forma de realización, el grupo de unión está fijado al extremo N-terminal del compuesto de poliamida y al grupo 5'-fosfato del oligonucleótido. Por ejemplo, el grupo de unión puede derivarse de un precursor de grupo de unión que comprenda un grupo carboxilo activado en un extremo y un éster activado en el otro extremo. La reacción del precursor de grupo de unión con el átomo de nitrógeno N-terminal formará un enlace amida que conecta el grupo de unión al compuesto de poliamida o al componente básico N-terminal, mientras que la reacción del precursor de grupo de unión con el grupo hidroxilo 5' del oligonucleótido dará lugar a la fijación del oligonucleótido al grupo de unión por medio de un enlace éster. El grupo de unión puede comprender, por ejemplo, una cadena de polimetileno, tal como una cadena $-(CH_2)_n-$ o una cadena de poli(etilenglicol), tal como una cadena $-(CH_2CH_2O)_n-$, en la que en ambos casos n es un número entero de 1 a aproximadamente 20. Preferentemente, n es de 2 a aproximadamente 12, más preferentemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 10. En una forma de realización, el grupo de unión comprende un grupo hexametileno $-(CH_2)_6-$.
30

Cuando los componentes básicos son restos de aminoácidos, el resto funcional resultante es una poliamida. Los aminoácidos pueden acoplarse utilizando cualquier química adecuada para la formación de enlaces amida. Preferentemente, el acoplamiento de los componentes básicos de aminoácidos se lleva a cabo en condiciones que sean compatibles con la ligación enzimática de los oligonucleótidos, por ejemplo, de pH neutro o casi neutro, y en solución acuosa. En una forma de realización, el compuesto de poliamida se sintetiza de la dirección C-terminal a la N-terminal. En esta forma de realización, el componente básico primero, o C-terminal, está acoplado en su grupo carboxilo a un oligonucleótido por medio de un grupo de unión adecuado. Se hace reaccionar el primer componente básico con el segundo componente básico, que preferentemente tiene un grupo carboxilo activado y un grupo amino protegido. Puede utilizarse cualquier estrategia de grupo activador/protector que sea adecuada para la formación de enlaces amida en fase de solución. Por ejemplo, las especies carboxilo activado adecuadas incluyen fluoruros de acilo (Patente de EE.UU. Nº 5.360.928, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad), anhídridos simétricos y ésteres de N-hidroxisuccinimida. Los grupos acilo también pueden activarse *in situ*, como se conoce en la técnica, por reacción con un compuesto activador adecuado. Los compuestos activadores adecuados incluyen dicitlohexilcarbodiimida (DCC), diisopropilcarbodiimida (DIC), 1-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), anhídrido n-propano-fosfónico (PPA), cloruro de N,N-bis(2-oxo-3-oxazolidinil)imido-fosforil (BOP-Cl), hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino fosfonio (PyBrop), difenilfosforilazida (DPPA), reactivo de Castro (BOP, PyBop), sales de O-benzotriazolil-N,N,N,N-tetrametiluronio (HBTU), cianuro de dietilfosforilo (DEPCN), dióxido de
35
40
45
50
55
60

2,5-difenil-2,3-dihidro-3-oxo-4-hidroxi-tiofeno (reactivo de Steglich; HOTDO), 1,1'-carbonil-diimidazol (CDI), y cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMT-MM). Los reactivos de acoplamiento pueden emplearse en solitario o en combinación con aditivos tales como N,N-dimetil-4-aminopiridina (DMAP), N-hidroxi-benzotriazol (HOBt), N-hidroxi-benzotriazina (HOObt), N-hidroxisuccinimida (HOSu) N-hidroxiabenzotriazol (HOAt), sales de azabenzotriazolil-tetrametiluronio (HATU, HAPyU) o 2-hidroxipiridina. En determinadas formas de realización, la síntesis de una biblioteca requiere el uso de dos o más estrategias de activación, para permitir el uso de un conjunto estructuralmente diverso de componentes básicos. Para cada componente básico, un experto en la materia puede determinar la estrategia de activación adecuada.

El grupo protector N-terminal puede ser cualquier grupo protector que sea compatible con las condiciones del proceso, por ejemplo, grupos protectores que sean adecuados para las condiciones de síntesis en fase de solución. Un grupo protector preferente es el grupo fluorenilmetoxicarbonilo ("Fmoc"). Cualquier grupo funcional potencialmente reactivo en la cadena lateral del componente básico aminoácido también puede necesitar estar adecuadamente protegido. Preferentemente, el grupo protector de cadena lateral es ortogonal al grupo protector N-terminal, es decir, el grupo protector de cadena lateral se elimina en condiciones que sean diferentes de las necesarias para la eliminación del grupo protector N-terminal. Los grupos protectores de cadena lateral adecuados incluyen el grupo nitroveratrilo, que puede utilizarse para proteger los grupos carboxilo de cadena lateral y los grupos amino de cadena lateral. Otro grupo protector amina de cadena lateral adecuado es el grupo N-pent-4-enoilo.

Los componentes básicos pueden modificarse tras la incorporación en el resto funcional, por ejemplo, mediante una reacción adecuada que implica un grupo funcional en uno o más de los componentes básicos. La modificación del componente básico puede tener lugar tras la adición del componente básico final o en cualquier punto intermedio de la síntesis del resto funcional, por ejemplo, después de cualquier ciclo del proceso de síntesis. Cuando se sintetiza una biblioteca de moléculas bifuncionales de la invención, la modificación de los componentes básicos puede llevarse a cabo en toda la biblioteca o en una parte de la biblioteca, aumentando de ese modo el grado de complejidad de la biblioteca. Las reacciones adecuadas de modificación de los componentes básicos incluyen aquellas reacciones que pueden realizarse en condiciones compatibles con el resto funcional y el oligonucleótido codificante. Ejemplos de tales reacciones incluyen la acilación y la sulfonación de grupos amino o grupos hidroxilo, la alquilación de grupos amino, la esterificación o tioesterificación de grupos carboxilo, la amidación de grupos carboxilo, la epoxidación de alquenos, y otras reacciones como se conocen la técnica. Cuando el resto funcional incluye un componente básico que tiene un grupo funcional azida o alquino, puede utilizarse la reacción de cicloadición de azida/alquino para derivatizar el componente básico. Por ejemplo, puede hacerse reaccionar un componente básico que incluye un alquino con una azida orgánica, o puede hacerse reaccionar un componente básico que incluye una azida con un alquino, formándose en cualquiera de los casos un triazol. Las reacciones de modificación de los componentes básicos pueden tener lugar después de la adición del componente básico final o en un punto intermedio del proceso de síntesis, y pueden utilizarse para añadir una variedad de estructuras químicas al resto funcional, incluyendo hidratos de carbono, restos de unión metálicos, y estructuras que se dirijan a determinadas biomoléculas o tipos de tejidos.

En otra forma de realización, el resto funcional comprende una serie lineal de componentes básicos y esta serie lineal se cicla utilizando una reacción adecuada. Por ejemplo, si al menos dos componentes básicos de la serie lineal incluyen grupos sulfhidrilo, los grupos sulfhidrilo pueden ser oxidados para formar un enlace disulfuro, ciclando de ese modo la serie lineal. Por ejemplo, los restos funcionales pueden ser oligopéptidos que incluyen dos o más restos cisteína L o D y/u homocisteína L o D. Los componentes básicos también pueden incluir otros grupos funcionales capaces de reaccionar entre sí para ciclar la serie lineal, tales como grupos carboxilo y grupos amino o hidroxilo.

En una forma de realización preferente, uno de los componentes básicos en la serie lineal comprende un grupo alquino y otro componente básico en la serie lineal comprende un grupo azida. Los grupos azida y alquino pueden introducirse para que reaccionen por medio de cicloadición, lo que da como resultado la formación de una estructura macrocíclica. En el ejemplo ilustrado en la Figura 9, el resto funcional es un polipéptido que comprende un componente básico de propargilglicina en su extremo C-terminal y un grupo azidoacetilo en su extremo N-terminal. La reacción del alquino y el grupo azida en condiciones adecuadas da como resultado la formación de un compuesto cíclico, que incluye una estructura triazol en el macrociclo. En el caso de una biblioteca, en una forma de realización, cada miembro de la biblioteca comprende componentes básicos que contienen alquino y azida y pueden ciclarse de esta manera. En una segunda forma de realización, todos los miembros de la biblioteca comprenden componentes básicos que contienen alquino y azida, pero sólo se cicla una porción de la biblioteca. En una tercera forma de realización, sólo determinados restos funcionales incluyen componentes básicos que contienen alquino y azida, y sólo se ciclan estas moléculas. En las formas de realización segunda y tercera anteriores, la biblioteca, tras la reacción de cicloadición, incluirá restos funcionales cíclicos y lineales.

En algunas formas de realización de la invención en las que se añade el mismo resto funcional, por ejemplo, triazina, a todas y cada una de las fracciones de la biblioteca durante una etapa de síntesis concreta, puede no ser necesario añadir una etiqueta de oligonucleótidos que codifique ese resto funcional.

Los oligonucleótidos pueden ligarse por métodos químicos o enzimáticos. En una forma de realización, los oligonucleótidos se ligan por medios químicos. La ligación química de ADN y ARN puede realizarse utilizando

reactivos tales como bromuro de cianógeno y carbodiimida soluble en agua tal como se ilustra en, por ejemplo, Shabarova, *et al.* (1991) *Nucleic Acids Research*, 19, 4247-4251), Federova, *et al.* (1996) *Nucleosides and Nucleotides*, 15, 1137-1147, y Carriero y Damha (2003) *Journal of Organic Chemistry*, 68, 8328-8338. En una forma de realización, la ligación química se realiza utilizando bromuro de cianógeno, 5 M en acetonitrilo, con una relación 1:10 v/v con oligonucleótido fosforilado en 5' en un tampón pH 7,6 (MBS 1 M + MgCl₂ 20 mM) a 0 grados durante 1 a 5 minutos. En otra forma de realización, los oligonucleótidos se ligan utilizando métodos enzimáticos. En cualquiera de las formas de realización, los oligonucleótidos pueden ser bicatenarios, preferentemente con una protuberancia de aproximadamente 5 a aproximadamente 14 bases. El oligonucleótido también puede ser monocatenario, en cuyo caso se emplea una tablilla con un solapamiento de aproximadamente 6 bases con cada uno de los oligonucleótidos a ligar para situar los restos 5'y 3' reactivos próximos entre sí.

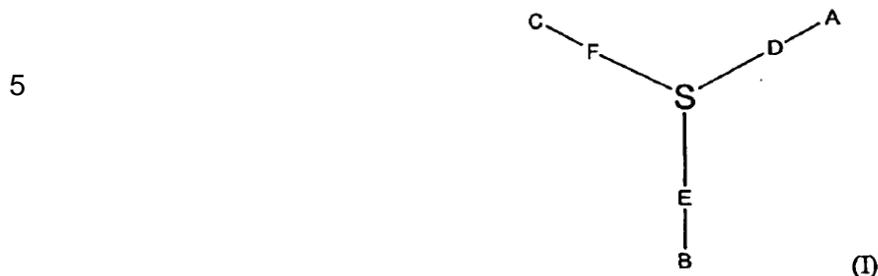
En una forma de realización, el componente básico inicial está unido operativamente a un oligonucleótido inicial. Antes o después del acoplamiento de un segundo componente básico al componente básico inicial, se liga al oligonucleótido inicial una segunda secuencia de oligonucleótido que identifica el segundo componente básico. En las Figuras 1 y 2 se exponen los métodos para ligar la secuencia de oligonucleótido inicial y la secuencia de oligonucleótido entrante. En la Figura 1, el oligonucleótido inicial es bicatenario, y una hebra incluye una secuencia protuberante que es complementaria a un extremo del segundo oligonucleótido y pone en contacto el segundo oligonucleótido con el oligonucleótido inicial. Preferentemente, la secuencia protuberante del oligonucleótido inicial y la secuencia complementaria del segundo oligonucleótido tienen ambas al menos aproximadamente 4 bases; más preferentemente ambas secuencias tienen la misma longitud. El oligonucleótido inicial y el segundo oligonucleótido pueden ligarse utilizando una enzima adecuada. Si el oligonucleótido inicial está unido al primer componente básico en el extremo 5' de una de las hebras (la "hebra superior"), entonces la hebra que es complementaria a la hebra superior (la "hebra inferior") incluirá la secuencia protuberante en su extremo 5', y el segundo oligonucleótido incluirá una secuencia complementaria en su extremo 5'. Tras la ligación del segundo oligonucleótido, puede añadirse una hebra que sea complementaria a la secuencia del segundo oligonucleótido que está en dirección 3' respecto a la secuencia complementaria protuberante, y que incluye una secuencia protuberante adicional.

En una forma de realización, el oligonucleótido se alarga como se expone en la Figura 2. El oligonucleótido unido al resto funcional en crecimiento y el oligonucleótido entrante se sitúan para la ligación utilizando una secuencia "tablilla", que incluye una región que es complementaria al extremo 3' del oligonucleótido inicial y una región que es complementaria al extremo 5' del oligonucleótido entrante. La tablilla aproxima el extremo 5' del oligonucleótido al extremo 3' del oligonucleótido entrante y la ligación se logra utilizando la ligación enzimática. En el ejemplo ilustrado en la Figura 2, el oligonucleótido inicial consiste en 16 bases nitrogenadas y la tablilla es complementaria a las 6 bases en el extremo 3'. El oligonucleótido entrante consiste en 12 bases nitrogenadas, y la tablilla es complementaria a las 6 bases en el extremo 5'. La longitud de la tablilla y las longitudes de las regiones complementarias no son fundamentales. Sin embargo, las regiones complementarias deben ser lo suficientemente largas como para permitir la formación de un dímero estable en las condiciones de la ligación, pero no tan largas como para producir un nucleótido codificante excesivamente grande en las moléculas finales. Resulta preferente que las regiones complementarias tengan una longitud de aproximadamente 4 bases a aproximadamente 12 bases, más preferentemente de aproximadamente 5 bases a aproximadamente 10 bases, y lo más preferentemente de aproximadamente 5 bases a aproximadamente 8 bases.

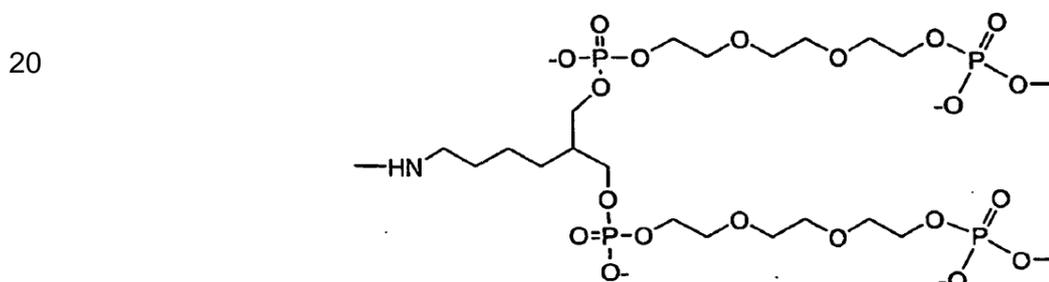
Los métodos de "separación y agrupación" utilizados para los métodos de síntesis de la biblioteca expuestos en el presente documento garantizan que cada resto funcional único esté unido operativamente a al menos una secuencia de oligonucleótidos única que identifica el resto funcional. Si se utilizan 2 o más etiquetas de oligonucleótidos diferentes para al menos un componente básico en al menos uno de los ciclos de síntesis, cada resto funcional diferente que comprende un componente básico será codificado por múltiples oligonucleótidos. Por ejemplo, si se utilizan 2 etiquetas de oligonucleótidos para cada componente básico durante la síntesis de una biblioteca de 4 ciclos, habrá 16 secuencias de ADN (2⁴) que codifican cada resto funcional único. Existen varias ventajas potenciales para la codificación de cada resto funcional único con múltiples secuencias. En primer lugar, la selección de una combinación diferente de secuencias de etiqueta que codifican el mismo resto funcional garantiza que aquellas moléculas fueron seleccionadas de forma independiente. En segundo lugar, la selección de una combinación diferente de secuencias de etiqueta que codifican el mismo resto funcional elimina la posibilidad de que la selección se basara en la secuencia del oligonucleótido. En tercer lugar, puede reconocerse un artefacto técnico si el análisis de la secuencia sugiere que un resto funcional concreto está altamente enriquecido, pero aparece sólo una combinación de secuencias de entre muchas posibilidades. El marcado múltiple puede lograrse teniendo reacciones de separación independientes con el mismo componente básico pero una etiqueta de oligonucleótidos diferente. Como alternativa, el marcado múltiple puede lograrse mezclando una relación adecuada de cada etiqueta en una única reacción de marcado con un componente básico individual.

En una forma de realización, el oligonucleótido inicial es bicatenario y las dos hebras están unidas covalentemente. En la Figura 3 se muestra un medio de unir covalentemente las dos hebras, en el que se utiliza un resto de unión, por ejemplo, un conector, para unir las dos hebras y el resto funcional. El resto de unión puede ser cualquier estructura química que comprenda un primer grupo funcional que esté adaptado para reaccionar con un componente básico, un segundo grupo funcional que esté adaptado para reaccionar con el extremo 3' de un oligonucleótido, y un tercer grupo funcional que esté adaptado para reaccionar con el extremo 5' de un oligonucleótido. Preferentemente, los grupos funcionales segundo y tercero están orientados para situar las dos

hebras de oligonucleótido en una orientación relativa que permita la hibridación de las dos hebras. Por ejemplo, el resto de unión, por ejemplo, el conector, puede tener la estructura general (I):



10 en la que A, es un grupo funcional que puede formar un enlace covalente con un componente básico, 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. D, F y E son grupos químicos que unen los grupos funcionales A, C y B a S, que es un átomo central o armazón. Preferentemente, D, E y F son cada uno independientemente una cadena de átomos, tal como una cadena de alqueno o una cadena de oligo(etilenglicol), y D, E y F pueden ser iguales o diferentes, y son preferentemente eficaces para permitir la hibridación de los dos oligonucleótidos y la síntesis del resto funcional. En una forma de realización, el resto de unión trivalente es un conector que tiene la estructura



25 En esta forma de realización, el grupo NH está disponible para fijarse a un componente básico, mientras que los grupos fosfato terminales están disponibles para fijarse a un oligonucleótido.

30 En las formas de realización en las que el oligonucleótido inicial es bicatenario, los oligonucleótidos entrantes son también bicatenarios. Como se muestra en la Figura 3, el oligonucleótido inicial puede tener una hebra más larga que la otra, proporcionando una secuencia protuberante. En esta forma de realización, el oligonucleótido entrante incluye una secuencia protuberante que es complementaria a la secuencia protuberante del oligonucleótido inicial. La hibridación de las dos secuencias protuberantes complementarias coloca en posición el oligonucleótido entrante para la ligación al oligonucleótido inicial. Esta ligación puede realizarse enzimáticamente utilizando una ADN o ARN ligasa. Las secuencias protuberantes del oligonucleótido entrante y el oligonucleótido inicial son preferentemente de la misma longitud y consisten en dos o más nucleótidos, preferentemente de 2 a aproximadamente 10 nucleótidos, más preferentemente de 2 a aproximadamente 6 nucleótidos. En una forma de realización preferente, el oligonucleótido entrante es un oligonucleótido bicatenario que tiene una secuencia protuberante en cada extremo. La secuencia protuberante en un extremo es complementaria a la secuencia protuberante del oligonucleótido inicial, mientras que, después de la ligación del oligonucleótido entrante y el oligonucleótido inicial, la secuencia protuberante en el otro extremo se convierte en la secuencia protuberante del oligonucleótido inicial del siguiente ciclo. En una forma de realización, las tres secuencias protuberantes tienen una longitud de 2 a 6 nucleótidos, y la secuencia codificante del oligonucleótido entrante tiene una longitud de 3 a 10 nucleótidos, preferentemente una longitud de 3 a 6 nucleótidos. En una forma de realización concreta, todas las secuencias protuberantes tienen una longitud de 2 nucleótidos y la secuencia codificante tiene una longitud de 5 nucleótidos.

45 En una forma de realización ilustrada en la Figura 4, la hebra entrante tiene una región en su extremo 3' que es complementaria al extremo 3' del oligonucleótido inicial, dejando las protuberancias en los extremos 5' de ambas hebras. La extremos 5' puede rellenarse utilizando, por ejemplo, una ADN polimerasa, tal como polimerasa Vent, lo que da como resultado un oligonucleótido alargado bicatenario. Puede eliminarse la hebra inferior de este oligonucleótido, y añadirse la secuencia adicional al extremo 3' de la hebra superior utilizando el mismo método.

La etiqueta de oligonucleótidos codificante se forma como resultado de la adición sucesiva de oligonucleótidos que identifican cada componente básico sucesivo. En una forma de realización de los métodos de la invención, las etiquetas de oligonucleótidos sucesivas pueden acoplarse mediante ligación enzimática para producir un oligonucleótido codificante.

5 Puede realizarse la ligación de oligonucleótidos catalizada por enzimas utilizando cualquier enzima que tenga la capacidad de ligar fragmentos de ácido nucleico. Las enzimas ejemplares incluyen ligasas, polimerasas, y topoisomerasas. En formas de realización específicas de la invención, se utilizan la ADN ligasa (EC 6.5.1.1), la ADN polimerasa (EC 2.7.7.7), la ARN polimerasa (EC 2.7.7.6) o la topoisomerasa (EC 5.99.1.2) para ligar los oligonucleótidos. Las enzimas contenidas en cada clase EC pueden encontrarse, por ejemplo, como se describe en Bairoch (2000) *Nucleic Acids Research* 28:304-5.

10 En una forma de realización preferente, los oligonucleótidos utilizados en los métodos de la invención son los oligodesoxinucleótidos y la enzima utilizada para catalizar la ligación de oligonucleótidos es la ADN ligasa. A fin de que la ligación se de en presencia de la ligasa, es decir, para que se forme un enlace fosfodiéster entre dos oligonucleótidos, un oligonucleótido debe tener un grupo fosfato 5' libre y el otro oligonucleótido debe tener un grupo hidroxilo 3' libre. Las ADN ligasas ejemplares que pueden utilizarse en los métodos de la invención incluyen la ADN ligasa de T4, la ADN ligasa de Taq, la ARN ligasa de T4, la ADN ligasa (*E. coli*) (todas disponibles en, por ejemplo, New England Biolabs, MA).

15 Un experto en la materia comprenderá que cada enzima utilizada para la ligación tiene una actividad óptima en condiciones específicas, por ejemplo, temperatura, concentración de tampón, pH y tiempo. Puede ajustarse cada una de estas condiciones, por ejemplo, según las instrucciones del fabricante, para obtener la ligación óptima de las etiquetas de oligonucleótidos.

20 El oligonucleótido entrante puede tener cualquier longitud deseable, pero tiene preferentemente una longitud de al menos tres bases nitrogenadas. Más preferentemente, el oligonucleótido entrante tiene una longitud de 4 o más bases nitrogenadas. En una forma de realización, el oligonucleótido entrante tiene de una longitud de 3 a aproximadamente 12 bases nitrogenadas. Resulta preferente que los oligonucleótidos de las moléculas en las bibliotecas de la invención tengan una secuencia terminal común que pueda servir de cebador para la PCR, como se conoce en la técnica. Puede incorporarse una secuencia terminal común de este tipo como extremo terminal del oligonucleótido entrante añadido en el ciclo final de la síntesis de la biblioteca, o puede añadirse tras la síntesis de la biblioteca, por ejemplo, utilizando los métodos de ligación enzimática descritos en el presente documento.

25 En la Figura 5 se expone una forma de realización preferente del método de la invención. El proceso comienza con una secuencia de ADN sintetizada que se fija en su extremo 5' a un conector 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 hebra de ADN tablilla, una ADN ligasa y ditiotreitól en tampón Tris. Esto produce una secuencia de ADN marcado, que a continuación puede utilizarse directamente en la siguiente etapa o purificarse, por ejemplo, utilizando HPLC o precipitación con etanol, antes de continuar a la siguiente etapa. En la etapa 2 se hace reaccionar el ADN marcado con un aminoácido activado protegido, en este ejemplo, un fluoruro de aminoácido protegido con Fmoc, produciendo un conjugado de ADN-aminoácido protegido. En la etapa 3, se desprotege el conjugado de ADN-aminoácido protegido, por ejemplo, en presencia de piperidina, y el conjugado desprotegido resultante se purifica opcionalmente, por ejemplo, por HPLC o precipitación con etanol. El conjugado desprotegido es el producto del primer ciclo de síntesis, y se convierte en el material de partida para el segundo ciclo, que añade un segundo resto de aminoácido al grupo amino libre del conjugado desprotegido.

30 En las formas de realización en las que se va a utilizar la PCR para amplificar y/o secuenciar los oligonucleótidos codificantes de las moléculas seleccionadas, los oligonucleótidos codificantes pueden incluir, por ejemplo, secuencias de cebador de PCR y/o cebadores de secuenciación (por ejemplo, cebadores tales como, por ejemplo, 3'-GACTACCGCGCTCCCTCCG-5' y 3'-GACTCGCCCGACCGTTCCG-5'). Puede incluirse una secuencia de cebador de PCR, por ejemplo, en el oligonucleótido inicial antes del primer ciclo de síntesis, y/o puede incluirse con el primer oligonucleótido entrante, y/o puede ligarse al oligonucleótido codificante tras el ciclo final de la síntesis de la biblioteca, y/o puede incluirse en el oligonucleótido entrante del ciclo final. Las secuencias de 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 el presente documento "secuencias de protección terminal".

35 En una forma de realización, la secuencia de cebador de PCR se diseña en la etiqueta de oligonucleótidos codificante. Por ejemplo, puede incorporarse una secuencia de cebador de PCR en la etiqueta de oligonucleótidos inicial y/o puede incorporarse en la etiqueta de oligonucleótidos final. En una forma de realización se incorpora la misma secuencia de cebador de PCR en la etiqueta de oligonucleótidos inicial y final. En otra forma de realización, se incorpora una primera secuencia de cebador de PCR en la etiqueta de oligonucleótidos inicial y se incorpora una segunda secuencia de cebador de PCR en la etiqueta de oligonucleótidos final. Como alternativa, puede incorporarse la segunda secuencia de cebador de PCR en la secuencia de protección terminal como se describe en el presente documento. En las formas de realización preferentes, la secuencia del cebador de PCR tiene al menos una longitud de aproximadamente 5, 7, 10, 13, 15, 17, 20, 22, ó 25 nucleótidos.

Las secuencias de cebador de PCR adecuadas para su uso en las bibliotecas de la invención son conocidas en la técnica; métodos y cebadores adecuados se exponen, por ejemplo, en Innis, *et al.*, eds, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, San Diego: Academic Press (1990).

5 Otros cebadores adecuados para su uso en la construcción de las bibliotecas descritas en el presente documento son aquellos cebadores descritos en las publicaciones PCT WO 2004/069849 y WO 2005/003375.

El término "polinucleótido" tal como se utiliza en el presente documento en referencia a los cebadores, las sondas y los segmentos o fragmentos de ácidos nucleicos a sintetizar mediante la extensión del cebador, se define como una molécula compuesta de dos o más desoxirribonucleótidos, preferentemente más de tres.

10 El término "cebador", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polinucleótido purificado a partir de una digestión restrictiva de ácidos nucleicos o producido sintéticamente, que es capaz de actuar como punto de iniciación de la síntesis de ácidos nucleicos cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementario a una hebra de ácido nucleico, es decir, en presencia de nucleótidos y de un agente para la polimerización tal como la ADN polimerasa, la transcriptasa inversa y similares, y a una temperatura y pH adecuados. El cebador es preferentemente monocatenario para una eficacia máxima, pero como alternativa puede estar en forma bicatenaria. Si es bicatenario, el cebador se trata primero para separarlo de su hebra complementaria antes de utilizarse para preparar los productos de extensión. Preferentemente, el cebador es un polidesoxirribonucleótido. El cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia de los agentes para la polimerización. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluyendo la temperatura y la fuente del cebador.

20 Los cebadores utilizados en el presente documento están seleccionados para ser "sustancialmente" complementarios a las diferentes hebras de cada secuencia específica a amplificar. Esto significa que el cebador debe ser suficientemente complementario para hibridar de manera no aleatoria con su hebra molde respectiva. Por lo tanto, la secuencia del cebador puede o no reflejar la secuencia exacta del molde.

25 Pueden prepararse cebadores de polinucleótidos utilizando cualquier método adecuado, tal como, por ejemplo, los métodos fosfodiéster o fosfotriéster descritos en Narang *et al.*, (1979) Meth. Enzymol., 68:90; la Patente de EE.UU. N° 4.356.270, la patente de EE.UU. N° 4.458.066, la patente de EE.UU. N° 4.416.988, la patente de EE.UU. N° 4.293.652; y Brown *et al.*, (1979) Meth. Enzymol., 68:109.

30 En los casos en los que las secuencias de cebador de PCR se incluyen en un oligonucleótido entrante, estos oligonucleótidos entrantes serán preferentemente significativamente más largos que los oligonucleótidos entrantes añadidos en los demás ciclos, ya que incluirán una secuencia codificante y una secuencia de cebador de PCR.

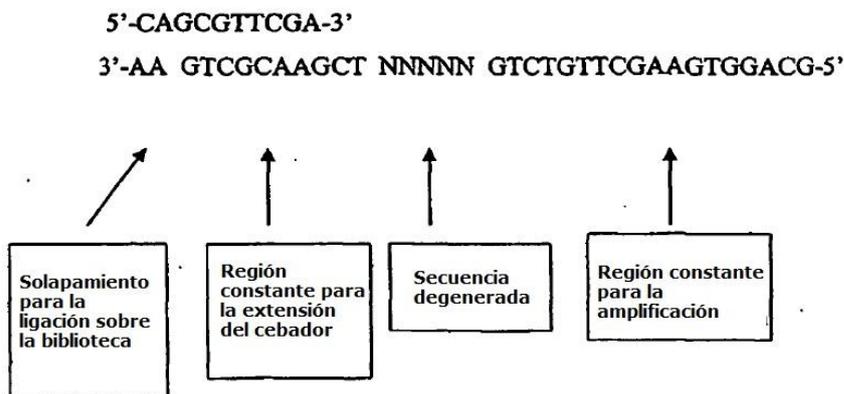
35 En una forma de realización, la secuencia de protección terminal se añade después de la adición del último componente básico y el oligonucleótido entrante final, y la síntesis de una biblioteca tal como se expone en el presente documento incluye la etapa de ligar la secuencia de protección terminal al oligonucleótido codificante, de manera que la parte de oligonucleótido de sustancialmente todos los miembros de la biblioteca termine en una secuencia que incluya una secuencia de cebador de PCR. Preferentemente, la secuencia de protección terminal se añade mediante ligación a las fracciones agrupadas que son productos del ciclo final de síntesis. La secuencia de protección terminal puede añadirse utilizando el proceso enzimático utilizado en la construcción de la biblioteca.

40 En una forma de realización, se liga la misma secuencia de protección terminal a cada miembro de la biblioteca. En otra forma de realización, se utilizan una pluralidad de secuencias de protección terminal. En esta forma de realización, las secuencias de protección terminal de oligonucleótido que contienen bases variables se ligan, por ejemplo, sobre los miembros de la biblioteca tras el ciclo final de síntesis. En una forma de realización, tras el ciclo final de síntesis, las fracciones se agrupan y a continuación se separan de nuevo en fracciones, teniendo cada fracción una secuencia de terminación diferente añadida. Como alternativa, puede añadirse múltiples secuencias de protección terminal a la biblioteca agrupada tras el ciclo final de síntesis. En ambas formas de realización, los miembros de la biblioteca final incluirán moléculas que comprenden restos funcionales específicos unidos a oligonucleótidos de identificación que incluyen dos o más secuencias de protección terminal diferentes.

45 En una forma de realización, el cebador de protección terminal comprende una secuencia de oligonucleótido que contiene nucleótidos variables, es decir, degenerados. Tales bases degeneradas dentro de los cebadores de protección terminal permitirán la identificación de moléculas de la biblioteca de interés determinando si una combinación de componentes básicos es la consecuencia de la duplicación por PCR (secuencia idéntica) o de apariciones independientes de la molécula (secuencia diferente). Por ejemplo, tales bases degeneradas pueden reducir el número potencial de falsos positivos identificados durante el cribado biológico de la biblioteca codificada.

50 En una forma de realización, un cebador de protección terminal degenerado comprende o tiene la siguiente secuencia:

55

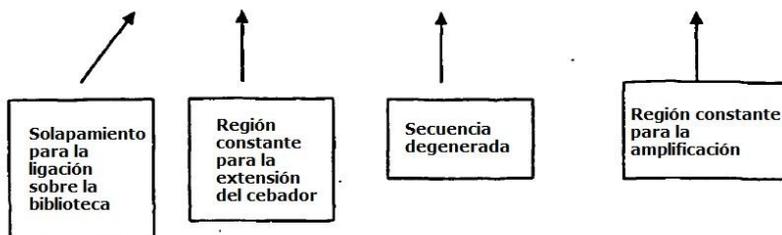


en la que N puede ser cualquiera de las 4 bases, permitiendo 1024 secuencias diferentes (4^5). El cebador tiene la siguiente secuencia después de su ligación sobre la biblioteca y la extensión del cebador:



]

En otra forma de realización, el cebador de protección terminal comprende o tiene la siguiente secuencia:



en la que B puede ser cualquiera de C, G o T, permitiendo 19.683 secuencias diferentes (3^9). El diseño de la región degenerada en este cebador mejora el análisis de la secuencia del ADN, ya que las bases A que flanquean y puntúan las bases degeneradas B evitan tramos homopoliméricos de más de 3 bases, y facilitan el alineamiento de secuencia.

En una forma de realización, el oligonucleótido de protección terminal degenerado se liga a los miembros de la biblioteca utilizando una enzima adecuada y posteriormente se polimeriza la hebra superior del oligonucleótido de protección terminal degenerado utilizando una enzima adecuada, tal como una ADN polimerasa.

En otra forma de realización, la secuencia de cebado de PCR es un "adaptador universal" o "cebador universal". Tal como se utiliza en el presente documento, un "adaptador universal" o "cebador universal" es un oligonucleótido que contiene una región de cebado de PCR única, que tiene, por ejemplo, una longitud de aproximadamente 5, 7, 10, 13, 15, 17, 20, 22, ó 25 nucleótidos, y se encuentra adyacente a una región de cebado de secuenciación única que tiene, por ejemplo, una longitud de aproximadamente 5, 7, 10, 13, 15, 17, 20, 22 ó 25 nucleótidos, y que va seguido opcionalmente de una secuencia clave discriminadora única (o secuencia identificadora de muestra) que consiste en al menos uno de cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidos (es decir, A, C, G, T).

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "secuencia clave discriminadora " o "secuencia identificadora de muestra" se refiere a una secuencia que puede utilizarse para marcar de manera exclusiva una población de moléculas de una muestra. Pueden mezclarse, secuenciarse y reclasificarse muestras múltiples, que contienen cada una secuencia identificadora de muestra única, después de secuenciar el ADN para el análisis de muestras individuales. Puede utilizarse la misma secuencia discriminadora para una biblioteca completa o, como alternativa, pueden utilizarse diferentes secuencias clave discriminadoras para rastrear bibliotecas diferentes. En una forma de realización, la secuencia clave discriminadora está en el cebador de PCR 5', en el cebador de PCR 3', o en ambos cebadores. Si ambos cebadores de PCR contienen una secuencia identificadora de muestra, el número de muestras diferentes que pueden agruparse con secuencias identificadoras de muestra únicas es el producto del número de secuencias identificadoras de muestra en cada cebador. De esta manera, pueden combinarse 10 cebadores de secuencia identificadora de muestra 5' diferentes con 10 cebadores de secuencia identificadora de muestra 3' diferentes para producir 100 combinaciones de secuencias identificadoras de muestra diferentes.

Los ejemplos no limitativos de cebadores de PCR 5' y 3' únicos que contienen secuencias clave discriminadoras incluyen los siguientes:

Cebadores 5' (posiciones variables en negrita y en cursiva):

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.

Cebadores SID 3' (posiciones variables en negrita y en cursiva):

3' A – GCCTCCCTCGCGCCATCAG***AG***GCAGGTGAAGCTTGTCTG;

3' C – GCCTCCCTCGCGCCATCAG***CG***GCAGGTGAAGCTTGTCTG;

3' G – GCCTCCCTCGCGCCATCAG***GG***CAGGTGAAGCTTGTCTG;

3' T – GCCTCCCTCGCGCCATCAG***TG***CAGGTGAAGCTTGTCTG;

3' AA – GCCTCCCTCGCGCCATCAG***AA***GCAGGTGAAGCTTGTCTG;

3' AC – GCCTCCCTCGCGCCATCAG***AC***GCAGGTGAAGCTTGTCTG;

3' AG – GCCTCCCTCGCGCCATCAG***AG***CAGGTGAAGCTTGTCTG;

3' AT – GCCTCCCTCGCGCCATCAG***AT***GCAGGTGAAGCTTGTCTG;

y

3'CA-GCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGGTGAAGCTTGTCTG

En una forma de realización, la secuencia clave discriminadora tiene una longitud de aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 nucleótidos. En otra forma de realización, la secuencia clave discriminadora es una combinación de aproximadamente 1 a 4 nucleótidos. En otra forma de realización más, cada adaptador universal tiene una longitud de aproximadamente cuarenta y cuatro nucleótidos. En una forma de realización, los adaptadores universales se ligan, utilizando ADN ligasa de T4, sobre el extremo del oligonucleótido codificante. Pueden diseñarse específicamente diferentes adaptadores universales para cada preparación de bibliotecas y, por lo tanto, proporcionarán un identificador único para cada biblioteca. El tamaño y la secuencia de los adaptadores universales pueden modificarse según el experto en la materia lo considere necesario.

Como se ha indicado anteriormente, puede determinarse la secuencia de nucleótidos de la etiqueta de oligonucleótidos como parte de los métodos de la presente invención utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

5 La etiqueta de oligonucleótidos se compone de polinucleótidos que identifican los componentes básicos que componen el resto funcional tal como se describe en el presente documento. La secuencia de ácidos nucleicos de la etiqueta de oligonucleótidos se determina sometiendo la etiqueta de oligonucleótidos a una reacción de PCR de la siguiente manera. Se pone en contacto la muestra apropiada con un par de cebadores de PCR, teniendo cada miembro del par una secuencia de nucleótidos preseleccionada. El par de cebadores de PCR es capaz de iniciar las reacciones de extensión del cebador mediante hibridación con un sitio de unión al cebador de PCR en la etiqueta de oligonucleótidos codificante. El sitio de unión al cebador de PCR se diseña preferentemente en la etiqueta de oligonucleótidos codificante. Por ejemplo, puede incorporarse un sitio de unión al cebador de PCR en la etiqueta de oligonucleótidos inicial y el segundo sitio de unión al cebador de PCR puede estar en la etiqueta de oligonucleótidos final. Como alternativa, puede incorporarse el segundo sitio de unión al cebador de PCR en la secuencia de protección terminal como se describe en el presente documento. En las formas de realización preferentes, el sitio de unión al cebador de PCR tiene al menos una longitud de aproximadamente 5, 7, 10, 13, 15, 17, 20, 22 ó 25 nucleótidos.

20 La reacción de PCR se realiza mezclando el par de cebadores de PCR, preferentemente una cantidad predeterminada de los mismos, con los ácidos nucleicos de la etiqueta de oligonucleótidos codificante, preferentemente una cantidad predeterminada de la misma, en un tampón de PCR para formar una mezcla de reacción de PCR. La mezcla se termocicla durante un número de ciclos, que por lo general está predeterminado, suficiente para la formación de un producto de reacción de PCR. Una cantidad suficiente de producto es una que puede aislarse en cantidad suficiente para permitir la determinación de la secuencia de ADN.

25 La PCR se lleva a cabo por lo general por termociclado es decir, aumentando y disminuyendo de forma repetida la temperatura de una mezcla de reacción de PCR dentro de un intervalo de temperaturas cuyo límite inferior es de aproximadamente 30°C a aproximadamente 55°C y cuyo límite superior es de aproximadamente 90°C a aproximadamente 100°C. El aumento y disminución puede ser continuo, pero es preferentemente fásico con períodos de tiempo de relativa estabilidad de la temperatura en cada una de las temperaturas favoreciendo la síntesis, la desnaturalización y la hibridación de polinucleótidos.

30 La reacción de PCR se realiza utilizando cualquier método adecuado. Generalmente se da en una solución acuosa tamponada, es decir, un tampón de PCR, preferentemente a un pH de 7-9. Preferentemente, se encuentra presente un exceso molar del cebador. Resulta preferente un gran exceso molar para mejorar la eficacia del proceso.

35 El tampón de PCR también contiene los desoxirribonucleótidos trifosfato (sustratos de síntesis de polinucleótidos) dATP, dCTP, dGTP, y dTTP y una polimerasa, por lo general termoestable, todos en cantidades adecuadas para la reacción de extensión del cebador (síntesis de polinucleótidos). La solución resultante (mezcla de PCR) se calienta a aproximadamente 90°C-100°C durante aproximadamente 1 a 10 minutos, preferentemente de 1 a 4 minutos. Después de este periodo de calentamiento, se deja enfriar la solución a 54°C, que es preferente para la hibridación del cebador. La reacción de síntesis puede darse a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente hasta una temperatura por encima de la cual la polimerasa (agente inductor) ya no funciona de manera eficaz. De esta manera, por ejemplo, si se utiliza la ADN polimerasa, generalmente la temperatura no es superior a aproximadamente 40°C. El termociclado se repite hasta que se produce la cantidad deseada de producto de PCR. Un tampón de PCR ejemplar comprende los siguientes reactivos: KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM de pH 8,3; MgCl₂ 1,5 mM; gelatina al 0,001% (peso/volumen), dATP 200 μM, dTTP 200 μM; dCTP 200 μM; dGTP 200 μM; y 2,5 unidades de ADN polimerasa I de *Thermus aquaticus* (Taq) por 100 microlitros de tampón.

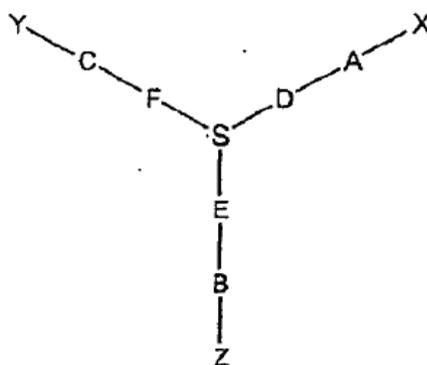
45 Las enzimas adecuadas para alargar las secuencias de cebador incluyen, por ejemplo, la ADN polimerasa I de *E. coli*, la ADN polimerasa de Taq, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, la ADN polimerasa de T4, otras ADN polimerasas disponibles, transcriptasa inversa y otras enzimas, incluyendo enzimas termoestables, que facilitarán la combinación de los nucleótidos de la manera apropiada para formar los productos de extensión del cebador que son complementarios a cada hebra de ácido nucleico. Generalmente, la síntesis se iniciará en el extremo 3' de cada cebador y continuará en la dirección 5' a lo largo de la hebra molde, hasta que la síntesis termine, produciendo moléculas de diferentes longitudes.

50 La hebra de ADN recién sintetizada y su hebra complementaria forman una molécula bicatenaria que puede utilizarse en las sucesivas etapas del proceso de análisis.

55 Los métodos de amplificación de PCR se describen en detalle en las patentes de EE.UU. N^{os} 4.683.192; 4.683.202; 4.800.159 y 4.965.188, y al menos en PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. Erlich, ed, Reservaton Press, Nueva York. (1989); y PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis *et al.*, eds, Academic Press, San Diego, California (1990).

Una vez que se ha amplificado la etiqueta de oligonucleótidos codificante, puede determinarse la secuencia de la etiqueta, y en última instancia la composición de la molécula seleccionada, utilizando el análisis de secuencias de ácidos nucleicos, un procedimiento bien conocido para determinar la secuencia de las secuencias de nucleótidos. El análisis de secuencias de ácidos nucleicos se aborda mediante una combinación de (a) técnicas fisicoquímicas, basadas en la hibridación o desnaturalización de una hebra sonda más su diana complementaria, y (b) reacciones enzimáticas con polimerasas.

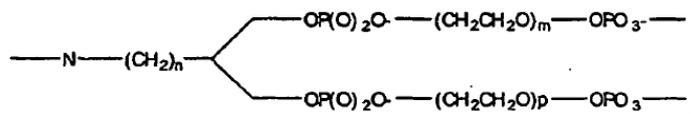
La invención se refiere adicionalmente a los compuestos que pueden producirse utilizando los métodos de la invención y las colecciones de tales compuestos, ya sea como especies aisladas o agrupados para formar una biblioteca de estructuras químicas. Los compuestos de la invención incluyen compuestos de la Fórmula



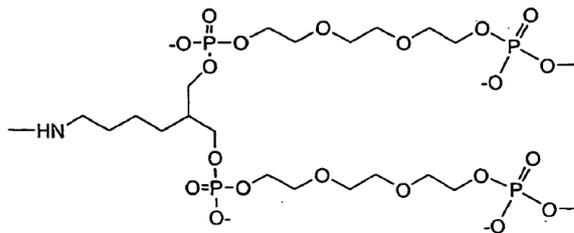
en la que X es un resto funcional que comprende uno o más componentes básicos, Z es un oligonucleótido fijado en su extremo terminal 3' a B e Y es un oligonucleótido que se fija a C en su extremo terminal 5'. A es un grupo funcional que forma un enlace covalente con X, B es un grupo funcional que forma 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 los grupos funcionales A, C y B a S, que es un átomo central o armazón. Preferentemente, D, E y F son cada uno independientemente una cadena de átomos, tal como una cadena de alqueno o una cadena de oligo(etilenglicol), y D, E y F pueden ser iguales o diferentes, y son preferentemente eficaces para permitir la hibridación de los dos oligonucleótidos y la síntesis del resto funcional.

Preferentemente, 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 un dúplex en condiciones adecuadas. Y y Z tienen la misma longitud o longitudes diferentes. Preferentemente, Y y Z tienen la misma longitud, o uno de entre Y y Z es de 1 a 10 bases más largo que el otro. En una forma de realización preferente, Y y Z tienen cada uno una longitud de 10 o más bases y tienen regiones complementarias de diez o más pares de bases. Más preferentemente, Y y Z son sustancialmente complementarios en toda su longitud, es decir, no tienen más de un desapareamiento por cada diez pares de bases. Lo más preferentemente, Y y Z son complementarios en toda su longitud, es decir, a excepción de cualquier región protuberante en Y o Z, las hebras hibridan por medio del apareamiento de bases de Watson-Crick sin desapareamientos en toda su longitud.

S puede ser un solo átomo 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 cicloalquilo, cicloalqueno, heterocicloalquilo, heterocicloalqueno, arilo o grupo heteroarilo. En una forma de realización, el conector es un grupo de estructura



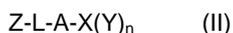
en la que cada uno de n, m y p es, independientemente, un número entero de 1 a aproximadamente 20, preferentemente de 2 a ocho, y más preferentemente de 3 a 6. En una forma de realización concreta, el conector tiene la estructura que se muestra a continuación.



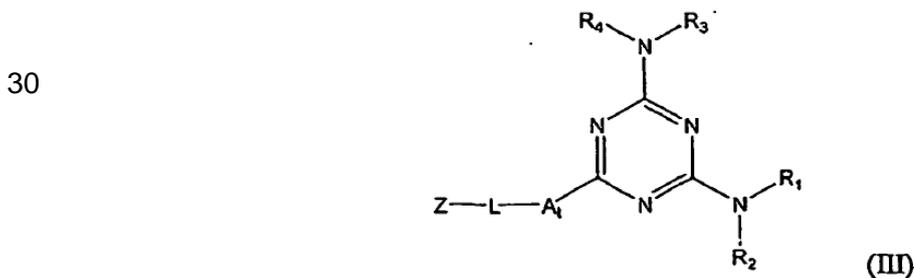
5

En una forma de realización, las bibliotecas de la invención incluyen moléculas que consisten en un resto funcional compuesto por componentes básicos, en el que cada resto funcional está unido operativamente a un oligonucleótido codificante. La secuencia de nucleótidos del oligonucleótido codificante es indicativa de los componentes básicos presentes en el resto funcional, y en algunas formas de realización, la conectividad o la disposición de los componentes básicos. La invención proporciona la ventaja de que la metodología utilizada para construir el resto funcional y la utilizada para construir la etiqueta de oligonucleótidos puede realizarse en el mismo medio de reacción, preferentemente un medio acuoso, simplificando así el método de preparación de la biblioteca frente a los métodos de la técnica anterior. En determinadas formas de realización en las que las etapas de ligación de oligonucleótidos y las etapas de adición de componente básico pueden ser llevadas a cabo en medios acuosos, cada reacción tendrá un pH óptimo diferente. En estas formas de realización, la reacción de adición de componentes básicos puede llevarse a cabo a una temperatura y pH adecuados en un tampón acuoso adecuado. A continuación puede intercambiarse el tampón por un tampón acuoso que proporcione un pH adecuado para la ligación de oligonucleótidos.

En otra forma de realización, la invención proporciona compuestos, y bibliotecas que comprenden tales compuestos, de Fórmula II



en la que X es un armazón molecular, cada Y es independientemente, un resto periférico, y n es un número entero de 1 a 6. Cada A es independientemente, un componente básico y n es un número entero de 0 a aproximadamente 5. L es un resto de unión y Z es un oligonucleótido monocatenario o bicatenario que identifica la estructura $A_t-X(Y)_n$. La estructura $X(Y)_n$ puede ser, por ejemplo, una de las estructuras de armazón que se exponen en la Tabla 8 (ver más adelante). En una forma de realización, la invención proporciona compuestos, y bibliotecas que comprenden tales compuestos, de Fórmula III:



en la que t es un número entero de 0 a aproximadamente 5, preferentemente de 0 a 3, y cada A es, independientemente, un componente básico. L es un resto de unión y Z es un oligonucleótido monocatenario o bicatenario que identifica cada A y R_1, R_2, R_3 y R_4 . R_1, R_2, R_3 y R_4 son cada uno independientemente un sustituyente seleccionado de entre 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 forma de realización, cada A es un resto de aminoácido.

Las bibliotecas que incluyen compuestos de Fórmula II o Fórmula III pueden comprender al menos aproximadamente 100; 1.000; 10.000; 100.000; 1.000.000 o 10.000.000 compuestos de Fórmula II o Fórmula III. En una forma de realización, la biblioteca se prepara por medio de un método diseñado para producir una biblioteca que comprenda al menos aproximadamente 100; 1.000; 10.000; 100.000; 1.000.000 o 10.000.000 compuestos de Fórmula II o Fórmula III.

5

10

15

20

25

30

35

Tabla 8

Referencia	Otros	Ácido carboxílico	Aldehído/Cetona	Amina	Armazones
Carranco, I., et al. (2005) J. Comb. Chem. 7:33-41					
Rosamilia, A.E., et al. (2005) Organic Letters 7: 1525-1528			benzaldehídos y furfural	aminas	
Syeda Huma, H.Z., et al. (2002) Tet Lett 43: 6485-6488					
Tempest, P., et al. (2001) Tet Lett 42:4959-4962	$\equiv\text{N}-\text{R}3$		$\text{R}2-\text{CHO}$		
Paulvannan, K. (1999) Tet Lett 40:1851-1854					
Tempest, P., et al. (2001) Tet Lett 42:4963-4968	$\equiv\text{N}-\text{R}4$		$\text{R}1-\text{CHO}$		

5

10

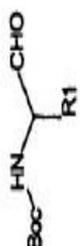
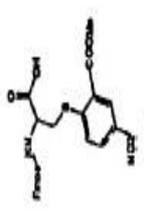
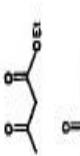
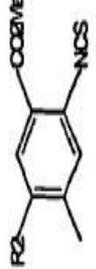
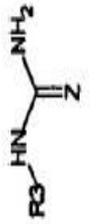
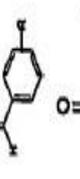
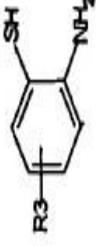
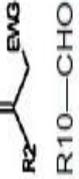
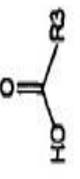
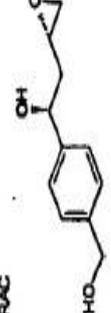
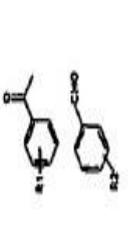
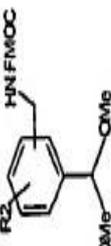
15

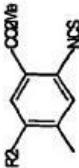
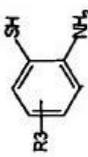
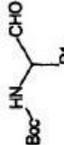
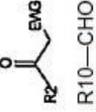
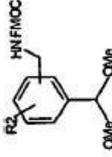
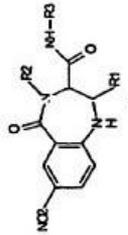
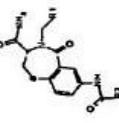
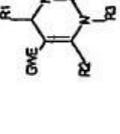
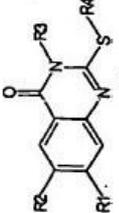
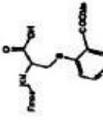
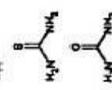
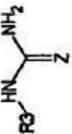
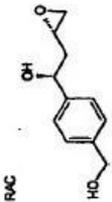
20

25

30

35

Aldehido/Cetona	Ácido carboxílico	Otros	Referencia
		$\equiv N-R3$	Tempest, P., et al. (2003) Tet Lett 44:1947-1950
$R1-CHO$	$R2-COOH$		Nefzi, A., et al. (1999) Tet Lett 40:4939-4942
			Bose, A.K., et Tet al. (2005) Lett 46:1901-1903
		$Cl-CH_2-CH_2-R4$	Stadler, A. and Kappe, C.O. (2001) J. Comb. Chem. 3:624-630; Lengár, A. y Kappe, C.O. (2004) Organic Letters 6:771-774
			Ivachtchenko, A.V., et al. (2003) J. Comb. Chem. 5: 775-788
		Micheli, F., et al. (2001) J. Comb. Chem. 3:224-228	Sternson, S.M., et al. (2001) Org. Lett. 3: 4239-4242

5	Referencia				
10	Otros	≡N—R3			
15	Ácido carboxílico				
20	Aldehído/Cetona				
25	Amina	R2-NH2		amplia variedad de aminas alifáticas primarias	R1—HS R1—NH2
30	Amazones				
35					
	Referencia				
	Tempest, P., et al. (2003) Tet Lett 44:1947-1950				
	Nefzi, A., et al. (1999) Tet Lett 40:4939-4942				
	Bose, A.K., et Tet al. (2005) Lett 46:1901-1903				
	Stadler, A. y Kappe, C.O. (2001) J. Comb. Chem. 3:624-630; Lengár, A. y Kappe, C.O. (2004) Organic Letters 6:771-774				
	Ivachtchenko, A.V., et al. (2003) J. Comb. Chem. 5: 775-788				
	Micheli, F., et al. (2001) J. Comb. Chem. 3:224-228				
	Stemson, S.M., et al. (2001) Org. Lett. 3: 4239-4242				

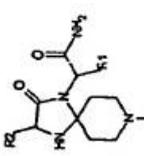
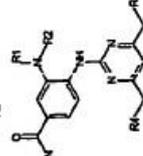
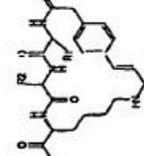
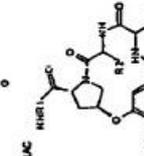
5

10

15

20

25

Armazones	Amina	Aldehido/Cetona	Ácido carboxílico aminoácidos	Otros	Referencia
	Aminas	Aldehidos	aminoácidos		Felou, L., et al. (2003) J. Comb. Chem. 5:356-361
					
			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 métodos de la invención es que pueden utilizarse para preparar bibliotecas que comprenden un gran número de compuestos. La capacidad de amplificar secuencias de oligonucleótidos codificantes utilizando métodos conocidos, tal como la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") significa que las moléculas seleccionadas pueden identificarse 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, comprenden relativamente pocas copias de cualquier miembro de la biblioteca dado, o requieren el uso de volúmenes muy grandes. Por ejemplo, una biblioteca que consiste en 10^8 estructuras únicas en la que cada estructura tiene 1×10^{12} copias (aproximadamente 1 picomol), requiere aproximadamente 100 l de solución a una concentración eficaz de $1 \mu\text{M}$. Para la misma biblioteca, si cada miembro está representado por 1.000.000 copias, el volumen requerido es de 100 μl a una concentración eficaz de $1 \mu\text{M}$.

En una forma de realización preferente, la biblioteca comprende de 10^3 a aproximadamente 10^{15} copias de cada miembro de la biblioteca. Teniendo en cuenta las diferencias en la eficacia de la síntesis entre los miembros de la biblioteca, es posible que los diferentes miembros de la biblioteca tengan diferentes números de copias en cualquier biblioteca dada. Por lo tanto, aunque el número de copias de cada miembro teóricamente presente en la biblioteca pueda ser el mismo, el número real de copias de cualquier miembro dado de la biblioteca es independiente del número de copias de cualquier otro miembro. Más preferentemente, las bibliotecas de compuestos de la invención incluyen al menos aproximadamente 10^5 , 10^6 ó 10^7 copias de cada miembro de la biblioteca, o de sustancialmente todos los miembros de la biblioteca. La expresión "sustancialmente todos los miembros de la biblioteca" se refiere a al menos aproximadamente el 85% de los miembros de la biblioteca, preferentemente al menos aproximadamente el 90%, y más preferentemente al menos aproximadamente el 5% de los miembros de la biblioteca.

Preferentemente, la biblioteca incluye un número suficiente de copias de cada miembro de manera que puedan realizarse rondas múltiples (es decir, dos o más) de selección contra una diana biológica, quedando cantidades suficientes de moléculas de unión tras la ronda final de selección para permitir la amplificación de las etiquetas de oligonucleótidos de las moléculas restantes y, por lo tanto, la identificación de los restos funcionales de las moléculas de unión. En la Figura 6 se ilustra una representación esquemática de un proceso de selección de este tipo, en la que 1 y 2 representan miembros de la biblioteca, B es una molécula diana 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, tal como se representa 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 la unión del compuesto 1 a B; (II) eliminar el compuesto no unido 2, (III) disociar el compuesto 1 de B y eliminar BX del medio de reacción. El resultado de la Ronda 1 es una colección de moléculas enriquecida en compuesto 1 respecto al compuesto 2. Las rondas posteriores que emplean las etapas I-III dan como resultado un mayor enriquecimiento de compuesto 1 respecto al compuesto 2. Aunque en la Figura 6 se muestran tres rondas de selección, en la práctica puede emplearse cualquier número de rondas, por ejemplo de una ronda a diez rondas, para conseguir el enriquecimiento deseado de moléculas de unión respecto a las moléculas sin capacidad de unión.

En una forma de realización mostrada en la Figura 6, no hay amplificación (síntesis de más copias) de los compuestos restantes después de cualquiera de las rondas de selección. Tal amplificación puede conducir a una mezcla de compuestos que no sea coherente con las cantidades relativas de los compuestos restantes después de la selección. Esta falta de coherencia se debe al hecho de que determinados compuestos pueden ser más fácilmente sintetizados que otros compuestos, y por tanto pueden amplificarse de una manera que no sea proporcional a su presencia tras 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 dará como resultado una amplificación desproporcionada del compuesto 2 respecto al compuesto 1, y una mezcla resultante de compuestos con un enriquecimiento mucho más bajo (en caso de haberlo) del compuesto 1 respecto al compuesto 2.

En una forma de realización, la diana se inmoviliza sobre un soporte sólido mediante cualquier técnica de inmovilización conocida. El soporte sólido puede ser, por ejemplo, una matriz insoluble en agua contenida dentro de una membrana o columna de cromatografía. La biblioteca codificada puede aplicarse a una matriz insoluble en agua contenida dentro de una columna de cromatografía. A continuación se lava la columna para eliminar los ligantes no específicos. A continuación, pueden disociarse los compuestos no unidos a la diana cambiando el pH, la concentración de sales, la concentración de disolvente orgánico, u otros métodos, como la competición con un ligando conocido para la diana.

En otra forma de realización, la diana está libre en solución y se incuba con la biblioteca codificada. Los compuestos que se unen a la diana (también denominados en el presente documento "ligandos") se aíslan selectivamente mediante una etapa de separación por tamaños, tales como la ultrafiltración o la filtración en gel. En una forma de realización, se hace pasar la mezcla de compuestos codificados y la biomolécula diana a través de una columna de cromatografía de exclusión por tamaños (filtración en gel), que separa cualquier complejo ligando-diana de los compuestos no unidos. Los complejos ligando-diana se transfieren a una columna de cromatografía en fase inversa, que disocia los ligandos de la diana. A continuación se analizan los ligandos disociados mediante amplificación por PCR y análisis de secuencias de los oligonucleótidos codificantes. Este enfoque resulta especialmente ventajoso en situaciones en las que la inmovilización de la diana puede dar como resultado una pérdida de actividad.

En algunas formas de realización de la invención, el método de selección puede comprender amplificar el oligonucleótido codificante de al menos un miembro de la biblioteca de compuestos que se une a una diana antes de la secuenciación.

5 En una forma de realización, la biblioteca de compuestos que comprende oligonucleótidos codificantes se amplifica antes del análisis de secuencias con el fin de minimizar cualquier sesgo potencial en la distribución de la población de moléculas de ADN presente en la mezcla de la biblioteca. Por ejemplo, sólo se recupera una pequeña cantidad de la biblioteca después de una etapa de selección y por lo general se amplifica utilizando PCR antes del análisis de secuencias. La PCR tiene el potencial de producir un sesgo en la distribución de la población de moléculas de ADN presente en la mezcla de la biblioteca seleccionada. Esto resulta especialmente problemático cuando el número de moléculas de entrada es pequeño y las moléculas de entrada son moldes de PCR pobres. Los productos de la PCR producidos en ciclos tempranos son moldes más eficaces que la biblioteca de dúplex covalentes, y por lo tanto la frecuencia de estas moléculas en la población final amplificada puede ser mucho mayor que en la molde de entrada original.

10 Por consiguiente, con el fin de minimizar este sesgo potencial de la PCR, en una forma de realización de la invención, se produce una población de oligonucleótidos monocatenarios correspondientes a los miembros individuales de la biblioteca utilizando, por ejemplo, un cebador en una reacción, seguido de la amplificación por PCR utilizando dos cebadores. De este modo, hay una acumulación lineal de producto de extensión de cebador monocatenario antes de la amplificación exponencial utilizando PCR, y la diversidad y distribución de las moléculas en el producto de extensión de cebador acumulado refleja con más precisión la diversidad y distribución de las moléculas presentes en la molde de entrada original, ya que la fase exponencial de la amplificación se da sólo después de que gran parte de la diversidad molecular original presente esté representada en la población de moléculas producidas durante la reacción de extensión del cebador.

15 Una vez se identifican los ligandos individuales mediante el proceso anteriormente descrito, pueden aplicarse diversos niveles de análisis para producir información sobre la relación estructura-actividad y para guiar la optimización adicional de la afinidad, especificidad y actividad biológica del ligando. Para los ligandos derivados del mismo armazón, puede emplearse el modelado molecular tridimensional para identificar características estructurales significativas comunes a los ligandos, generando de ese modo familias de ligandos de molécula pequeña que se supone que se unen en un sitio común en la biomolécula diana.

20 Puede utilizarse una variedad de enfoques de cribado para obtener ligandos que posean una afinidad elevada por una diana pero una afinidad significativamente más débil para otra diana estrechamente relacionada. Una estrategia de cribado es identificar ligandos para ambas biomoléculas en experimentos paralelos y eliminar posteriormente los ligandos comunes mediante una comparación de referencias cruzadas. En este método, pueden identificarse por separado los ligandos para cada biomolécula, como se ha descrito anteriormente. Este método es compatible con las biomoléculas diana inmovilizadas y con las biomoléculas diana libres en solución.

25 Para las biomoléculas diana inmovilizadas, otra estrategia es añadir una etapa de preselección que elimine todos los ligandos que se unen a la biomolécula no diana de la biblioteca. Por ejemplo, puede ponerse en contacto una primera biomolécula con una biblioteca codificada como se ha descrito anteriormente. A continuación, los compuestos que no se unen a la primera biomolécula se separan de cualquier primer complejo biomolécula-ligando que formen. A continuación, se pone en contacto la segunda biomolécula con los compuestos que no se unen a la primera biomolécula. Pueden identificarse los compuestos que se unen a la segunda biomolécula como se ha descrito anteriormente y que tienen una afinidad significativamente mayor para la segunda biomolécula que para la primera biomolécula.

30 También puede utilizarse un ligando para una biomolécula de función desconocida que se identifica por el método descrito anteriormente para determinar la función biológica de la biomolécula. Esto resulta ventajoso porque aunque se siguen identificando nuevas secuencias de genes, las funciones de las proteínas codificadas por estas secuencias y la validez de estas proteínas como dianas para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos son difíciles de determinar y representan quizás el obstáculo más importante para la aplicación de la información genómica al tratamiento de la enfermedad. Los ligandos específicos de diana obtenidos a través del proceso descrito en la presente invención pueden emplearse de manera eficaz en ensayos biológicos de célula entera o en modelos animales apropiados para comprender la función de la proteína diana y la validez de la proteína diana para la intervención terapéutica. Este enfoque puede confirmar también que la diana es específicamente sensible al descubrimiento de fármacos de molécula pequeña.

35 En una forma de realización, uno o más compuestos dentro de una biblioteca de la invención se identifican como ligandos para una biomolécula concreta. A continuación pueden evaluarse estos compuestos en un ensayo *in vitro* para determinar su capacidad de unión a la biomolécula. Preferentemente, los restos funcionales de los compuestos de unión se sintetizan sin la etiqueta de oligonucleótidos o el resto de enlace, y se evalúan estos restos funcionales para determinar su capacidad de unión a la biomolécula.

40 También puede evaluarse el efecto de la unión de los restos funcionales a la biomolécula sobre la función de la biomolécula utilizando ensayos *in vitro* basados en células o libres de células. Para una biomolécula con una

5 función conocida, el ensayo puede incluir una comparación de la actividad de la biomolécula en presencia y en ausencia del ligando, por ejemplo, por medición directa de la actividad, tal como la actividad enzimática, o por medición indirecta, tal como una función celular que se vea influida por la biomolécula. Si la biomolécula tiene una función desconocida, puede ponerse en contacto una célula que exprese la biomolécula con el ligando y se evalúa el efecto del ligando sobre la viabilidad, la función, el fenotipo y/o la expresión génica 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, puede ponerse en contacto una célula infectada con el virus con un ligando para la proteína. A continuación puede evaluarse el efecto de la unión del ligando a la proteína sobre la viabilidad del virus.

10 También puede evaluarse un ligando identificado por el método de la invención en un modelo *in vivo* o en un ser humano. Por ejemplo, puede evaluarse el ligando en un animal u organismo que produzca la biomolécula. Puede determinarse cualquier cambio resultante en el estado de salud (por ejemplo, progresión de la enfermedad) del animal o del organismo.

15 Para una biomolécula, tal como una proteína o una molécula de 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 a la función biológica de la biomolécula. Por ejemplo, la observación de que un proceso celular concreto queda inhibido en presencia del ligando indica que el proceso depende, al menos en parte, de la función de la biomolécula.

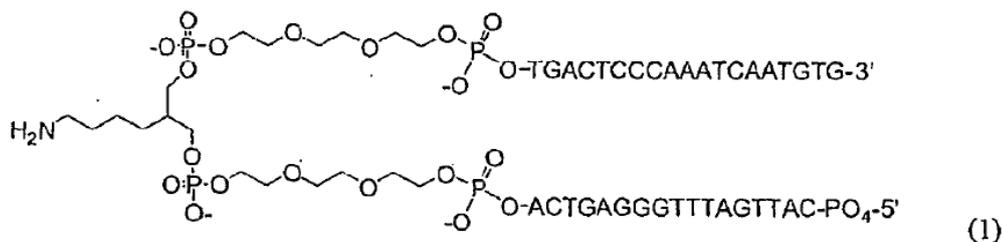
20 Los ligandos identificados utilizando los métodos de la invención también pueden utilizarse como reactivos de afinidad para la biomolécula a la que se unen. En una forma de realización, se utilizan tales ligandos para efectuar la purificación por afinidad de la biomolécula, por ejemplo, por medio de la cromatografía de una solución que comprende la biomolécula utilizando una fase sólida a la que se fijan uno o más de tales ligandos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis y caracterización de una biblioteca del orden de 10^5 miembros

25 Se llevó a cabo la síntesis de una biblioteca que comprende del orden de 10^5 miembros distintos utilizando los siguientes reactivos:

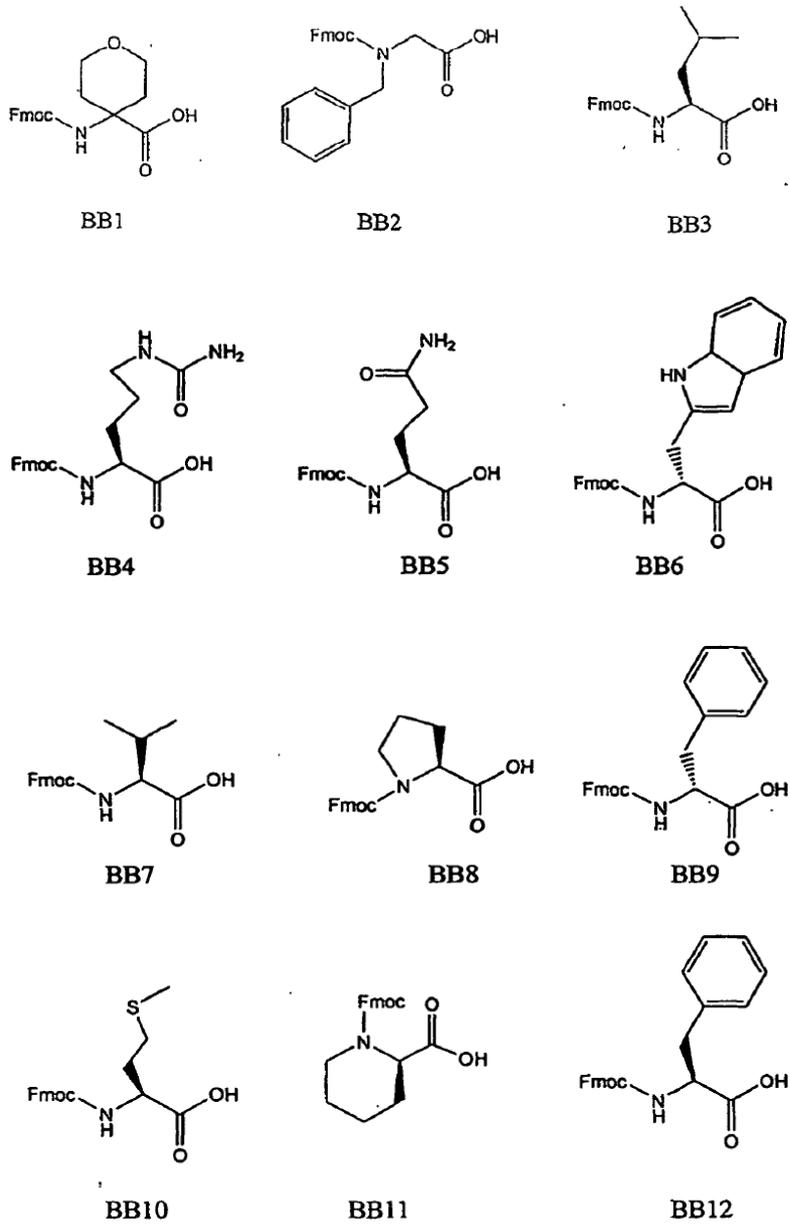
Compuesto 1:



Códigos de una sola letra para los desoxirribonucleótidos:

- 30 A = adenosina
 C = citidina
 G = guanosina
 T = timidina

Precusores de componentes básicos:



Etiquetas de oligonucleótidos:

Secuencia	Nº de etiqueta
5'-PO ₄ -GCAACGAAG (SEQ I D NO:1)	1.1
ACCGTTGCT-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:2)	
5'-PO ₃ -GCGTACAAG (SEQ I D NO:3)	1.2
ACCGCATGT-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:4)	
5'-PO ₃ -GCTCTGTAG (SEQ ID NO:5)	1.3

ES 2 401 485 T3

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 -GCTTGAGT (SEQ ID NO:27)	2.2
TCCGAACCT-PO ₃ -5' (SEQ ID NO:28)	
5'-PO ₃ -GTCAAGCGT (SEQ ID NO:29)	2.3

ES 2 401 485 T3

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

ES 2 401 485 T3

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

ES 2 401 485 T3

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
CTGGTGCA-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

ES 2 401 485 T3

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'-PO ₃ -GCCATGTCC	(SEQ ID NO:107)	5.6
AACGGTACA-PO ₃ -5'	(SEQ ID NO:108)	
5'-PO ₃ -GTCTGCTCC	(SEQ ID NO:109)	5.7
AACAGACGA-PO ₃ -5'	(SEQ ID NO:110)	
5'-PO ₃ -CGACAGACC	(SEQ ID NO:111)	5.8
AAGCTGTCT-PO ₃ -5'	(SEQ ID NO:112)	
5'-PO ₃ -CGCTACTCC	(SEQ ID NO:113)	5.9
AAGCGATGA-PO ₃ -5'	(SEQ ID NO:114)	
5'-PO ₃ -CCACAGACC	(SEQ ID NO:115)	5.10
AAGGTGTCT-PO ₃ -5'	(SEQ ID NO:116)	
5'-PO ₃ -CCTCTCTCC	(SEQ ID NO:117)	5.11
AAGGAGAGA-PO ₃ -5'	(SEQ ID NO:118)	
5'-PO ₃ -CTCGTAGCC	(SEQ ID NO:119)	5.12
AAGAGCATC-PO ₃ -5'	(SEQ ID NO:120)	

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

Tampón de ligasa 10X: Tris 500 mM, pH 7,5; ditiotreitól 100 mM; MgCl₂ 100 mM; ATP 25 mM, NaCl 500 mM.

Ciclo 1

- 5 A cada uno de 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 Etiquetas 1.1-1.12; 15 µl de tampón de ligasa 10X y 10 µl de agua desionizada. Se calentaron los tubos a 95°C durante 1 minuto y a continuación se enfriaron a 16°C durante 10 minutos. A cada tubo se añadieron 5.000 unidades de ADN ligasa de T4 (2,5 µl de una solución de 2.000.000 unidades/ml (New England Biolabs, Cat. N° M0202)) en 50 µl de tampón de ligasa 1X y se incubaron las soluciones resultantes a 16°C durante 16 horas.
- 10

Tras la ligación, se transfirieron las muestras a tubos Eppendorf de 1,5 ml y se trataron con 20 μ l de NaCl acuoso 5 M y 500 μ l de etanol frío (-20°C), y se mantuvieron a -20°C durante 1 hora. Tras la centrifugación, se separó el sobrenadante y se lavó el sedimento con etanol acuoso al 70% a -20°C. A continuación se disolvió cada uno de los sedimentos en 150 μ l de tampón borato sódico 150 mM, pH 9,4.

5 Las soluciones de reserva que comprendían uno de cada uno de los precursores de componentes básicos 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. Se añadieron las soluciones de precursores de componentes básicos a cada una de las soluciones de sedimento descritas anteriormente para proporcionar una cantidad 10 veces mayor de precursor de componente básico respecto al conector. Se agitaron las soluciones resultantes. Se añadieron a la mezcla de reacción 10 equivalentes adicionales de precursor de componente básico al cabo de 20 minutos, y otros 10 equivalentes al cabo de 40 minutos. La concentración final de DMF en la mezcla de reacción fue del 22%. A continuación se agitaron las soluciones de reacción durante toda la noche a 4°C. Se supervisó el desarrollo de la reacción mediante RP-HPLC utilizando acetato de tetraetilamonio acuoso 50 mM (pH = 7,5) y acetonitrilo, y un gradiente del 2%-46% de acetonitrilo durante 14 minutos. Se detuvo la reacción cuando ~95% del material de partida (conector) estaba acilado. Tras la acilación, las mezclas de reacción se agruparon y se liofilizaron a sequedad. A continuación se purificó el material liofilizado por HPLC, y se agruparon y liofilizaron las fracciones correspondientes a la biblioteca (producto acilado).

20 Se disolvió la biblioteca en 2,5 ml de tampón fosfato sódico 0,01 M (pH = 8,2) y se añadieron a la misma 0,1 ml de piperidina (4% v/v). La adición de piperidina da como resultado una turbidez que no se disuelve por mezclado. Se agitaron las mezclas de reacción a temperatura ambiente durante 50 minutos, y a continuación se centrifugó la solución turbia (14.000 rpm), se separó el sobrenadante utilizando una pipeta de 200 μ l, y se resuspendió el sedimento en 0,1 ml de agua. Se combinó el lavado acuoso con el sobrenadante y se desechó el sedimento. La biblioteca desprotegida se hizo precipitar de la solución por adición de un exceso de etanol helado para llevar la concentración final de etanol en la reacción al 70% v/v. La centrifugación de la mezcla de etanol acuoso dio un sedimento blanco que comprendía la biblioteca. Se lavó el sedimento una vez con etanol acuoso al 70% frío. Después de la eliminación del disolvente, se secó el sedimento al aire (~5 minutos) para eliminar las trazas de etanol y a continuación se utilizó en el ciclo 2. Las etiquetas y los correspondientes precursores de componentes básicos utilizados en la Ronda 1 se exponen en la siguiente Tabla 1:

30

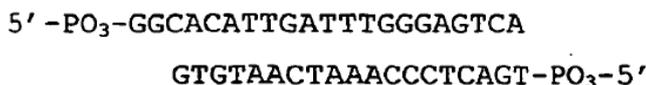
Tabla 1

Precursor de Componente básico	Etiqueta
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

Ciclos 2-5

5 Para cada uno de estos ciclos, se dividió la solución combinada resultante del ciclo anterior en 12 alícuotas iguales de 50 μ l cada una y se colocaron en tubos de PCR. Se añadió a cada tubo una solución que comprendía una etiqueta diferente, y se realizaron la ligación, la purificación y la acilación como se ha descrito para el Ciclo 1, salvo que para los ciclos 3-5, se omitió la etapa de purificación por HPLC descrita para el Ciclo 1. La correspondencia entre las etiquetas y los precursores de componentes básicos para los Ciclos 2-5 se presenta en la Tabla 2.

Los productos del Ciclo 5 se ligaron con el cebador de cierre que se muestra a continuación, utilizando el método descrito anteriormente para la ligación de las etiquetas.



10

Tabla 2

Precursor de Componente básico	Etiqueta del Ciclo 2	Etiqueta del Ciclo 3	Etiqueta del Ciclo 4	Etiqueta del Ciclo 5
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

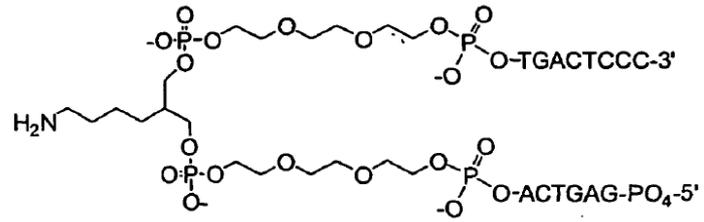
Resultados:

15 El procedimiento de síntesis descrito anteriormente tiene la capacidad de producir una biblioteca que comprende 12^5 (aproximadamente 249.000) estructuras diferentes. La síntesis de la biblioteca se supervisó mediante electroforesis en gel del producto de cada ciclo. En la Figura 7 se ilustran los resultados de cada uno de los cinco ciclos y la biblioteca final tras la ligación del cebador de cierre. El compuesto denominado "cabecera" es el Compuesto 1. La Figura muestra que cada ciclo da como resultado el aumento esperado del peso molecular y que los productos de cada ciclo son sustancialmente homogéneos en cuanto al peso molecular.

20 Ejemplo 2: Síntesis y caracterización de una biblioteca del orden de 10^8 miembros

Se llevó a cabo la síntesis de una biblioteca que comprende del orden de 10^8 miembros distintos utilizando los siguientes reactivos:

Compuesto 2:



Códigos de una sola letra para los desoxirribonucleótidos:

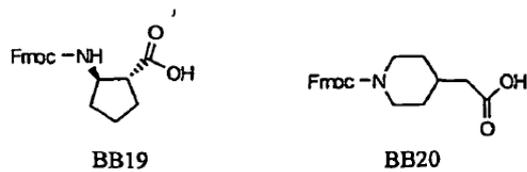
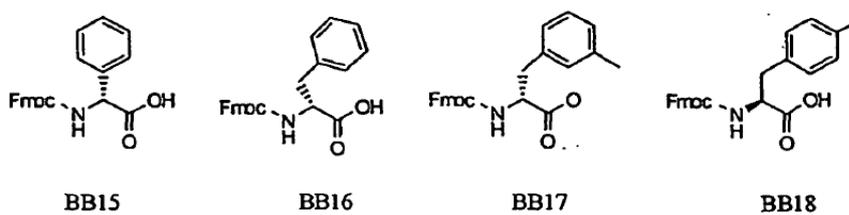
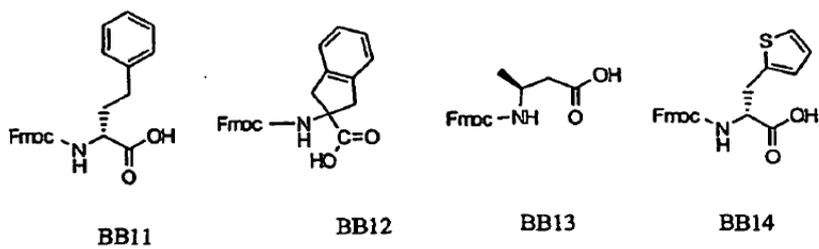
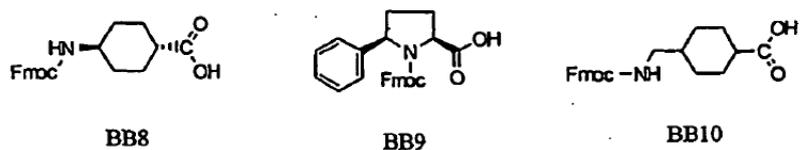
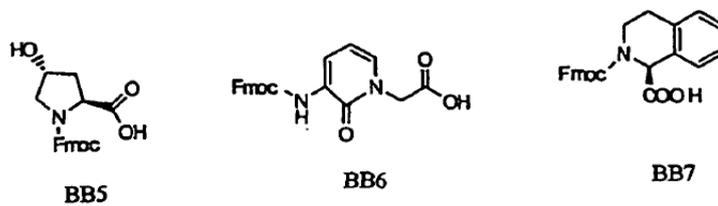
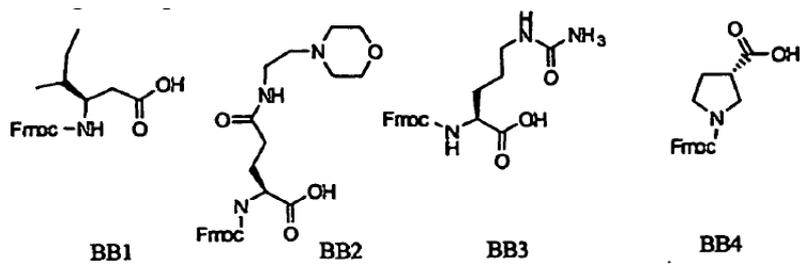
A = adenosina

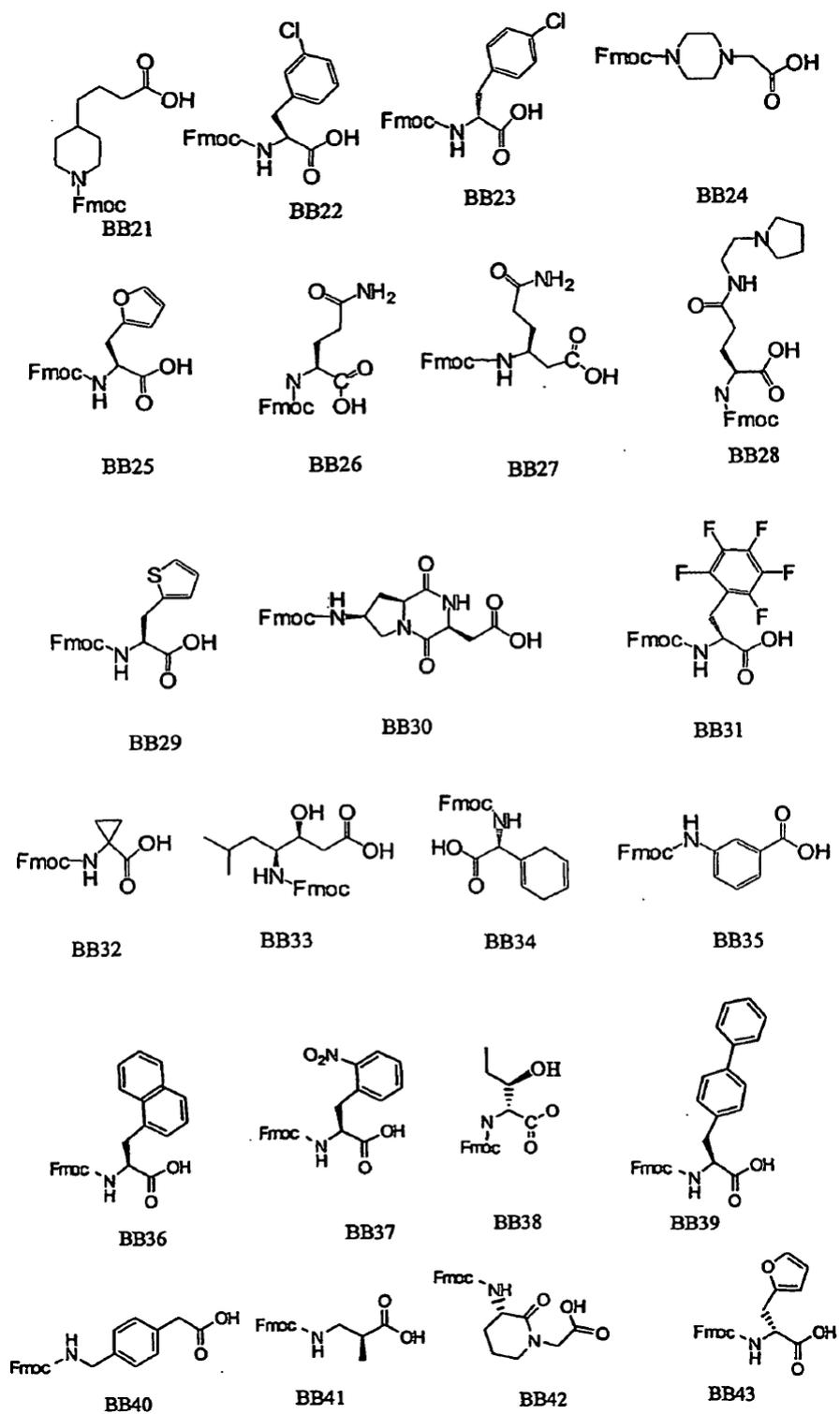
C = citidina

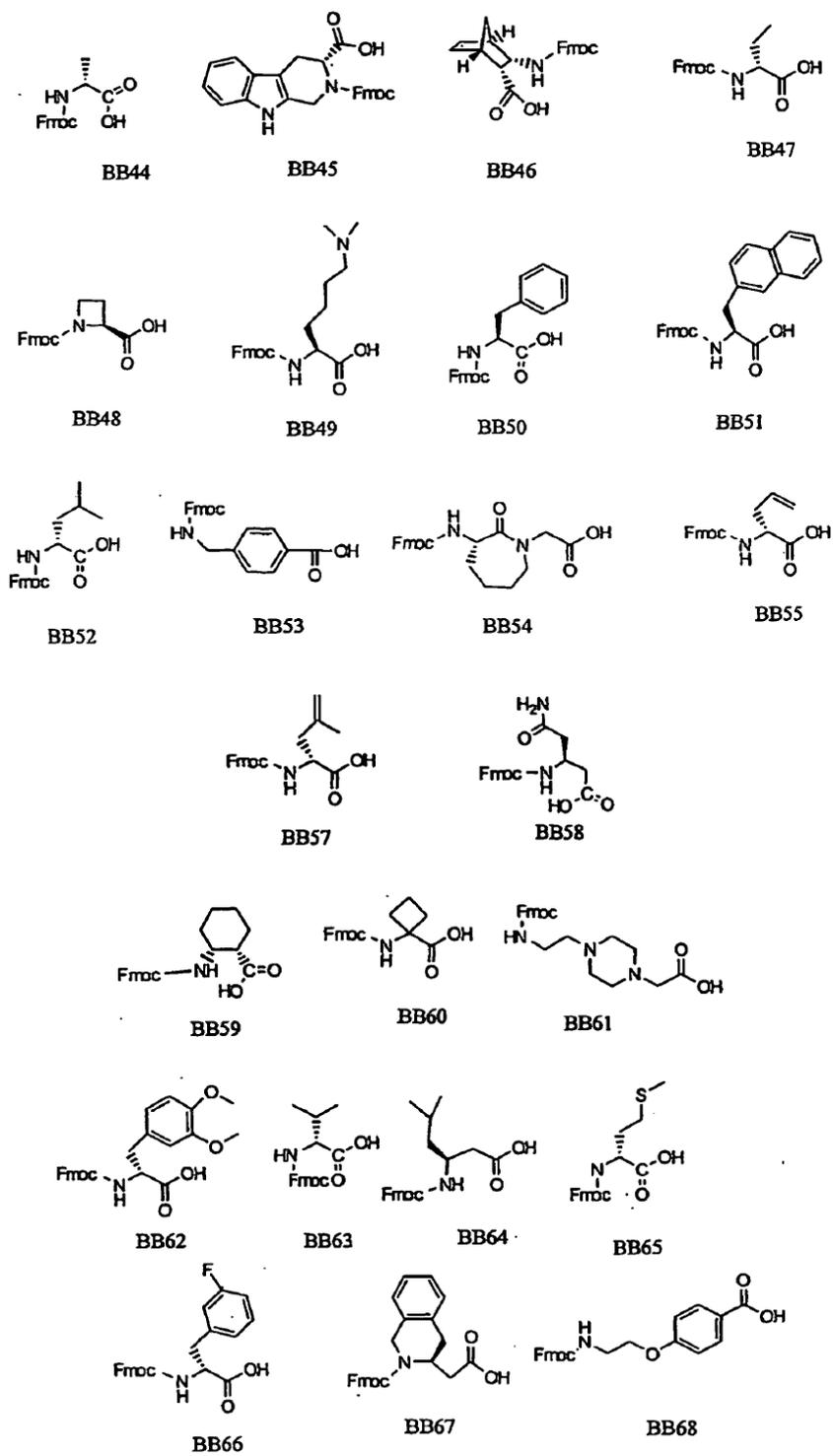
5 G = guanosina

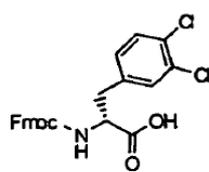
T = timidina

Precusores de componentes básicos:

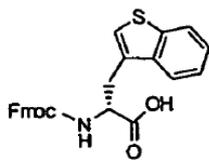








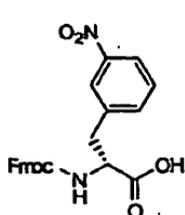
BB69



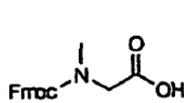
BB70



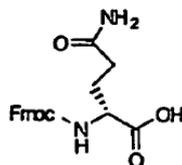
BB71



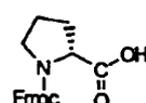
BB71



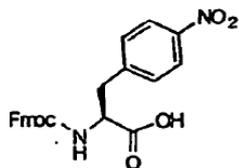
BB72



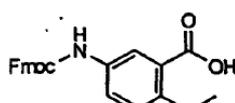
BB73



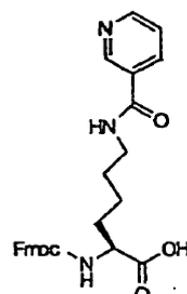
BB74



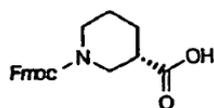
BB75



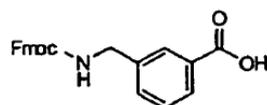
BB76



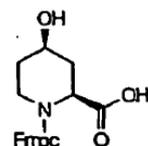
BB77



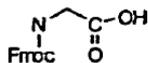
BB78



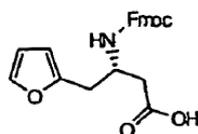
BB79



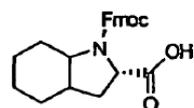
BB780



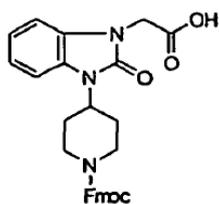
BB81



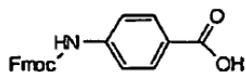
BB82



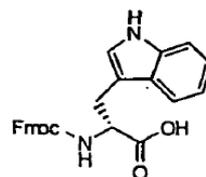
BB83



BB84



BB85



BB86

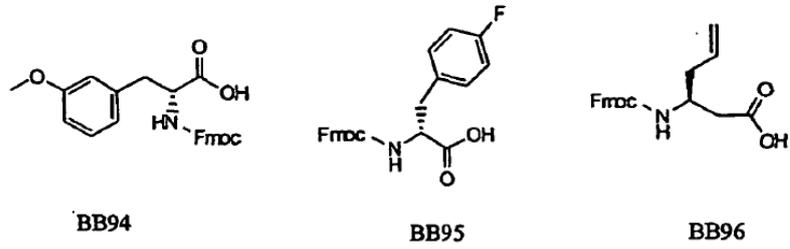
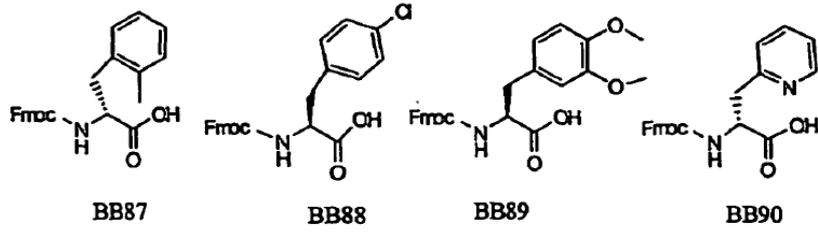


Tabla 3: Etiquetas de oligonucleótidos utilizadas en el ciclo 1:

Nº etiqueta	Secuencia de la hebra superior	Secuencia de la hebra inferior
1.1	5'-PO3- AAATCGATGTGGTCACTCAG (SEQ ID NO:121)	5'-PO3- GAGTGACCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:122)
1.2	5'-PO3- AAATCGATGTGGACTAGGAG (SEQ ID NO:123)	5'-PO3- CCTAGTCCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:124)
1.3	5'-PO3- AAATCGATGTGCCGTATGAG (SEQ ID NO:125)	5'-PO3- CATACGGCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:126)
1.4	5'-PO3- AAATCGATGTGCTGAAGGAG (SEQ ID NO:127)	5'-PO3- CCTTCAGCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:128)
1.5	5'-PO3- AAATCGATGTGGACTAGCAG (SEQ ID NO:129)	5'-PO3- GCTAGTCCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:130)
1.6	5'-PO3- AAATCGATGTGCGCTAAGAG (SEQ ID NO:131)	5'-PO3- CTTAGCGCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:132)
1.7	5'-PO3- AAATCGATGTGAGCCGAGAG (SEQ ID NO:133)	5'-PO3- CTCGGCTCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:134)

Nº etiqueta	Secuencia de la hebra superior	Secuencia de la hebra inferior
1.8	5'-PO3- AAATCGATGTGCCGTATCAG (SEQ ID NO:135)	5'-PO3- GATACGGCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:136)
1.9	5'-PO3- AAATCGATGTGCTGAAGCAG (SEQ ID NO:137)	5'-PO3- GCTTCAGCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:138)
1.10	5'-PO3- AAATCGATGTGTGCGAGTAG (SEQ ID NO:139)	5'-PO3- ACTCGCACACATCGATTTGG (SEQ ID NO:140)
1.11	5'-PO3- AAATCGATGTGTTTGCGGAG (SEQ ID NO:141)	5'-PO3- CGCCAAACACATCGATTTGG (SEQ ID NO:142)
1.12	5'-PO3- AAATCGATGTGCGCTAACAG (SEQ ID NO:143)	5'-PO3- GTTAGCGCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:144)
1.13	5'-PO3- AAATCGATGTGAGCCGACAG (SEQ ID NO:145)	5'-PO3- GTCGGCTCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:146)
1.14	5'-PO3- AAATCGATGTGAGCCGAAAG (SEQ ID NO:147)	5'-PO3- TTCGGCTCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:148)
1.15	5'-PO3- AAATCGATGTGTCGGTAGAG (SEQ ID NO:149)	5'-PO3- CTACCGACACATCGATTTGG (SEQ ID NO:150)
1.16	5'-PO3- AAATCGATGTGGTTGCCGAG (SEQ ID NO:151)	5'-PO3- CGGCAACCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:152)
1.17	5'-PO3- AAATCGATGTGAGTGCGTAG (SEQ ID NO:153)	5'-PO3- ACGCACTCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:154)
1.18	5'-PO3- AAATCGATGTGGTTGCCAAG (SEQ ID NO:155)	5'-PO3- TGGCAACCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:156)
1.19	5'-PO3- AAATCGATGTGTGCGAGGAG (SEQ ID NO:157)	5'-PO3- CCTCGCACACATCGATTTGG (SEQ ID NO:158)
1.20	5'-PO3- AAATCGATGTGGAACACGAG (SEQ ID NO:159)	5'-PO3- CGTGTTCCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:160)
1.21	5'-PO3- AAATCGATGTGCTTGTCGAG (SEQ ID NO:161)	5'-PO3- CGACAAGCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:162)
1.22	5'-PO3- AAATCGATGTGTTCCGGTAG (SEQ ID NO:163)	5'-PO3- A0CCGGAACACATCGATTTGG (SEQ ID NO:164)
1.23	5'-PO3- AAATCGATGTGTGCGAGCAG (SEQ ID NO:165)	5'-PO3- GCTCGCACACATCGATTTGG (SEQ ID NO:166)
1.24	5'-PO3- AAATCGATGTGGTCAGGTAG (SEQ ID NO:167)	5'-PO3- ACCTGACCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:168)

Nº etiqueta	Secuencia de la hebra superior	Secuencia de la hebra inferior
1.25	5'-PO3- AAATCGATGTGGCCTGTTAG (SEQ ID NO:169)	5'-PO3- AACAGGCCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:170)
1.26	5'-PO3- AAATCGATGTGGAACACCAG (SEQ ID NO:171)	5'-PO3- GGTGTTCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:172)
1.27	5'-PO3-AAATCGATGTGCTTGCCAG (SEQ ID NO: 173)	5'-PO3- GGACAAGCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:174)
1.28	5'-PO3- AAATCGATGTGTGCGAGAAG (SEQ ID NO:175)	5'-PO3- TCTCGCACACATCGATTTGG (SEQ ID NO:176)
1.29	5'-PO3- AAATCGATGTGAGTGC GGAG (SEQ ID NO:177)	5'-PO3- CCGCACTCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:178)
1.30	5'-PO3- AAATCGATGTGTTGTCCGAG (SEQ ID NO:179)	5'-PO3- CGGACAACACATCGATTTGG (SEQ ID NO:180)
1.31	5'-PO3- AAATCGATGTGTGGAACGAG (SEQ ID NO:181)	5'-PO3- CGTTCACACATCGATTTGG (SEQ ID NO:182)
1.32	5'-PO3- AAATCGATGTGAGTGC GAAG (SEQ ID NO:183)	5'-PO3- TCGCACTCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:184)
1.33	5'-PO3- AAATCGATGTGTGGAACCAG (SEQ ID NO:185)	5'-PO3- GGTTCACACATCGATTTGG (SEQ ID NO:186)
1.34	5'-PO3- AAATCGATGTGTTAGGCGAG (SEQ ID NO:187)	5'-PO3- CGCCTAACACATCGATTTGG (SEQ ID NO:188)
1.35	5'-PO3- AAATCGATGTGGCCTGTGAG (SEQ ID NO:189)	5'-PO3- CACAGGCCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:190)
1.36	5'-PO3-AAATCGATGTGCTCCTGTAG (SEQ ID NO:191)	5'-PO3- ACAGGAGCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:192)
1.37	5'-PO3- AAATCGATGTGGTCAGGCAG (SEQ ID NO:193)	5'-PO3- GCCTGACCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:194)
1.38	5'-PO3- AAATCGATGTGGTCAGGAAG (SEQ ID NO:195)	5'-PO3- TCCTGACCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:196)
1.39	5'-PO3- AAATCGATGTGGTAGCCGAG (SEQ ID NO:197)	5'-PO3- CGGCTACCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:198)
1.40	5'-PO3- AAATCGATGTGGCCTGTAAG (SEQ ID NO:199)	5'-PO3- TACAGGCCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:200)
1.41	5'-PO3- AAATCGATGTGCTTTCGGAG (SEQ ID NO:201)	5'-PO3- CCGAAAGCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:202)

Nº etiqueta	Secuencia de la hebra superior	Secuencia de la hebra inferior
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-AAATCGATGTGCTTCGCAG (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)

Nº etiqueta	Secuencia de la hebra superior	Secuencia de la hebra inferior
1.59	5'-PO3- AAATCGATGTGCTATCGGAG (SEQ ID NO:237)	5'-PO3- CCGATAGCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:238)
1.60	5'-PO3- AAATCGATGTGCGAAAGGAG (SEQ ID NO:239)	5'-PO3- CCTTTTCGCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:240)
1.61	5'-PO3- AAATCGATGTGCCGAAGAAG (SEQ ID NO:241)	5'-PO3- TCTTCGGCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:242)
1.62	5'-PO3- AAATCGATGTGGTTGCAGAG (SEQ ID NO:243)	5'-PO3- CTGCAACCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:244)
1.63	5'-PO3- AAATCGATGTGGATGGTGAG (SEQ ID NO:245)	5'-PO3- CACCATCCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:246)
1.64	5'-PO3- AAATCGATGTGCTATCGCAG (SEQ ID NO:247)	5'-PO3- GCGATAGCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:248)
1.65	5'-PO3- AAATCGATGTGCGAAAGCAG (SEQ ID NO:249)	5'-PO3- GCTTTTCGCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:250)
1.66	5'-PO3- AAATCGATGTGACACTGGAG (SEQ ID NO:251)	5'-PO3- CCAGTGTCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:252)
1.67	5'-PO3- AAATCGATGTGTCTGGCAAG (SEQ ID NO:253)	5'-PO3- TGCCAGACACATCGATTTGG (SEQ ID NO:254)
1.68	5'-PO3- AAATCGATGTGGATGGTCAG (SEQ ID NO:255)	5'-PO3- GACCATCCACATCGATTTGG (SEQ ID NO:256)
1.69	5'-PO3- AAATCGATGTGGTTGCACAG (SEQ ID NO:257)	5'-PO3- GTGCAACCACATCGATTTGG (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- GGAGGCACACATCGATTTGG (SEQ ID NO:262)
1.72	5'-PO3- AAATCGATGTGTGCCTCAAG (SEQ ID NO:263)	5'-PO3- TGAGGCACACATCGATTTGG (SEQ ID NO:264)
1.73	5'-PO3- AAATCGATGTGGGCATCCAG (SEQ ID NO:265)	5'-PO3- GGATGCCCCACATCGATTTGG (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)

Nº etiqueta	Secuencia de la hebra superior	Secuencia de la hebra inferior
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- AAATCGATGTGCCTGTCAAG (SEQ ID NO:277)	5'-PO3-TGA CAG GCA CAT CGA TTT GG (SEQ ID NO:278)
1.80	5'-PO3- AAATCGATGTGAAGCACCGAG (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- AAATCGATGTGTCGTCGAAG (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)

ES 2 401 485 T3

Nº etiqueta	Secuencia de la hebra superior	Secuencia de la hebra inferior
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 (SEQ ID NO:309)	5'-PO3-GAC CTT CCA CAT CGA TTT GG (SEQ ID NO:310)
1.96	5'-PO3- AAATCGATGTGGTGCTGTAG (SEQ ID NO:311)	5'-PO3-ACA GCA CCA CAT CGA TTT GG (SEQ ID NO:312)

Tabla 4: Etiquetas de oligonucleótidos utilizadas en el ciclo 2:

Nº etiqueta	Secuencia de la hebra superior	Secuencia de la hebra 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-TG 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 (SEQ ID NO:353)	5'-PO3-GCC AGT GCT (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)

ES 2 401 485 T3

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 CGT (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)

ES 2 401 485 T3

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-GGCATAGGT (SEQ ID NO:435)	5'-PO3-CTATGCCCT (SEQ ID NO:436)
2.63	5'-PO3-GCGATTCGT (SEQ ID NO:437)	5'-PO3-GAATCGCCT (SEQ ID NO:438)
2.64	5'-PO3-TGCGACGGT (SEQ ID NO:439)	5'-PO3-CGTGCACT (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-TGTGCACT (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-ATGGTGCCT (SEQ ID NO:468)
2.79	5'-PO3-TCGTCAAGT (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)
	5'-PO3-TTAGCCGGT5'- PO3-3'	5'-PO3-CGGCTAACT5'-PO3- 3'
2.92	(SEQ ID NO: 495)	(SEQ ID NO: 496)
2.93	5'-PO3-GAGACGAGT (SEQ ID NO:497)	5'-PO3-TCGTCTCCT (SEQ ID NO:498)

ES 2 401 485 T3

2.94	5'-PO3-CGTAACCGT (SEQ ID NO:499)	5'-PO3-GGTTACGCT (SEQ ID NO:500)
	5'-PO3-TTGCGTGT5'- PO3-3'	5'-PO3-ACGCCAACT5'-PO3- 3'
2.95	(SEQ ID NO: 501)	(SEQ ID NO: 502)
2.96	5'-PO3-ATGGCAGGT (SEQ ID NO:503)	5'-PO3-CTGCCATCT (SEQ ID NO:504)

Tabla 5. Etiquetas de oligonucleótidos utilizadas en el ciclo 3

Nº etiqueta	Secuencia de la hebra superior	Secuencia de la hebra 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)

ES 2 401 485 T3

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)
3.50	5'-PO3-AGT GCA GGA (SEQ ID NO:603)	5'-PO3-CTG CAC TAC (SEQ ID NO:604)
3.51	5'-PO3-GAC CGT TGA (SEQ ID NO:605)	5'-PO3-AAC GGT CAC (SEQ ID NO:606)
3.52	5'-PO3-GGT GAG TGA (SEQ ID NO:607)	5'-PO3-AGT CAC CAC (SEQ ID NO:608)
3.53	5'-PO3-CCT TCC TGA (SEQ ID NO:609)	5'-PO3-AGG AAG GAC (SEQ ID NO:610)
3.54	5'-PO3-CTG GCT AGA (SEQ ID NO:611)	5'-PO3-TAG CCA GAC (SEQ ID NO:612)
3.55	5'-PO3-CAC ACC AGA (SEQ ID NO:613)	5'-PO3 TGG TGT GAC (SEQ ID NO:614)
3.56	5'-PO3-AGC GGT AGA (SEQ ID NO:615)	5'-PO3-TAC CGC TAC (SEQ ID NO:616)
3.57	5'-PO3-GTC AGA GGA (SEQ ID NO:617)	5'-PO3-CTC TGA CAC (SEQ ID NO:618)
3.58	5'-PO3-TTC CGA CGA (SEQ ID NO:619)	5'-PO3-GTC GGA AAC (SEQ ID NO:620)
3.59	5'-PO3-AGG CGT AGA (SEQ ID NO:621)	5'-PO3-TAC GCC TAC (SEQ ID NO:622)
3.60	5'-PO3-CTC GAC TGA (SEQ ID NO:623)	5'-PO3-AGT CGA GAC (SEQ ID NO:624)
3.61	5'-PO3-TAC GCT GGA (SEQ ID NO:625)	5'-PO3-CAG CGT AAC (SEQ ID NO:626)
3.62	5'-PO3-GTT CGG TGA (SEQ ID NO:627)	5'-PO3-ACC GAA CAC (SEQ ID NO: 628)

ES 2 401 485 T3

3.63	5'-PO3-GCC AGC AGA (SEQ ID NO:629)	5'-PO3-TGC TGG CAC (SEQ ID NO:630)
3.64	5'-PO3-GAC CGT AGA (SEQ ID NO:631)	5'-PO3-TAC GGT CAC (SEQ ID NO:632)
3.65	5'-PO3-GTG CTC TGA (SEQ ID NO:633)	5'-PO3-AGA GCA CAC (SEQ ID NO:634)
3.66	5'-PO3-GGT GAG CGA (SEQ ID NO:635)	5'-PO3-GCT CAC CAC (SEQ ID NO:636)
3.67	5'-PO3-GGT GAG AGA (SEQ ID NO:637)	5'-PO3-TCT CAC CAC (SEQ ID NO:638)
3.68	5'-PO3-CCT TCC AGA (SEQ ID NO:639)	5'-PO3-TGG AAG GAC (SEQ ID NO:640)
3.69	5'-PO3-CTC CTA CGA (SEQ ID NO:641)	5'-PO3-GTA GGA GAC (SEQ ID NO:642)
3.70	5'-PO3-CTC GAC GGA (SEQ ID NO:643)	5'-PO3-CGT CGA GAC (SEQ ID NO:644)
3.71	5'-PO3-GCC GTT TGA (SEQ ID NO:645)	5'-PO3-AAA CGG CAC (SEQ ID NO:646)
3.72	5'-PO3-GCG GAG TGA (SEQ ID NO:647)	5'-PO3-ACT CCG CAC (SEQ ID NO:648)
3.73	5'-PO3-CGT GCT TGA (SEQ ID NO:649)	5'-PO3-AAG CAC GAC (SEQ ID NO:650)
3.74	5'-PO3-CTC GAC CGA (SEQ ID NO:651)	5'-PO3-GGT CGA GAC (SEQ ID NO:652)
3.75	5'-PO3-AGA GCA GGA (SEQ ID NO:653)	5'-PO3-CTG GTC TAC (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-GGT 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 6. Etiquetas de oligonucleótidos utilizadas en el ciclo 4

ES 2 401 485 T3

Nº etiqueta	Secuencia de la hebra superior	Secuencia de la hebra 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-ATGTCCGTC (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-CGGCACTT (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-ACCTTGGTT (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-GTTCTGTT (SEQ ID NO:763)	5'-PO3-CAG GAA CTC (SEQ ID NO:764)

ES 2 401 485 T3

4.35	5'-PO3-ACACTCCTT (SEQ ID NO:765)	5'-PO3-GGA GTG TTC (SEQ ID NO:766)
4.36	5'-PO3 -GTTCCCTCTT (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-ACGGCATTT (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-GTTCCGGCTT (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-GCGGATTTTC (SEQ ID NO:802)
4.54	5'-PO3-AGGCTGGTT (SEQ ID NO:803)	5'-PO3-CCA GCC TTC (SEQ ID NO:804)
4.55	5'-PO3-GCTAGTGTT (SEQ ID NO:805)	5'-PO3-CAC TAG CTC (SEQ ID NO:806)
4.56	5'-PO3-GGAGAGCTT (SEQ ID NO:807)	5'-PO3-GCT CTC CTC (SEQ ID NO:808)
4.57	5'-PO3-GGAGAGATT (SEQ ID NO:809)	5'-PO3-TCT CTC CTC (SEQ ID NO:810)
4.58	5'-PO3-AGGCTGCTT (SEQ ID NO:811)	5'-PO3-GCA GCC TTC (SEQ ID NO:812)
4.59	5'-PO3-GAGTGCGTT (SEQ ID NO:813)	5'-PO3-CGC ACT CTC (SEQ ID NO:814)
4.60	5'-PO3-CCATCCATT (SEQ ID NO:815)	5'-PO3-TGG ATG GTC (SEQ ID NO:816)
4.61	5'-PO3-GGTAGTCTT (SEQ ID NO:817)	5'-PO3-GAC TAG CTC (SEQ ID NO:818)
4.62	5'-PO3-AGGCTGATT (SEQ ID NO:819)	5'-PO3-TCA GCC TTC (SEQ ID NO:820)
4.63	5'-PO3-ACAGACGTT (SEQ ID NO:821)	5'-PO3-CGT CTG TTC (SEQ ID NO:822)
4.64	5'-PO3-GAGTGCCTT (SEQ ID NO:823)	5'-PO3-GGC ACT CTC (SEQ ID NO:824)
4.65	5'-PO3-ACAGACCTT (SEQ ID NO:825)	5'-PO3-GGT CTG TTC (SEQ ID NO:826)
4.66	5'-PO3-CGAGCTTT (SEQ ID NO:827)	5'-PO3-AAG CTC GTC (SEQ ID NO:828)
4.67	5'-PO3-TTAGCGGTT (SEQ ID NO:829)	5'-PO3-CCG CTA ATC (SEQ ID NO:830)
4.68	5'-PO3-CCTCTTGTT (SEQ ID NO:831)	5'-PO3-CAA GAG GTC (SEQ ID NO:832)
4.69	5'-PO3-GGTCTCTTT (SEQ ID NO:833)	5'-PO3-AGA GAC CTC (SEQ ID NO:834)
4.70	5'-PO3-GCCAGATTT (SEQ ID NO:835)	5'-PO3-ATC TGG CTC (SEQ ID NO:836)

ES 2 401 485 T3

4.71	5'-PO3-GAGACCTTT (SEQ ID NO:837)	5'-PO3-AGG TCT CTC (SEQ ID NO:838)
4.72	5'-PO3-CACACAGTT (SEQ ID NO:839)	5'-PO3-CTG TGT GTC (SEQ ID NO:840)
4.73	5'-PO3-CCTCITCTT (SEQ ID NO:841)	5'-PO3-GAA GAG GTC (SEQ ID NO:842)
4.74	5'-PO3-TAGAGCGTT (SEQ ID NO:843)	5'-PO3-CGC TCT ATC (SEQ ID NO:844)
4.75	5'-PO3-GCACCTTTT (SEQ ID NO:845)	5'-PO3-AAG GTG CTC (SEQ ID NO:846)
4.76	5'-PO3-GGCTTGTTT (SEQ ID NO:847)	5'-PO3-ACA AGC CTC (SEQ ID NO:848)
4.77	5'-PO3-GACGCGATT (SEQ ID NO:849)	5'-PO3 TCG CGT CTC (SEQ ID NO:850)
4.78	5'-PO3-GGAGCTGTT (SEQ ID NO:851)	5'-PO3-CAG CTC GTC (SEQ ID NO:852)
4.79	5'-PO3-TAGAGCCTT (SEQ ID NO:853)	5'-PO3-GGC TCT ATC (SEQ ID NO:854)
4.80	5'-PO3-CATCCGTTT (SEQ ID NO:855)	5'-PO3-ACG GAT GTC (SEQ ID NO:856)
4.81	5'-PO3-GGTGTCGTT (SEQ ID NO:857)	5'-PO3-CGA GAC CTC (SEQ ID NO:858)
4.82	5'-PO3-GCCAGAGTT (SEQ ID NO:859)	5'-PO3-GTC TGG GTC (SEQ ID NO:860)
4.83	5'-PO3-GAGACCGTT (SEQ ID NO:861)	5'-PO3-CGGTCTCTC (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 GTC (SEQ ID NO:870)
4.88	5'-PO3-GGTCTCATT (SEQ ID NO:871)	5'-PO3-TGA GAC GTC (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 componentes básicos y etiquetas de oligonucleótidos para los Ciclos 1-4.

Componente básico	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 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
BB6	1.6	2.6	3.6	4.6

ES 2 401 485 T3

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
BB12	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
BB16	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
BB39	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
BB42	1.42	2.42	3.42	4.42

ES 2 401 485 T3

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

ES 2 401 485 T3

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	3.92	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

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

Tampón de ligasa 10X: Tris 500 mM, pH 7,5; ditiotreititol 100 mM; MgCl₂ 100 mM; ATP 20 mM; NaCl 500 mM.

Fijación del espaciador soluble en agua al Compuesto 2

5 A una solución de Compuesto 2 (60 ml, 1 mM) en tampón borato sódico (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-tetraoxaocadecanoico (S-Ado) en N,N-dimetilformamida (DMF) (16 ml, 0,15 M) seguido de 40 equivalentes de cloruro de 4-(4,6-dimetoxi[1.3.5]triazin-2-il)-4-metilmorfolinio hidratado (DMTMM) en agua (9,6 ml, 0,25 M). Se agitó suavemente la mezcla durante 2 horas a 4°C antes de añadir 40 equivalentes adicionales de S-Ado y DMTMM y se agitó durante otras 16 horas a 4°C.

10 Tras la acilación, se añadió 0,1 veces el volumen de NaCl acuoso 5 M y 2,5 veces el volumen de etanol frío (-20°C) y se dejó reposar la mezcla a -20°C durante al menos una hora. A continuación se centrifugó la mezcla durante 15 minutos a 14.000 rpm a 4°C en una centrífuga para dar un sedimento blanco que se lavó con EtOH frío y a continuación se secó en un liofilizador a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se disolvió el sólido en 40 ml de agua y se purificó por HPLC de fase inversa con una columna Waters Xterra RP₁₈. Se utilizó un perfil de gradiente de la fase móvil binario para eluir el producto utilizando un tampón acetato de trietilamonio acuoso 50 mM de pH 7,5 y una solución de acetonitrilo al 99%/agua al 1%. Se concentró el material purificado por liofilización y se disolvió el residuo resultante en 5 ml de agua. Se añadió a la solución 0,1 veces el volumen de piperidina y se agitó suavemente la mezcla durante 45 minutos a temperatura ambiente. A continuación se purificó el producto por precipitación con etanol como se ha descrito anteriormente y se aisló por centrifugación. Se lavó el sedimento resultante dos veces con EtOH frío y se secó por liofilización para dar el Compuesto 3 purificado.

Ciclo 1

25 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 de las etiquetas de oligonucleótidos 1.1 a 1.96, como se muestra en la Tabla 3 (la relación molar entre el Compuesto 3 y las etiquetas fue 1:2). Se calentaron las placas a 95°C durante 1 minuto y a continuación se enfriaron a 16°C durante 10 minutos. A cada pocillo se añadieron 10 µl de tampón de

ligasa 10X, 30 unidades de ADN ligasa de T4 (1 µl de una solución de 30 unidades/µl (FermentasLife Science, Cat. N° BL0013)), 76,5 µl de agua y se incubaron las soluciones resultantes a 16°C durante 16 horas.

5 Después de la reacción de ligación, se añadieron directamente a cada pocillo 20 µl de NaCl acuoso 5 M, seguido de 500 µl de etanol frío (-20°C), y se mantuvo a -20°C durante 1 hora. Se centrifugaron las placas durante 1 hora a 3.200 g en una centrífuga Beckman Coulter Allegra 6R utilizando Beckman Microplus Carriers. Se separó cuidadosamente el sobrenadante poniendo la placa al revés y se lavó el sedimento con etanol frío acuoso al 70% a -20°C. A continuación se disolvió cada uno de los sedimentos en tampón borato sódico (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 de componentes básicos en DMF (13 µl, 0,15 M) seguido de 40 equivalentes de DMT-MM en agua (8 µl, 0,25 M), y se agitaron suavemente las soluciones a 4°C. Al cabo de 2 horas, se añadieron 40 equivalentes adicionales de uno de cada precursor de componente básico y DMTMM, y se agitaron suavemente las soluciones durante 16 horas a 4°C. Tras la acilación, se añadieron a cada solución 10 equivalentes de ácido acético-éster de N-hidroxi-succinimida en DMF (2 µl, 0,25 M) y se agitó suavemente durante 10 minutos.

15 Tras la acilación, se agruparon las 96 mezclas de reacción y se añadieron 0,1 volúmenes de NaCl acuoso 5 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío y se dejó reposar la solución a -20°C durante al menos una hora. A continuación se centrifugó la mezcla. Tras la centrifugación, se separó con una micropipeta tanto sobrenadante como fue posible, se lavó el sedimento con etanol frío y se centrifugó de nuevo. Se separó el sobrenadante con una pipeta de 200 µl. Se añadió al tubo etanol frío al 70%, y se centrifugó la mezcla resultante durante 5 minutos a 4°C.

20 Se separó el sobrenadante y el etanol restante se eliminó por liofilización a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación se disolvió el sedimento en 2 ml de agua y se purificó por HPLC de fase inversa con una columna Waters Xterra RP₁₈. Se utilizó un perfil de gradiente de la fase móvil binario para eluir la biblioteca utilizando un tampón acetato de trietilamonio acuoso 50 mM de pH 7,5 y una solución de acetonitrilo al 99%/ agua al 1%. Las fracciones que contenían la biblioteca se recogieron, se agruparon, y se liofilizaron. Se disolvió el residuo resultante en 2,5 ml de agua y se añadieron 250 µl de piperidina. Se agitó la solución suavemente durante 45 minutos y a continuación se hizo precipitar con etanol como se ha descrito anteriormente. Se secó por liofilización el sedimento resultante y a continuación se disolvió en tampón borato sódico (4,8 ml, 150 mM, pH 9,4) a una concentración de 1 mM.

30 Se enfrió la solución a 4°C y se añadieron 40 equivalentes de cada uno de N-Fmoc-propargilglicina en DMF (1,2 ml, 0,15 M) y DMT-MM en agua (7,7 ml, 0,25 M). Se agitó suavemente la mezcla durante 2 horas a 4°C antes de añadir 40 equivalentes adicionales de N-Fmoc-propargilglicina y DMT-MM y se agitó la solución durante otras 16 horas. Más tarde se purificó la mezcla por precipitación con EtOH y HPLC de fase inversa como se ha descrito anteriormente y se eliminó el grupo N-Fmoc mediante tratamiento con piperidina como se ha descrito anteriormente. Tras la purificación final por precipitación con EtOH, se secó por liofilización el sedimento resultante y se llevó al siguiente ciclo de síntesis.

35

Ciclos 2-4

40 Para cada uno de estos ciclos, se disolvió en agua el sedimento seco del ciclo anterior y se determinó la concentración de la biblioteca por espectrofotometría en base al coeficiente de extinción del componente de ADN de la biblioteca, en el que el coeficiente de extinción inicial del Compuesto 2 es 131.500 L/(mol.cm). Se ajustó la concentración de la biblioteca con agua de manera que la concentración final en las reacciones de ligación posteriores fuera 0,25 mM. A continuación se dividió la biblioteca en 96 alícuotas iguales en una placa de 96 pocillos. A cada pocillo se añadió una solución que comprendía una etiqueta diferente (la relación molar entre la biblioteca y la etiqueta fue 1:2), y se realizaron las ligaciones como se ha descrito para el Ciclo 1. En las Tablas 4, 5 y 6 se exponen, respectivamente, las etiquetas de oligonucleótidos utilizadas en los ciclos 2, 3 y 4. En la Tabla 7 se proporcionan las correspondencias entre las etiquetas y los precursores de componentes básicos para cada uno de los Ciclos 1 a 4. Se hizo precipitar la biblioteca por adición de etanol como se ha descrito anteriormente para el Ciclo 1, y se disolvió en tampón borato sódico (150 mM, pH 9,4) a una concentración de 1 mM. Las acilaciones y purificaciones posteriores se realizaron como se ha descrito para el Ciclo 1, salvo que durante el Ciclo 3 se omitió la purificación por HPLC.

50 Los productos del Ciclo 4 se ligaron con el cebador de cierre que se muestra a continuación, utilizando el método descrito anteriormente para la ligación de las etiquetas.

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 anteriormente tiene la capacidad de producir una biblioteca que comprende 96⁴ (aproximadamente 10⁸) estructuras diferentes. La síntesis de la biblioteca se supervisó por medio de

electroforesis en gel y LC/MS del producto de cada ciclo. Tras la finalización, se analizó la biblioteca utilizando varias técnicas. La Figura 13a es un cromatograma de la biblioteca tras el Ciclo 4, pero antes de la ligación del cebador de cierre. La Figura 13b es un espectro de masas de la biblioteca en la misma etapa de síntesis. Se determinó el peso molecular medio mediante análisis LC/MS en modo ion negativo. Se realizó la deconvolución de la señal iónica utilizando el software ProMass. Este resultado es coherente con la masa media predicha de la biblioteca.

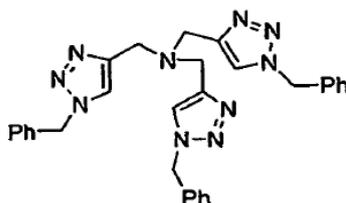
5

Se analizó el componente de ADN de la biblioteca por electroforesis en gel de agarosa, que mostró que la mayoría de los materiales de la biblioteca se corresponde con el producto ligado del tamaño correcto. El análisis de secuencias de ADN de los clones moleculares del producto de PCR derivados de un muestreo de la biblioteca muestra que la ligación de ADN se daba con gran fidelidad y hasta casi la finalización.

10 Ciclación de la biblioteca

Al finalizar el Ciclo 4, una porción de la biblioteca se protegió en el extremo N-terminal utilizando ácido azidoacético en las condiciones de acilación habituales. El producto, después de la purificación por precipitación con EtOH, se disolvió en tampón fosfato sódico (150 mM, pH 8) a una concentración de 1 mM y se añadieron 4 equivalentes de cada uno de CuSO₄ en agua (200 mM), ácido ascórbico en agua (200 mM), y una cantidad catalítica del compuesto que se muestra a continuación como una solución en DMF (200 mM). A continuación se agitó suavemente la mezcla de reacción durante 2 horas a temperatura ambiente.

15



Para someter a ensayo el grado de ciclación, se separaron alícuotas de 5 µl de la reacción de ciclación de la biblioteca y se trataron con una azida o alquino marcado fluorescentemente (1 µl de las reservas de DMF 100 mM) preparado como se describe en el Ejemplo 4. Al cabo de 16 horas, ninguno de los marcadores azida o alquino había sido incorporado en la biblioteca por análisis de HPLC a 500 nm. Este resultado indicaba que la biblioteca ya no contenía grupos azida o alquino capaces de cicloadición y que por lo tanto la biblioteca debía haber reaccionado consigo misma, bien por reacciones intermoleculares o de ciclación. Se purificó la biblioteca ciclada por HPLC de fase inversa como se ha descrito anteriormente. Los experimentos testigo que utilizaban la biblioteca no ciclada mostraron una incorporación completa de las etiquetas fluorescentes mencionadas anteriormente.

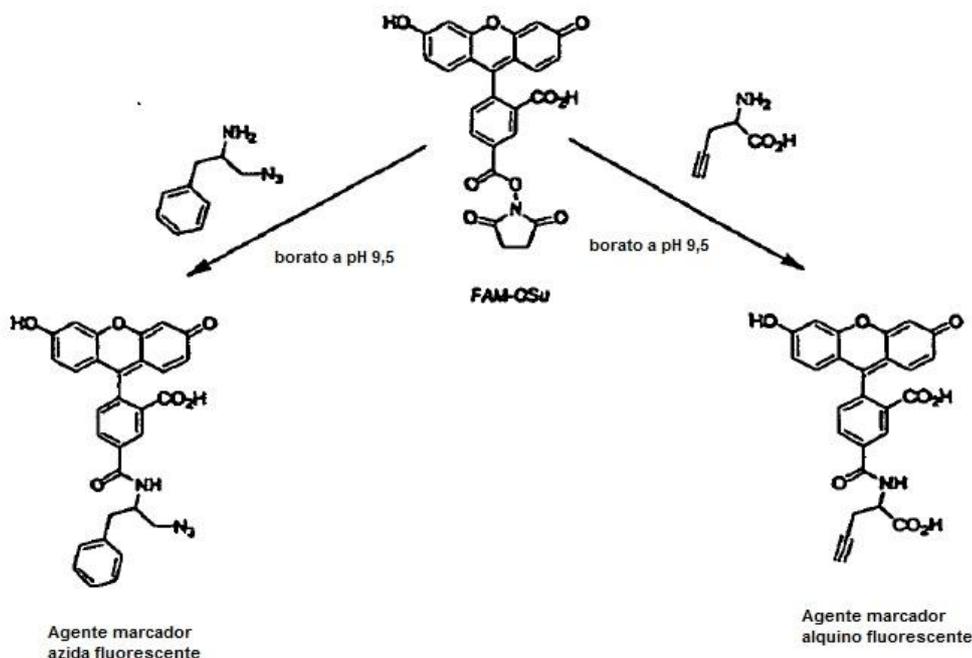
20

25

Ejemplo 4: Preparación de etiquetas fluorescentes para el ensayo de ciclación:

En tubos separados, se combinó propargilglicina o 2-amino-3 fenilpropilazida (8 µmol de cada uno) con FAMOSu (Molecular Probes Inc.) (1,2 equivalentes) en tampón borato de pH 9,4 (250 µl). Se dejó que las reacciones continuasen durante 3 horas a temperatura ambiente, y a continuación se liofilizaron durante toda la noche. La purificación por HPLC proporcionó la azida y el alquino fluorescente deseados con un rendimiento cuantitativo.

30



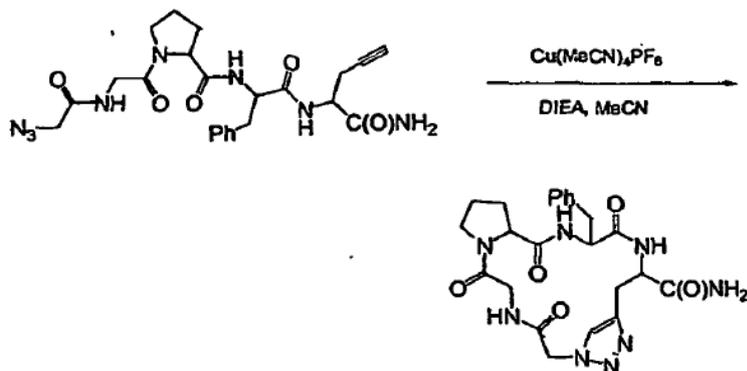
Ejemplo 5: Ciclación de compuestos individuales utilizando la reacción de cicloadición azida/alquino

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

5 Utilizando 0,3 mmol de resina Rink-amida, se sintetizó la secuencia indicada utilizando técnicas convencional de síntesis en fase sólida con Fmoc y HATU como agente de activación (Pra = C-propargilglicina). Se utilizó ácido azidoacético para proteger el tetrapéptido. El péptido se escindió de la resina con TFA/DCM al 20% durante 4 horas. 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, 7H), 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 (suspensión) 2900, 2100, 1450, 1300 cm⁻¹. ESIMS 497,4 ([M+H], 100%), 993,4 ([2M+H], 50%). ESIMS con fragmentación en la fuente de iones: 519,3 ([M+Na], 100%), 491,3 (100%), 480,1 ([M-NH₂], 90%), 452,2 ([M-NH₂-CO], 20%), 424,2 (20%), 385,1 ([CM-Pra], 50%), 357,1 ([M-Pra-CO], 40%), 238,0 ([M-Pra-Phe], 100%).

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

15



Se disolvió el péptido azidoacetil (31 mg, 0,62 mmol) en MeCN (30 ml). Se añadieron diisopropilamina (DIEA, 1 ml) y Cu(MeCN)₄PF₆ (1 mg). Después de agitar durante 1,5 horas, se evaporó la solución y se recogió el residuo resultante en MeCN/H₂O al 20%. Después de la centrifugación para eliminar las sales insolubles, se sometió

la solución a HPLC preparativa en fase inversa. Se aisló el péptido cíclico deseado 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 (suspensión) 2900, 1475, 1400 cm⁻¹. ESIMS 497,2 ([M+H], 100%), 993,2 ([2M+H], 30%), 1015,2 ([2M+Na], 15%) ESIMS con fragmentación en la fuente de iones: 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%).

5

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

Utilizando 0,3 mmol de glicina-resina de Wang, se sintetizó la secuencia indicada utilizando aminoácidos protegidos con Fmoc y HATU como agente de activación. En la última etapa de acoplamiento se utilizó ácido azidoacético para proteger el pentapéptido. La escisión del péptido se consiguió utilizando TFA/DCM al 50% durante 2 horas. 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 a 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 (suspensión) 2900, 2100, 1450, 1350 cm⁻¹. ESIMS 555,3 ([M+H], 100%). ESIMS con fragmentación en la fuente de iones: 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%).

10

15

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

Se disolvió el péptido (32 mg, 0,058 mmol) en MeCN (60 ml). Se añadieron diisopropiltilamina (1 ml) y Cu (MeCN)₄PF₆ (1 mg) y se agitó la solución durante 2 horas. Se evaporó el disolvente y se sometió el producto bruto a RP HPLC para eliminar los dímeros y los trímeros. Se aisló el monómero cíclico 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 en la fuente de iones: 555,3 ([M+H], 100%), 480,4 ([M-Gly], 30%), 452,2 ([M-Gly-CO], 25%), 424,5 ([M-Gly-2CO], 10%, sólo es posible en una estructura cíclica).

20

Conjugación del péptido lineal al ADN:

Se disolvió el Compuesto 2 (45 nmol) en 45 µl de tampón borato sódico (pH 9,4; 150 mM). A 4°C, se añadió el péptido lineal (18 µl de una reserva 100 mM en DMF; 180 nmol; 40 equivalentes), seguido de DMT-MM (3,6 ml de una reserva 500 mM en agua; 180 nmol; 40 equivalentes). Después de agitar durante 2 horas, la LCMS mostró la completa reacción, y se aisló el producto 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%).

25

30 Conjugación del péptido cíclico al ADN:

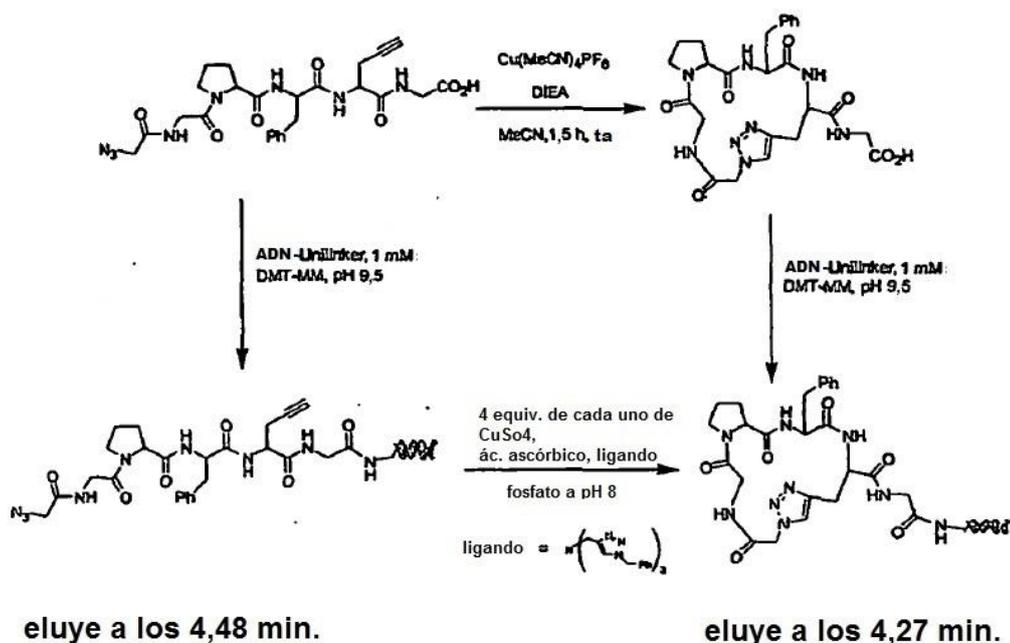
Se disolvió el Compuesto 2 (20 nmol) en 20 µl de tampón borato sódico (pH 9,4, 150 mM). A 4°C, se añadió péptido lineal (8 µl de una reserva 100 mM en DMF; 80 nmol; 40 equivalentes), seguido de DMT-MM (1,6 µl de una reserva 500 mM en agua; 80 nmol; 40 equivalentes). Después de agitar durante 2 horas, la LCMS mostró la reacción completa, y se aisló el producto por precipitación con etanol. ESIMS 1823,0 ([M-3H]/3, 20%), 1367,2 ([M-4H]/4, 200%), 1093,7 ([M-5H]/5, 40%), 911,4 ([M-6H]/6, 100%).

35

Ciclación del péptido unido a ADN:

Se disolvió el conjugado de péptido lineal-ADN (10 nmol) en tampón fosfato sódico de pH 8 (10 µl, 150 mM). A temperatura ambiente, se añadieron 4 equivalentes de cada uno de CuSO₄, ácido ascórbico, y el ligando Sharpless (0,2 µl de las reservas 200 mM). Se dejó que la reacción continuase durante toda la noche. La RP HPLC mostró que no había péptido lineal-ADN presente, y que el producto co-eluía con el péptido-ADN cíclico auténtico. No se observaron trazas de dímeros o de otros oligómeros.

40



**Condiciones LC: Placa C18, 2,1 x 40 mm, 10%-40%
MeCn en TEAA ac. 40mM durante 8 min.**

Ejemplo 6: Aplicación de reacciones de sustitución aromáticas nucleófilas a la síntesis del resto funcional

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

- 5 Se disuelve el Compuesto 2 en tampón borato sódico de pH 9,4 a una concentración de 1 mM. Se enfría la solución a 4°C y a continuación se añaden 20 equivalentes de cloruro cianúrico como una solución 500 mM en MeCN. Al cabo de 2 horas, se confirma la reacción completa mediante LCMS y se aísla el conjugado de diclorotriazina-ADN resultante por precipitación con etanol.

Procedimiento para la sustitución amina del diclorotriazina-ADN:

- 10 Se disuelve el conjugado de diclorotriazina-ADN en tampón borato de pH 9,5 a una concentración de 1 mM. A temperatura ambiente, se añaden 40 equivalentes de una amina alifática como una solución de DMF. Se hace seguimiento de la reacción mediante LCMS y está terminada al cabo de 2 horas. El conjugado de alquilamino-monoclorotriazina-ADN resultante se aísla por precipitación con etanol.

Procedimiento para la sustitución amina del monoclorotriazina-ADN:

- 15 Se disuelve el conjugado alquilamino-monoclorotriazina-ADN en tampón borato de pH 9,5 a una concentración de 1 mM. A 42°C, se añaden 40 equivalentes de una segunda amina alifática como una solución en DMF. Se hace seguimiento de la reacción mediante LCMS y está terminada al cabo de 2 horas. El conjugado de diaminotriazina-ADN resultante se aísla por precipitación con etanol.

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

- 20 Procedimiento general para la aminación reductora del ADN-conector que contiene una amina secundaria con un componente básico aldehído:

- 25 Se acopló el Compuesto 2 a un resto de prolina N-terminal. Se disolvió el compuesto resultante en tampón fosfato sódico (50 µl, 150 mM, pH 5,5) a una concentración de 1 mM. A esta solución se añadieron 40 equivalentes de cada uno de un componente básico aldehído en DMF (8 µl, 0,25 M) y cianoborohidruro sódico en DMF (8 µl, 0,25 M) y se calentó la solución a 80°C durante 2 horas. Tras la alquilación, se purificó la solución por precipitación con etanol.

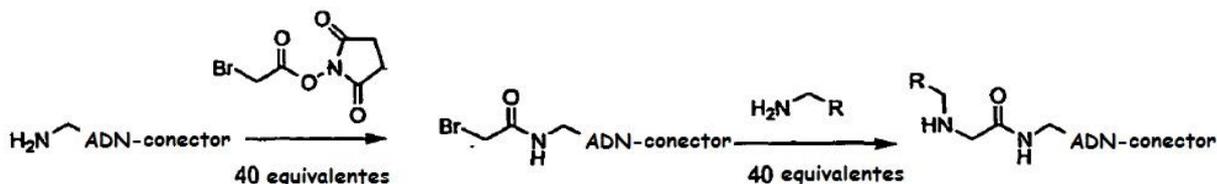
Procedimiento general para las aminaciones reductoras del ADN-conector que contiene un aldehído con componentes básicos amina:

Se disolvió el Compuesto 2 acoplado a un componente básico que comprende un grupo aldehído en tampón fosfato sódico (50 μ l, 250 mM, pH 5,5) a una concentración de 1 mM. A esta solución se añadieron 40 equivalentes de cada uno de un componente básico amina en DMF (8 μ l, 0,25 M) y cianoborohidruro sódico en DMF (8 μ l, 0,25 M) y se calentó la solución a 80°C durante 2 horas. Tras la alquilación, se purificó la solución por precipitación con etanol.

5

Ejemplo 8: Aplicación de reacciones de construcción de peptoides a la síntesis del resto funcional

Procedimiento general para la síntesis de peptoides en el ADN conector:



Se disolvió el Compuesto 2 en tampón borato sódico (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-hidroxisuccinimidilo en DMF (13 μ l, 0,15 M) y se agitó la solución suavemente a 4°C durante 2 horas. Tras la acilación, se purificó el ADN-conector por precipitación con etanol y se volvió a disolver en tampón borato sódico (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 componente básico amina en DMF (13 μ l, 0,15 M) y se agitó la solución suavemente a 4°C durante 16 horas. Tras la alquilación, se purificó el ADN-conector por precipitación con etanol y se volvió a disolver en tampón borato sódico (50 μ l, 150 mM, pH 9,4) a una concentración de 1 mM y se enfrió a 4°C. La síntesis de peptoides se continúa por adición progresiva de bromoacetato de N-hidroxisuccinimidilo seguida de adición de un componente básico amina.

10

15

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

Procedimiento general

Se disuelve un conjugado de ADN que contiene alquino en tampón fosfato de pH 8,0 a una concentración de aproximadamente 1 mM. A esta mezcla se añaden 10 equivalentes de una azida orgánica y 5 equivalentes de cada uno de sulfato de cobre (II), ácido ascórbico, y el ligando (tris-((1-benzyltriazol-4-il)metil)amina, todos a temperatura ambiente. Se hace seguimiento de la reacción mediante LCMS, y habitualmente está terminada al cabo de 1-2 horas. El conjugado de triazol-ADN resultante puede aislarse por precipitación con etanol.

25

Ejemplo 10: Identificación de un ligando para la Abl quinasa en el seno de una biblioteca codificada.

La capacidad de enriquecer las moléculas de interés en una biblioteca codificada por ADN por encima de los miembros no deseables de la biblioteca es primordial para la identificación de compuestos individuales con propiedades definidas contra las dianas terapéuticas 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), incorporado en el presente documento por referencia) para la rhAbl quinasa (GenBank U07563). Se fijó este compuesto a un oligonucleótido de ADN bicatenario por medio del conector descrito en los ejemplos anteriores utilizando métodos de química convencional para producir una molécula similar (resto funcional unido a un oligonucleótido) a las producidas por medio de los métodos descritos en los Ejemplos 1 y 2. Se diseñaron una biblioteca producida en general como se ha descrito en el Ejemplo 2 y el ligante Abl quinasa unida a ADN con secuencias de ADN únicas que permitieron el análisis por qPCR de ambas especies. Se mezcló el ligante Abl quinasa unida a ADN con la biblioteca en una relación de 1:1.000. De esta manera se equilibró la mezcla con la quinasa rhAbl, y se capturó la enzima en una fase sólida, se lavó para separar los miembros de la biblioteca sin capacidad de unión y se eluyeron las moléculas de unión. La relación entre las moléculas de la biblioteca y el inhibidor de la Abl quinasa unida a ADN en el eluato fue de 1:1, lo que indica un enriquecimiento más de 500 veces superior del ligante Abl quinasa unida a ADN en una cantidad 1.000 veces superior de moléculas de la biblioteca.

30

35

40

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Praecis Pharmaceuticals, Inc.

<120> MÉTODOS PARA LA SÍNTESIS DE BIBLIOTECAS CODIFICADAS

45 <130> PPI-156CPPC

<150> 11/015458

- <151> 2004-12-17
<150> 60/530854
<151> 2003-12-17
<150> 60/540681
- 5 <151> 2004-01-30
<150> 60/553715
<151> 2004-03-15
<150> 60/588672
<151> 2004-07-16
- 10 <150> 60/689466
<151> 2005-06-09
<150> 60/731041
<151> 2005-10-28
<160> 890
- 15 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
<210> 1
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
<223> constructo sintético
<400> 1
gcaacgaag 9
<210> 2
- 25 <211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
- 30 <400> 2
tcgttgcca 9
<210> 3
<211> 9
<212> ADN
- 35 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético

<400> 3
 gcgtacaag 9
 <210> 4
 <211> 9
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 4
 10 tgtacgcca 9
 <210> 5
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 5
 gctctgtag 9
 <210> 6
 20 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 25 <400> 6
 acagagcca 9
 <210> 7
 <211> 9
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 7
 gtgcatag 9
 35 <210> 8
 <211> 9
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 8
 5 atggcacca 9
 <210> 9
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 9
 gttgaccag 9
 <210> 10
 15 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 10
 ggtaacca 9
 <210> 11
 <211> 9
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 11
 cgactgac 9
 30 <210> 12
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> constructo sintético
 <400> 12
 acgctgaac 9

<210> 13
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5 <220>
<223> constructo sintético
<400> 13
cgtagtcag 9
<210> 14
10 <211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
15 <400> 14
gactacgca 9
<210> 15
<211> 9
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 15
ccagcatag 9
25 <210> 16
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
30 <223> constructo sintético
<400> 16
atgctggca 9
<210> 17
<211> 9
35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

<223> constructo sintético
 <400> 17
 cctacagag 9
 <210> 18
 5 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 18
 ctgtaggca 9
 <210> 19
 <211> 9
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 19
 ctgaacgag 9
 20 <210> 20
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> constructo sintético
 <400> 20
 acgacttg 9
 <210> 21
 <211> 9
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 21
 35 ctccagtag 9
 <210> 22
 <211> 9

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 22 9
 actggagca 9
 <210> 23
 <211> 9
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 23
 taggtccag 9
 15 <210> 24
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 24
 ggacctaca 9
 <210> 25
 <211> 9
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 25
 30 gcgtgtgt 9
 <210> 26
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 26

aacacgcct 9
 <210> 27
 <211> 9
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 27
 gcttgagat 9
 10 <210> 28
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> constructo sintético
 <400> 28
 tccaagcct 9
 <210> 29
 <211> 9
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 29
 25 gtcaagcgt 9
 <210> 30
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 30
 gcttgacct 9
 <210> 31
 35 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 31
 caagagcgt 9
 5 <210> 32
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 32
 gctcttgct 9
 <210> 33
 <211> 9
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 33
 20 cagttcgg 9
 <210> 34
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 34
 cgaactgct 9
 <210> 35
 30 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 35
 cgaaggagt 9
 <210> 36

<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
5 <223> constructo sintético
<400> 36
tccttcgct 9
<210> 37
<211> 9
10 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 37
15 cggtgtgt 9
<210> 38
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
20 <220>
<223> constructo sintético
<400> 38
aacaccgct 9
<210> 39
25 <211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
30 <400>
cggtgctgt 9
<210> 40
<211> 9
<212> ADN
35 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético

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

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 45
 5 tgagtcggt 9
 <210> 46
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 46
 ggactcact 9
 <210> 47
 15 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 47
 tgctacggt 9
 <210> 48
 <211> 9
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 48
 cgtagact 9
 30 <210> 49
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> constructo sintético
 <400> 49
 gtgcggtga 9

<210> 50
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5 <220>
<223> constructo sintético
<400> 50
aacgcacac 9
<210> 51
10 <211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
15 <400> 51
gttggcaga 9
<210> 52
<211> 9
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 52
tgccaacac 9
25 <210> 53
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
30 <223> constructo sintético
<400> 53
cctgtagga 9
<210> 54
<211> 9
35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

- <223> constructo sintético
 <400> 54
 ctacaggac 9
 <210> 55
- 5 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
- 10 <400> 55
 ctgcgtaga 9
 <210> 56
 <211> 9
 <212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 56
 tacgcagac 9
- 20 <210> 57
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 25 <223> constructo sintético
 <400> 57
 cttacgcga 9
 <210> 58
 <211> 9
- 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 58
- 35 gcgtaagac 9
 <210> 59
 <211> 9

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 59
 tggtcacga 9
 <210> 60
 <211> 9
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 60
 gtgaccaac 9
 15 <210> 61
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 61
 tcagagcga 9
 <210> 62
 <211> 9
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 62
 30 gctctgaac 9
 <210> 63
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 63

ttgctcgga 9
 <210> 64
 <211> 9
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 64
 cgagcaaac 9
 10 <210> 65
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> constructo sintético
 <400> 65
 gcagttgga 9
 <210> 66
 <211> 9
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 66
 25 caactgcac 9
 <210> 67
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 67
 gcctgaaga 9
 <210> 68
 35 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 68
 ttcaggcac 9
 5 <210> 69
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 69
 gtagccaga 9
 <210> 70
 <211> 9
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 70
 20 tggctacac 9
 <210> 71
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 71
 gtcgcttga 9
 <210> 72
 30 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 72
 aagcgacac 9
 <210> 73

<211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> constructo sintético
 <400> 73
 gcctaagtt 9
 <210> 74
 <211> 9
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 74
 15 cttaggctc 9
 <210> 75
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 75
 gtagtgctt 9
 <210> 76
 25 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 76
 gcactactc 9
 <210> 77
 <211> 9
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 77
 gtcgaagtt 9
 <210> 78
 <211> 9
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 78
 10 cttcgactc 9
 <210> 79
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 79
 gtttcggtt 9
 <210> 80
 20 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 25 <400> 80
 ccgaaactc 9
 <210> 81
 <211> 9
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 81
 cagcgtttt 9
 35 <210> 82
 <211> 9
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 82
5 aacgctgtc 9
<210> 83
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
10 <220>
<223> constructo sintético
<400> 83
catacgctt 9
<210> 84
15 <211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
20 <400> 84
gcgtatgtc 9
<210> 85
<211> 9
<212> ADN
25 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 85
cgatctggt 9
30 <210> 86
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
35 <223> constructo sintético
<400> 86
cagatcgtc 9

<210> 87
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 87
 cgctttgtt 9
 <210> 88
 10 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 15 <400> 88
 caaagcgtc 9
 <210> 89
 <211> 9
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 89
 ccacagttt 9
 25 <210> 90
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> constructo sintético
 <400> 90
 actgtggtc 9
 <210> 91
 <211> 9
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> constructo sintético
 <400> 91
 cctgaagtt 9
 <210> 92
 5 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 92
 cttcaggtc 9
 <210> 93
 <211> 9
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 93
 ctgacgatt 9
 20 <210> 94
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> constructo sintético
 <400> 94
 tcgtcagtc 9
 <210> 95
 <211> 9
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 95
 35 ctccacttt 9
 <210> 96
 <211> 9

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 96
 agtggagtc 9
 <210> 97
 <211> 9
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 97
 accagagcc 9
 15 <210> 98
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 98
 ctctggtaa 9
 <210> 99
 <211> 9
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 99
 30 atccgcacc 9
 <210> 100
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 100

tgcggataa 9
 <210> 101
 <211> 9
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 101
 gacgacacc 9
 10 <210> 102
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> constructo sintético
 <400> 102
 tgtcgtcaa 9
 <210> 103
 <211> 9
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 103
 25 ggatggacc 9
 <210> 104
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 104
 tccatccaa 9
 <210> 105
 35 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 105
 gcagaagcc 9
 5 <210> 106
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 106
 ctctgcaa 9
 <210> 107
 <211> 9
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 107
 20 gccatgtcc 9
 <210> 108
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 108
 acatggcaa 9
 <210> 109
 30 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 109
 gtctgctcc 9
 <210> 110

<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
5 <223> constructo sintético
<400> 110
agcagacaa 9
<210> 111
<211> 9
10 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 111
15 cgacagacc 9
<210> 112
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
20 <220>
<223> constructo sintético
<400> 112
tctgtcgaa 9
<210> 113
25 <211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
30 <400> 113
cgctactcc 9
<210> 114
<211> 9
<212> ADN
35 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético

<400> 114
 agtagcgaa 9
 <210> 115
 <211> 9
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 115
 10 ccacagacc 9
 <210> 116
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 116
 tctgtggaa 9
 <210> 117
 20 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 25 <400> 117
 cctctctcc 9
 <210> 118
 <211> 9
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 118
 agagaggaa 9
 35 <210> 119
 <211> 9
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 119
 5 ctcgtagcc 9
 <210> 120
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 120
 ctacgagaa 9
 <210> 121
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 121.
 aaatcgatgt ggcactcag 20
 <210> 122
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 122
 gagtgaccac atcgattgg 20
 30 <210> 123
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> constructo sintético
 <400> 123
 aaatcgatgt ggactaggag 20

- <210> 124
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 124
 cctagtccac atcgattgg 20
 <210> 125
- 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
- 15 <400> 125
 aaatcgatgt gccgatgag 20
 <210> 126 6
 <211> 20
 <212> ADN
- 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 126
 catacggcac atcgattgg 20
- 25 <210> 127
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 30 <223> constructo sintético
 <400> 127
 aaatcgatgt gctgaaggag 20
 <210> 128
 <211> 20
- 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> constructo sintético
 <400> 128
 ccttcagcac atcgattgg 20
 <210> 129
 5 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 129
 aaatcgatgt ggactagcag 20
 <210> 130
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 130
 gctagtccac atcgattgg 20
 20 <210> 131
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> constructo sintético
 <400> 131
 aaatcgatgt gcgctaagag 20
 <210> 132
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 132
 35 ctagcgcac atcgattgg 20
 <210> 133
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 133
 aaatcgatgt gagccgagag 20
 <210> 134
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 134
 ctcggctcac atcgattgg 20
 15 <210> 135
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 135
 aaatcgatgt gccgtatcag 20
 <210> 136
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 136
 30 gatacggcac atcgattgg 20
 <210> 137
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 137

aaatcgatgt gctgaagcag 20
 <210> 138
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 138
 gcttcagcac atcgattgg 20
 10 <210> 139
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> constructo sintético
 <400> 139
 aaatcgatgt gtcgagtag 20
 <210> 140
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 140
 25 actcgcacac atcgattgg 20
 <210> 141
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 141
 aaatcgatgt gttggcgag 20
 <210> 142
 35 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 142
 cgccaaacac atcgattgg 20
 5 <210> 143
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 143
 aaatcgatgt gcgctaacag 20
 <210> 144
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 144
 20 gttagcgcac atcgattgg 20
 <210> 145
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 145
 aaatcgatgt gagccgacag 20
 <210> 146
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 146
 gtcggctcac atcgattgg 20
 <210> 147

<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
5 <223> constructo sintético
<400> 147
aaatcgatgt gagccgaaag 20
<210> 148
<211> 20
10 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 148
15 ttcggtcac atcgattgg 20
<210> 149
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
20 <220>
<223> constructo sintético
<400> 149
aaatcgatgt gtcgtagag 20
<210> 150
25 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
30 <400> 150
ctaccgacac atcgattgg 20
<210> 151
<211> 20
<212> ADN
35 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético

<400> 151
 aaatcgatgt ggtgcccag 20
 <210> 152
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 152
 10 cggcaaccac atcgattgg 20
 <210> 153
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 153
 aaatcgatgt gagtgcgtag 20
 <210> 154
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 25 <400> 154
 acgcactcac atcgattgg 20
 <210> 155
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 155
 aaatcgatgt ggtgccaag 20
 35 <210> 156
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 156
 5 tggcaaccac atcgattgg 20
 <210> 157
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 157
 aaatcgatgt gtgcgaggag 20
 <210> 158
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 158
 cctcgcacac atcgattgg 20
 <210> 159
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 159
 aaatcgatgt ggaacacgag 20
 30 <210> 160
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> constructo sintético
 <400> 160
 cgtgtccac atcgattgg 20

<210> 161
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5 <220>
<223> constructo sintético
<400> 161
aaatcgatgt gcttgcgag 20
<210> 162
10 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
15 <400> 162
cgacaagcac atcgattgg 20
<210> 163
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 163
aaatcgatgt gttccgtag 20
25 <210> 164
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
30 <223> constructo sintético
<400> 164
accggaacac atcgattgg 20
<210> 165
<211> 20
35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

<223> constructo sintético
 <400> 165
 aaatcgatgt gtgcgagcag 20
 <210> 166
 5 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 166
 gctcgcacac atcgatttg 20
 <210> 167
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 167
 aaatcgatgt ggtagcag 20
 20 <210> 168
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> constructo sintético
 <400> 168
 acctgaccac atcgatttg 20
 <210> 169
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 169
 35 aaatcgatgt ggctgttag 20
 <210> 170
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 170
 aacaggccac atcgattgg 20
 <210> 171
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 171
 aaatcgatgt ggaacaccag 20
 15 <210> 172
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 172
 ggtgtccac atcgattgg 20
 <210> 173
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 173
 30 aaatcgatgt gctgtccag 20
 <210> 174
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 174

ggacaagcac atcgattgg 20
 <210> 175
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 175
 aaatcgatgt gtgcgaguag 20
 10 <210> 176
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> constructo sintético
 <400> 176
 tctcgcacac atcgattgg 20
 <210> 177
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 177
 25 aaatcgatgt gagtgcggag 20
 <210> 178
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 178
 ccgcactcac atcgattgg 20
 <210> 179
 35 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 179
 aaatcgatgt gttgtccgag 20
 5 <210> 180
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 180
 cggacaacac atcgatttg 20
 <210> 181
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 181
 20 aaatcgatgt gtggaacgag 20
 <210> 182
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 182
 cgtccacac atcgatttg 20
 <210> 183
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 183
 aaatcgatgt gagtgcaag 20
 <210> 184

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> constructo sintético
 <400> 184
 tcgcactcac atcgattgg 20
 <210> 185
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 185
 15 aaatcgatgt gtggaaccag 20
 <210> 186
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 186
 ggtccacac atcgattgg 20
 <210> 187
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 187
 aaatcgatgt gttaggcgag 20
 <210> 188
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 188
 cgctaacac atcgattgg 20
 <210> 189
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 189
 10 aaatcgatgt ggcctgtgag 20
 <210> 190
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 190
 cacagccac atcgattgg 20
 <210> 191
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 25 <400> 191
 aaatcgatgt gtcctgtag 20
 <210> 192
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 192
 acaggagcac atcgattgg 20
 35 <210> 193
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 193
 5 aaatcgatgt ggtcaggcag 20
 <210> 194
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 194
 gcctgaccac atcgattgg 20
 <210> 195
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 195
 aaatcgatgt ggtcaggaag 20
 <210> 196
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 196
 tcctgaccac atcgattgg 20
 30 <210> 197
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> constructo sintético
 <400> 197
 aaatcgatgt ggtagccgag 20

- <210> 198
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 198
 cggctaccac atcgatttg 20
 <210> 199
- 10 <211> 20
 <212> ADN.
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
- 15 <400> 199
 aaatcgatgt ggcctgtaag 20
 <210> 200
 <211> 20
 <212> ADN
- 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 200
 tacaggccac atcgatttg 20
- 25 <210> 201
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 30 <223> constructo sintético
 <400> 201
 aaatcgatgt gcttccggag 20
 <210> 202
 <211> 20
- 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> constructo sintético
 <400> 202
 ccgaaagcac atcgattgg 20
 <210> 203
 5 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 203
 aaatcgatgt gcgtaaggag 20
 <210> 204
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 204
 ccttacgcac atcgattgg 20
 20 <210> 205
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> constructo sintético
 <400> 205
 aaatcgatgt gagagcgtag 20
 <210> 206
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 206
 35 acgctctcac atcgattgg 20
 <210> 207
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 207
 aaatcgatgt ggacggcaag 20
 <210> 208
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 208
 tgccgtccac atcgattgg 20
 15 <210> 209
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 209
 aaatcgatgt gcttgcgag 20
 <210> 210
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 210
 30 gcgaaagcac atcgattgg 20
 <210> 211
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 211

aaatcgatgt gcgtaagcag 20
 <210> 212
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 212
 gcttacgcac atcgattgg 20
 10 <210> 213
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> constructo sintético
 <400> 213
 aaatcgatgt ggctatggag 20
 <210> 214
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 214
 25 ccatagccac atcgattgg 20
 <210> 215
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 215
 aaatcgatgt gactctggag 20
 <210> 216
 35 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 216
 ccagagtcac atcgattgg 20
 5 <210> 217
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 217
 aaatcgatgt gctggaaag 19
 <210> 218
 <211> 19
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 218
 20 ttccagcaca tcgattgg 19
 <210> 219
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 219
 aaatcgatgt gccgaagtag 20
 <210> 220
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 220
 acttcggcac atcgattgg 20
 <210> 221

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> constructo sintético
 <400> 221
 aaatcgatgt gctcctgaag 20
 <210> 222
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 222
 15 tcaggagcac atcgatttgg 20
 <210> 223
 <211> 20
 <212> ADN.
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 223
 aaatcgatgt gtccagtcag 20
 <210> 224
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 224
 gactggacac atcgatttgg 20
 <210> 225
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 225
aaatcgatgt gagagcggag 20
<210> 226
<211> 20
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 226
10 ccgctctcac atcgattgg 20
<210> 227
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
15 <220>
<223> constructo sintético
<400> 227
aaatcgatgt gagagcgaag 20
<210> 228
20 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
25 <400> 228
tcgctctcac atcgattgg 20
<210> 229
<211> 20
<212> ADN
30 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 229
aaatcgatgt gccgaaggag 20
35 <210> 230
<211> 20
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 230
 5 ccttcggcac atcgattgg 20
 <210> 231
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 231
 aaatcgatgt gccgaagcag 20
 <210> 232
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 232
 gcttcggcac atcgattgg 20
 <210> 233
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 233
 aaatcgatgt gtgtccgag 20
 30 <210> 234
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> constructo sintético
 <400> 234
 cggaacacac atcgattgg 20

<210> 235
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 235
 aaatcgatgt gtctggcgag 20
 <210> 236
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 15 <400> 236
 cgccagacac atcgattgg 20
 <210> 237
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 237
 aaatcgatgt gctatcgag 20
 25 <210> 238
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> constructo sintético
 <400> 238
 ccgatagcac atcgattgg 20
 <210> 239
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> constructo sintético
 <400> 239
 aaatcgatgt gcgaaaggag 20
 <210> 240
 5 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 240
 ccttcgcac atcgattgg 20
 <210> 241
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 241
 aaatcgatgt gccgaagaag 20
 20 <210> 242
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> constructo sintético
 <400> 242
 tcttcgcac atcgattgg 20
 <210> 243
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 243
 35 aaatcgatgt gggtgcagag 20
 <210> 244
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 244
 ctgcaaccac atcgattgg 20
 <210> 245
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 245
 aaatcgatgt ggatggtgag 20
 15 <210> 246
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 246
 caccatccac atcgattgg 20
 <210> 247
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 247
 30 aaatcgatgt gctatcgag 20
 <210> 248
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> synthetic.construct
 <400> 248

gcgatagcac atcgattgg 20
 <210> 249
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 249
 aaatcgatgt gcgaaagcag 20
 10 <210> 250
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> constructo sintético
 <400> 250
 gctttcgcac atcgattgg 20
 <210> 251
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 251
 25 aaatcgatgt gacactggag 20
 <210> 252
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 252
 ccaggtcac atcgattgg 20
 <210> 253
 35 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 253
 aaatcgatgt gtctggcaag 20
 5 <210> 254
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 254
 tgccagacac atcgatttg 20
 <210> 255
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 255
 20 aaatcgatgt ggatggcag 20
 <210> 256
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 256
 gaccatccac atcgatttg 20
 <210> 257
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 257
 aaatcgatgt ggtgcacag 20
 <210> 258

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> constructo sintético
 <400> 258
 tgcaaccac atcgattgg 20
 <210> 259
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 259
 15 aaatcgatgt gggcatcgag 20
 <210> 260
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 260
 cgatgccccca tccgattgg 20
 <210> 261
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 261
 aaatcgatgt gtgcctccag 20
 <210> 262
 <211> 20
 <212> ADN.
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 262
 ggaggcacac atcgattgg 20
 <210> 263
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 263
 10 aaatcgatgt gtcctcaag 20
 <210> 264
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 264
 tgaggcacac atcgattgg 20
 <210> 265
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 25 <400> 265
 aaatcgatgt gggcatccag 20
 <210> 266
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 266
 ggatgccac atcgattgg 20
 35 <210> 267
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 267
 5 aaatcgatgt gggcatcaag 20
 <210> 268
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 268
 tgatgccac atcgattgg 20
 <210> 269
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 269
 aaatcgatgt gcctgtcgag 20
 <210> 270
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 270
 cgacaggcac atcgattgg 20
 30 <210> 271
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> constructo sintético
 <400> 271
 aaatcgatgt ggacggatag 20

<210> 272
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 272
 atccgtccac atcgattgg 20
 <210> 273
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 15 <400> 273
 aaatcgatgt gcctgtccag 20
 <210> 274
 <211> 20.
 <212> ADN..
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 274
 ggacaggcac atcgattgg 20
 25 <210> 275
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> constructo sintético
 <400> 275
 aaatcgatgt gaagcacgag 20
 <210> 276
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> constructo sintético
 <400> 276
 cgtgcttcac atcgattgg 20
 <210> 277
 5 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 277
 aaatcgatgt gcctgtcaag 20
 <210> 278
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 278
 tgacaggcac atcgattgg 20
 20 <210> 279
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> constructo sintético
 <400> 279
 aaatcgatgt gaagcaccag 20
 <210> 280
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 280
 35 ggtgcttcac atcgattgg 20
 <210> 281
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 281
 aaatcgatgt gccttcgtag 20
 <210> 282
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 282
 acgaaggcac atcgattgg 20
 15 <210> 283
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 283
 aaatcgatgt gtcgtccgag 20
 <210> 284
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 284
 30 cggacgacac atcgattgg 20
 <210> 285
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 285

aaatcgatgt ggagtctgag 20
 <210> 286
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 286
 cagactccac atcgattgg 20
 10 <210> 287
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> constructo sintético
 <400> 287
 aaatcgatgt gtgatccgag 20
 <210> 288
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 288
 25 cggatcacac atcgattgg 20
 <210> 289
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 289
 aaatcgatgt gtcaggcgag 20
 <210> 290
 35 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 290
 cgctgacac atcgattgg 20
 5 <210> 291
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 291
 aaatcgatgt gtcgtccaag 20
 <210> 292
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 292
 20 tggacgacac atcgattgg 20
 <210> 293
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 293
 aaatcgatgt ggacggagag 20
 <210> 294
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 294
 ctccgtccac atcgattgg 20
 <210> 295

- <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 5 <223> constructo sintético
 <400> 295
 aaatcgatgt ggtagcagag 20
 <210> 296
 <211> 20
- 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 296
- 15 ctgctaccac atcgattgg 20
 <210> 297
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 297
 aaatcgatgt ggctgtgtag 20
 <210> 298
- 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
- 30 <400> 298
 acacagccac atcgattgg 20
 <210> 299
 <211> 20
 <212> ADN
- 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 299
aaatcgatgt ggacggacag 20
<210> 300
<211> 20
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 300
10 gtccgtccac atcgattgg 20
<210> 301
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
15 <220>
<223> constructo sintético
<400> 301
aaatcgatgt gtcaggcaag 20
<210> 302
20 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
25 <400> 302
tgctgacac atcgattgg 20
<210> 303
<211> 20
<212> ADN
30 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 303
aaatcgatgt ggctcgaaag 20
35 <210> 304
<211> 20
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 304
 5 ttcgagccac atcgattgg 20
 <210> 305
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 305
 aaatcgatgt gcctcggag 20
 <210> 306
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 306
 ccgaaggcac atcgattgg 20
 <210> 307
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 307
 aaatcgatgt gtagcacag 20
 30 <210> 308
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> constructo sintético
 <400> 308
 gtgctaccac atcgattgg 20

<210> 309
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 309
 aaatcgatgt ggaaggtcag 20
 <210> 310
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 15 <400> 310
 gacctccac atcgattgg 20
 <210> 311
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 311
 aaatcgatgt ggtgctgtag 20
 25 <210> 312
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> constructo sintético
 <400> 312
 acagcaccac atcgattgg 20
 <210> 313
 <211> 9
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> constructo sintético
 <400> 313
 gttgcctgt 9
 <210> 314
 5 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 314
 aggcaacct 9
 <210> 315
 <211> 9
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 315
 caggacggt 9
 20 <210> 316
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> constructo sintético
 <400> 316
 cgtcctgct 9
 <210> 317
 <211> 9
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 317
 35 agacgtggt 9
 <210> 318
 <211> 9

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 318
 cacgtctct 9
 <210> 319
 <211> 9
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 319
 caggaccgt 9
 15 <210> 320
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 320
 ggtcctgct 9
 <210> 321
 <211> 9
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 321
 30 caggacagt 9
 <210> 322
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 322

- tgtcctgct 9
 <210> 323
 <211> 9
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 323
 cactctggt 9
 10 <210> 324
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> constructo sintético
 <400> 324
 cagagtgct 9
 <210> 325
 <211> 9
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 325
 25 gacggctgt 9
 <210> 326
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 326
 agccgtcct 9
 <210> 327
 35 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 327
 cactctcgt 9
 5 <210> 328:
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 328
 gagagtgct 9
 <210> 329
 <211> 9
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 329
 20 gtagcctgt 9
 <210> 330
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 330
 aggctacct 9
 <210> 331
 30 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 331
 gccacttgt 9
 <210> 332

<211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> constructo sintético
 <400> 332
 aagtggcct 9
 <210> 333
 <211> 9
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 333
 15 catcgctgt 9
 <210> 334
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 334
 agcgatgct 9
 <210> 335
 25 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 335
 cactggtgt 9
 <210> 336
 <211> 9
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 336
 accagtgct 9
 <210> 337
 <211> 9
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 337
 10 gccactggt 9
 <210> 338
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 338
 cagtggcct 9
 <210> 339
 20 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 25 <400> 339
 tctggctgt 9
 <210> 340
 <211> 9
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 340
 agccagact 9
 35 <210> 341
 <211> 9
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 341
 5 gccactcgt 9
 <210> 342
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 342
 gagtggcct 9
 <210> 343
 15 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 343
 tgccctcgt 9
 <210> 344
 <211> 9
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 344
 agaggcact 9
 30 <210> 345
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> constructo sintético
 <400> 345
 catcgcagt 9

<210> 346
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 346
 tgcgatgct 9
 <210> 347
 10 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 15 <400> 347
 caggaaggt 9
 <210> 348
 <211> 9
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 348
 ctctctgct 9
 25 <210> 349
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> constructo sintético
 <400> 349
 ggcatctgt 9
 <210> 350
 <211> 9
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> constructo sintético
 <400> 350
 agatgcct 9
 <210> 351
 5 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 351
 cggtgctgt 9
 <210> 352
 <211> 9
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 352
 agcaccgct 9
 20 <210> 353
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> constructo sintético
 <400> 353
 cactggcgt 9
 <210> 354
 <211> 9
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 354
 35 gccagtgt 9
 <210> 355
 <211> 9

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 355
 tctcctcgt 9
 <210> 356
 <211> 9
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 356
 gaggagact 9
 15 <210> 357
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 357
 cctgtctgt 9
 <210> 358
 <211> 9
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 358
 30 agacaggct 9
 <210> 359
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 359

caacgctgt 9
 <210> 360
 <211> 9
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 360
 agcgttgct 9
 10 <210> 361
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> constructo sintético
 <400> 361
 tgcctcggg 9
 <210> 362
 <211> 9
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 362
 25 cgaggcact 9
 <210> 363
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 363
 aactgcgt 9
 <210> 364
 35 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 364
 gcagtgct 9
 5 <210> 365
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 365
 tcgtcctgt 9
 <210> 366
 <211> 9
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 366
 20 aggacgact 9
 <210> 367
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 367
 gctgccagt 9
 <210> 368
 30 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 368
 tggcagcct 9
 <210> 369

<211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> constructo sintético
 <400> 369
 tcaggctgt 9
 <210> 370
 <211> 9
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 370
 15 agcctgact 9
 <210> 371
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 371
 gccaggtgt 9
 <210> 372
 25 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 372
 acctggcct 9
 <210> 373
 <211> 9
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 373
cggacctgt 9
<210> 374
<211> 9
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 374
10 aggtccgct 9
<210> 375
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
15 <220>
<223> constructo sintético
<400> 375
caacgcagt 9
<210> 376
20 <211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
25 <400> 376
tgcggtgct 9
<210> 377
<211> 9
<212> ADN
30 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 377
cacacgagt 9
35 <210> 378
<211> 9
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 378
5 tcgtgtgct 9
<210> 379
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
10 <220>
<223> constructo sintético
<400> 379
atggcctgt 9
<210> 380
15 <211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
20 <400> 380
aggccatct 9
<210> 381
<211> 9
<212> ADN
25 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 381
ccagtctgt 9
30 <210> 382
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
35 <223> constructo sintético
<400> 382
agactggct 9

<210> 383
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 383
 gccaggagt 9
 <210> 384
 10 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 15 <400> 384
 tcctggcct 9
 <210> 385
 <211> 9
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 385
 cggaccagt 9
 25 <210> 386
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> constructo sintético
 <400> 386
 tggtcgct 9
 <210> 387
 <211> 9
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> constructo sintético
 <400> 387
 ccttcgct 9
 <210> 388
 5 <211> 9
 <272> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 388
 gcgaaggct 9
 <210> 389
 <211> 9
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 389
 gcagccagt 9
 20 <210> 390
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> constructo sintético
 <400> 390
 tggctgcct 9
 <210> 391
 <211> 9
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 391
 35 ccagtcggt 9
 <210> 392
 <211> 9

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 392
 cgactggct 9
 <210> 393
 <211> 9
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 393
 actgagcgt 9
 15 <210> 394
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 394
 gctcagtct 9
 <210> 395
 <211> 9
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 395
 30 ccagtccgt 9
 <210> 396
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 396

- ggactggct 9
 <210> 397
 <211> 9
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 397
- ccagtcagt 9
 10 <210> 398
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> constructo sintético
 <400> 398
- tgactggct 9
 <210> 399
 <211> 9
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 399
- catcgaggt 9
 <210> 400
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 400
- ctcgatgct 9
 <210> 401
 35 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 401
 ccatcgtgt 9
 5 <210> 402
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 402
 acgatggct 9
 <210> 403
 <211> 9
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 403
 20 gtgctgcgt 9
 <210> 404
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 404
 gcagcacct 9
 <210> 405
 30 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 405
 gactacggt 9
 <210> 406

<211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> constructo sintético
 <400> 406
 cgtagtcct 9
 <210> 407
 <211> 9
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 407
 15 gtgctgagt 9
 <210> 408
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 408
 tcagcacct 9
 <210> 409
 25 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 409
 gctgcatgt 9
 <210> 410
 <211> 9
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 410
 atgcagcct 9
 <210> 411
 <211> 9
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 411
 10 gagtgggt 9
 <210> 412
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 412
 accactcct 9
 <210> 413
 20 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 25 <400> 413
 gactaccgt 9
 <210> 414
 <211> 9
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 414
 ggtagtcct 9
 35 <210> 415
 <211> 9
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 415
 5 cggatgatg 9
 <210> 416
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 416
 atcaccgct 9
 <210> 417
 15 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 417
 tgcgactgt 9
 <210> 418
 <211> 9
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 418
 agtcgcact 9
 30 <210> 419
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> constructo sintético
 <400> 419
 tctggaggt 9

<210> 420
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 420
 ctccagact 9
 <210> 421
 10 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 15 <400> 421
 agcactggt 9
 <210> 422
 <211> 9
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 422
 cagtgctct 9
 25 <210> 423
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> constructo sintético
 <400> 423
 tcgcttggg 9
 <210> 424
 <211> 9
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> constructo sintético
 <400> 424
 caagcgact 9
 <210> 425
 5 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 425
 agcactcgt 9
 <210> 426
 <211> 9
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 426
 gagtgctct 9
 20 <210> 427
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> constructo sintético
 <400> 427
 gcgattggt 9
 <210> 428
 <211> 9
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 428
 35 caatcgct 9
 <210> 429
 <211> 9

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 429
 ccatcgcgt 9
 <210> 430
 <211> 9
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 430
 gcgatggct 9
 15 <210> 431
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 431
 tcgcttcgt 9
 <210> 432
 <211> 9
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 432
 30 gaagcgact 9
 <210> 433
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 433

agtgcctgt 9
 <210> 434
 <211> 9
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 434
 aggcaactct 9
 10 <210> 435
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> constructo sintético
 <400> 435
 ggcataggt 9
 <210> 436
 <211> 9
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 436
 25 ctatgccct 9
 <210> 437
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 437
 gcgattcgt 9
 <210> 438
 35 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 438
 gaatcgct 9
 5 <210> 439
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 439
 tgcgacggt 9
 <210> 440
 <211> 9
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 440
 20 cgtcgact 9
 <210> 441
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 441
 gagtggcgt 9
 <210> 442
 30 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 442
 gccactcct 9
 <210> 443

<211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> constructo sintético
 <400> 443
 cggtgaggt 9
 <210> 444
 <211> 9
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 444
 15 ctcaccgct 9
 <210> 445
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 445
 gctgcaagt 9
 <210> 446
 25 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 446
 ttgcagcct 9
 <210> 447
 <211> 9
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 447
 tccgctgt 9
 <210> 448
 <211> 9
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 448
 10 agcggaact 9
 <210> 449
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 449
 gaggaggt 9
 <210> 450
 20 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 25 <400> 450
 tccactcct 9
 <210> 451
 <211> 9
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 451
 acagagcgt 9
 35 <210> 452
 <211> 9
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 452
 5 gctctgtct 9
 <210> 453
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 453
 tgcgaccgt 9
 <210> 454
 15 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 454
 ggtcgact 9
 <210> 455
 <211> 9
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 455
 cctgtaggt 9
 30 <210> 456
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> constructo sintético
 <400> 456
 ctacaggct 9

<210> 457
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 457
 tagccgtgt 9
 <210> 458
 10 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 15 <400> 458
 acggctact 9
 <210> 459
 <211> 9
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 459
 tgcgacagt 9
 25 <210> 460
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> constructo sintético
 <400> 460
 tgtcgact 9
 <210> 461
 <211> 9
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> constructo sintético
 <400> 461
 ggtctgtgt 9
 <210> 462
 5 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 462
 acagaccct 9
 <210> 463
 <211> 9
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 463
 cggatgaagt 9
 20 <210> 464
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> constructo sintético
 <400> 464
 ttcaccgct 9
 <210> 465
 <211> 9
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 465
 35 caacgaggt 9
 <210> 466
 <211> 9

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 466
 ctcgttgct 9
 <210> 467
 <211> 9
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 467
 gcagcatgt 9
 15 <210> 468
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 468 9
 atgctgcct 9
 <210> 469
 <211> 9
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 469
 30 tcgtcaggt 9
 <210> 470
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 470

ctgacgact 9
 <210> 471
 <211> 9
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 471
 agtgccagt 9
 10 <210> 472
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> constructo sintético
 <400> 472
 tggcactct 9
 <210> 473
 <211> 9
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 473
 25 tagaggcgt 9
 <210> 474
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 474
 gcctctact 9
 <210> 475
 35 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 475
 gtcagcggg 9
 5 <210> 476
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 476
 cgctgacct 9
 <210> 477
 <211> 9
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 477
 20 tcaggaggt 9
 <210> 478
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 478
 ctctgact 9
 <210> 479
 30 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 479
 agcagggt 9
 <210> 480

<211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> constructo sintético
 <400> 480
 acctgctct 9
 <210> 481
 <211> 9
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 481
 15 ttccgcagt 9
 <210> 482
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 482
 tgcggaact 9
 <210> 483
 25 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 483
 gtcagccgt 9
 <210> 484
 <211> 9
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 484
 ggctgacct 9
 <210> 485
 <211> 9
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 485
 10 <210> 486
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 486
 gcagaccct 9
 <210> 487
 20 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 487
 25 tagccgagt 9
 <210> 488
 <211> 9
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 488
 tcggctact 9
 35 <210> 489
 <211> 9
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 489
 5 gtcagcagt 9
 <210> 490
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 490
 tgctgacct 9
 <210> 491
 15 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 491
 ggtctgagt 9
 <210> 492
 <211> 9
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 492
 tcagacct 9
 30 <210> 493
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> constructo sintético
 <400> 493
 cggacaggt 9

<210> 494
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 494
 ctgtccgct 9
 <210> 495
 10 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 15 <400> 495
 ttagccggt 9
 <210> 496
 <211> 9
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 496
 cggctaact 9
 25 <210> 497
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> constructo sintético
 <400> 497
 gagacgagt 9
 <210> 498
 <211> 9
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> constructo sintético
 <400> 498
 tcgtctcct 9
 <210> 499
 5 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 499
 cgtaaccgt 9
 <210> 500
 <211> 9
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 500
 ggttagcgt 9
 20 <210> 501
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> constructo sintético
 <400> 501
 ttggcgtgt 9
 <210> 502
 <211> 9
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 502
 35 acgccaact 9
 <210> 503
 <211> 9

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 503
 atggcaggt 9
 <210> 504
 <211> 9
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 504
 ctgccatct 9
 15 <210> 505
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 505
 cagctacga 9
 <210> 506
 <211> 9
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 506
 30 gtagctgac 9
 <210> 507
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 507

ctctgcga 9
 <210> 508
 <211> 9
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 508
 gcaggagac 9
 10 <210> 509
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> constructo sintético
 <400> 509
 gctgcctga 9
 <210> 510
 <211> 9
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 510
 25 aggcagcac 9
 <210> 511
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 511
 caggaacga 9
 <210> 512
 35 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 512
 gttcctgac 9
 5 <210> 513
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 513
 cacacgcga 9
 <210> 514
 <211> 9
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 514
 20 gcgtgtgac 9
 <210> 515
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 515
 gcagcctga 9
 <210> 516
 30 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 516
 aggctgcac 9
 <210> 517

<211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> constructo sintético
 <400> 517
 ctgaacgga 9
 <210> 518
 <211> 9
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 518
 15 cgttcagac 9
 <210> 519
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 519
 ctgaaccga 9
 <210> 520
 25 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 520
 gggtcagac 9
 <210> 521
 .<211> 9
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 521
 tctggacga 9
 <210> 522
 <211> 9
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 522
 10 gtccagaac 9
 <210> 523
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 523
 tgcttacga 9
 <210> 524
 20 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 25 <400> 524
 gtaggcaac 9
 <210> 525
 <211> 9
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 525
 ggcatacga 9
 35 <210> 526
 <211> 9
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 526
 5 gtatgccac 9
 <210> 527
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 527
 cggtgacga 9
 <210> 528
 15 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 528
 gtcaccgac 9
 <210> 529
 <211> 9
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 529
 caacgacga 9
 30 <210> 530
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> constructo sintético
 <400> 530
 gtcgttgac 9

- <210> 531
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 531
 ctctctga 9
 <210> 532
- 10 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
- 15 <400> 532
 agaggagac 9
 <210> 533
 <211> 9
 <212> ADN
- 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 533
 tcaggacga 9
- 25 <210> 534
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 30 <223> constructo sintético
 <400> 534
 gtcctgaac 9
 <210> 535
 <211> 9
- 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> constructo sintético
 <400> 535
 aaaggcggg 9
 <210> 536
 5 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 536
 cgcccttac 9
 <210> 537
 <211> 9
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 537
 ctcctcggg 9
 20 <210> 538
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> constructo sintético
 <400> 538
 cgaggagac 9
 <210> 539
 <211> 9
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 539
 35 cagatgcga 9
 <210> 540
 <211> 9

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 540
 gcatctgac 9
 <210> 541
 <211> 9
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 541
 gcagcaaga 9
 15 <210> 542
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 542
 ttgctgcac 9
 <210> 543
 <211> 9
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 543
 30 gtggagtga 9
 <210> 544
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 544

- actccacac 9
 <210> 545
 <211> 9
 <212> ADN
- 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 545
- ccagtagga 9
- 10 <210> 546
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 15 <223> constructo sintético
 <400> 546
- ctactggac 9
- <210> 547
 <211> 9
- 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 547
- 25 atggcacga 9
 <210> 548
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 548
- gtgccatac 9
- <210> 549
- 35 <211> 9
 <212> ADN.
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 549
 ggactgtga 9
 5 <210> 550
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 550
 acagtccac 9
 <210> 551
 <211> 9
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 551
 20 ccgaactga 9
 <210> 552
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 552
 agttcggac 9
 <210> 553
 30 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 553
 ctctcaga 9
 <210> 554

- <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 5 <223> constructo sintético
 <400> 554
 tgaggagac 9
 <210> 555
 <211> 9
- 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 555
- 15 cactgctga 9
 <210> 556
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 556
 agcagtgc 9
 <210> 557
- 25 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
- 30 <400> 557
 agcaggcga 9
 <210> 558
 <211> 9
 <212> ADN
- 35 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 558
 gcctgctac 9
 <210> 559
 <211> 9
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 559
 10 agcaggaga 9
 <210> 560
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 560
 tcctgctac 9
 <210> 561
 20 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 25 <400> 561
 agagccaga 9
 <210> 562
 <211> 9
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 562
 tggctctac 9
 35 <210> 563
 <211> 9
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 563
 5 gtcgttga 9
 <210> 564
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 564
 caacgacac 9
 <210> 565
 15 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 565
 ccgaacgga 9
 <210> 566
 <211> 9
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 566
 cgttcggac 9
 30 <210> 567
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> constructo sintético
 <400> 567
 cactgcgga 9

<210> 568
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 568
 cgcagtgac 9
 <210> 569
 10 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 15 <400> 569
 gtggagcga 9
 <210> 570
 <211> 9
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 570
 gctccacac 9
 25 <210> 571
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> constructo sintético
 <400> 571
 gtggagaga 9
 <210> 572
 <211> 9
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> constructo sintético
 <400> 572
 tctccacac 9
 <210> 573
 5 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 573
 ggactgcga 9
 <210> 574
 <211> 9
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 574
 gcagtccac 9
 20 <210> 575
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> constructo sintético
 <400> 575
 ccgaaccga 9
 <210> 576
 <211> 9
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 576
 35 ggttcggac 9
 <210> 577
 <211> 9

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
5 <400> 577
cactgccga 9
<210> 578
<211> 9
<212> ADN
10 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 578
ggcagtgac 9
15 <210> 579
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
20 <223> constructo sintético
<400> 579
cgaaacgga 9
<210> 580
<211> 9
25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 580
30 cgtttcgac 9
<210> 581
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
35 <220>
<223> constructo sintético
<400> 581

- ggactgaga 9
 <210> 582
 <211> 9
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 582
- tcagtcac 9
 10 <210> 583
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> constructo sintético
 <400> 583
- ccgaacaga 9
 <210> 584
 <211> 9
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 584
- tggtcggac 9
 <210> 585
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 585
- cgaaacga 9
 <210> 586
 35 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 586
 ggttcgac 9
 5 <210> 587
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 587
 ctggcttga 9
 <210> 588
 <211> 9
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 588
 20 aagccagac 9
 <210> 589
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 589
 cacacctga 9
 <210> 590
 30 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 590
 aggtgtgac 9
 <210> 591

<211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> constructo sintético
 <400> 591
 aacgaccga 9
 <210> 592
 <211> 9
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 592
 15 ggtcgttac 9
 <210> 593
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 593
 atccagcga 9
 <210> 594
 25 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 594
 gctggatac 9
 <210> 595
 <211> 9
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 595
 tgccaagga 9
 <210> 596
 <211> 9
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 596
 10 cttcgcaac 9
 <210> 597
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 597
 tgccaacga 9
 <210> 598
 20 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 25 <400> 598
 gttcgcaac 9
 <210> 599
 <211> 9
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 599
 ctggctgga 9
 35 <210> 600
 <211> 9
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 600
 5 cagccagac 9
 <210> 601
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 601
 cacaccgga 9
 <210> 602
 15 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 602
 cgggtgac
 <210> 603
 <211> 9
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 603
 agtgcagga
 30 <210> 604
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> constructo sintético
 <400> 604
 ctgcactac

<210> 605.
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 605
 gaccgttga 9
 <210> 606
 10 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 15 <400> 606
 aacggtcac 9
 <210> 607
 <211> 9
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 607
 ggtgagtga 9
 25 <210> 608
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> constructo sintético
 <400> 608
 actcaccac 9
 <210> 609
 <211> 9
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> constructo sintético
<400> 609
ccttcctga 9
<210> 610
5 <211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
10 <400> 610
aggaaggac 9
<210> 611
<211> 9
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 611
ctggctaga 9
20 <210> 612
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
25 <223> constructo sintético
<400> 612
tagccagac 9
<210> 613
<211> 9
30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 613
35 cacaccaga 9
<210> 614
<211> 9

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 614
 tgggtgac 9
 <210> 615
 <211> 9
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 615
 agcggtaga 9
 15 <210> 616
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 616
 taccgctac 9
 <210> 617
 <211> 9
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 617
 30 gtcagagga 9
 <210> 618
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 618

ctctgacac 9
 <210> 619
 <211> 9
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 619
 ttccgacga 9
 10 <210> 620
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> constructo sintético
 <400> 620
 gtcggaaac 9
 <210> 621
 <211> 9
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 621
 25 aggcgtaga 9
 <210> 622
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 622
 tacgcctac 9
 <210> 623
 35 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 623
 ctcgactga 9
 5 <210> 624
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 624
 agtcgagac 9
 <210> 625
 <211> 9
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 625
 20 tacgctgga 9
 <210> 626
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 626
 cagcgtaac 9
 <210> 627
 30 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 627
 gttcggtga 9
 <210> 628

<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
5 <223> constructo sintético
<400> 628
accgaacac 9
<210> 629
<211> 9
10 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 629
15 gccagcaga 9
<210> 630
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
20 <220>
<223> constructo sintético
<400> 630
tgctggcac 9
<210> 631
25 <211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
30 <400> 631
gaccgtaga 9
<210> 632
<211> 9
<212> ADN
35 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético

<400> 632
 tacggtcac 9
 <210> 633
 <211> 9
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 633
 10 gtgctctga 9
 <210> 634
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 634
 agagcacac 9
 <210> 635
 20 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 25 <400> 635
 ggtgagcga 9
 <210> 636
 <211> 9
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 636
 gctcaccac 9
 35 <210> 637
 <211> 9
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 637
5 ggtgagaga 9
<210> 638
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
10 <220>
<223> constructo sintético
<400> 638
ttcaccac 9
<210> 639
15 <211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
20 <400> 639
ccttcaga 9
<210> 640
<211> 9
<212> ADN
25 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 640
tggaaggac 9
30 <210> 641
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
35 <223> constructo sintético
<400> 641
ctcctacga 9

<210> 642
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5 <220>
<223> constructo sintético
<400> 642
gtaggagac 9
<210> 643
10 <211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
15 <400> 643
ctcgacgga 9
<210> 644
<211> 9
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 644
cgtcgagac 9
25 <210> 645
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
30 <223> constructo sintético
<400> 645
gccgttga 9
<210> 646
<211> 9
35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

<223> constructo sintético
<400> 646
aaacggcac 9
<210> 647
5 <211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
10 <400> 647
gcgagtgga 9
<210> 648
<211> 9
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 648
actccgcac 9
20 <210> 649
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
25 <223> constructo sintético
<400> 649
cgtgcttga 9
<210> 650
<211> 9
30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 650
35 aagcaccgac 9
<210> 651
<211> 9

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 651
 ctcgaccga 9
 <210> 652
 <211> 9
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 652
 ggtcgagac 9
 15 <210> 653
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 653
 agagcagga 9
 <210> 654
 <211> 9
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 654
 30 ctgctctac 9
 <210> 655
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 655

gtgctcgga 9
 <210> 656
 <211> 9
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 656
 cgagcacac 9
 10 <210> 657
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> constructo sintético
 <400> 657
 ctgcacaga 9
 <210> 658
 <211> 9
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 658
 25 tgtcgagac 9
 <210> 659
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 659
 ggagagtga 9
 <210> 660
 35 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 660
 actctccac 9
 5 <210> 661
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 661
 aggctgtga 9
 <210> 662
 <211> 9
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 662
 20 acagcctac 9
 <210> 663
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 663
 agagcacga 9
 <210> 664
 30 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 664
 gtgctctac 9
 <210> 665

- <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 5 <223> constructo sintético
 <400> 665
 ccatcctga 9
 <210> 666
 <211> 9
- 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 666
- 15 aggatggac 9
 <210> 667
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 667
 gttcggaga 9
 <210> 668
- 25 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
- 30 <400> 668
 tccgaacac 9
 <210> 669
 <211> 9
 <212> ADN
- 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 669
 tggtagcga 9
 <210> 670
 <211> 9
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 670
 10 gctaccaac 9
 <210> 671
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 671
 gtgctccga 9
 <210> 672
 20 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 25 <400> 672
 ggagcacac 9
 <210> 673
 <211> 9
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 673
 gtgctcaga 9
 35 <210> 674
 <211> 9
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 674
 5 tgagcacac 9
 <210> 675
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 675
 gccgttgga 9
 <210> 676
 15 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 676
 caacggcac 9
 <210> 677
 <211> 9
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 677
 gaggctga 9
 30 <210> 678
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> constructo sintético
 <400> 678
 agcactcac 9

<210> 679
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 679
 gctccttga 9
 <210> 680
 10 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 15 <400> 680
 aaggagcac
 <210> 681
 <211> 9
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 681
 ccgaaagga 9
 25 <210> 682
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> constructo sintético
 <400> 682
 ctttcggac 9
 <210> 683
 <211> 9
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> constructo sintético
 <400> 683
 cactgagg 9
 <210> 684
 5 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 684
 ctcagtgac 9
 <210> 685
 <211> 9
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 685
 cgtgctgga 9
 20 <210> 686
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> constructo sintético
 <400> 686
 cagcacgac 9
 <210> 687
 <211> 9
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 687
 35 ccgaaacga 9
 <210> 688
 <211> 9

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 688
 gtttcggac 9
 <210> 689
 <211> 9
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 689
 gcggagaga 9
 15 <210> 690
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 690
 tctccgcac 9
 <210> 691
 <211> 9
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 691
 30 gccgtaga 9
 <210> 692
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 692

taacggcac 9
 <210> 693
 <211> 9
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 693
 tctcgtgga 9
 10 <210> 694
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> constructo sintético
 <400> 694
 cacgagaac 9
 <210> 695
 <211> 9
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 695
 25 cgtgctaga 9
 <210> 696
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 696
 tagcacgac 9
 <210> 697
 35 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 697
 gcctgtctt 9
 5 <210> 698
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 698
 gacaggctc 9
 <210> 699
 <211> 9
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 699
 20 ctcctggtt 9
 <210> 700
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 700
 ccaggagtc 9
 <210> 701
 30 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 701
 actctgctt 9
 <210> 702

<211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> constructo sintético
 <400> 702 gcagagttc 9
 <210> 703
 <211> 9
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 703
 catcgctt 9
 15 <210> 704
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 704
 ggcgatgtc 9
 <210> 705
 <211> 9
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 705
 30 gccactatt 9
 <210> 706
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 706

- tagtggctc 9
 <210> 707
 <211> 9
 <212> ADN
- 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 707
- cacacggtt 9
- 10 <210> 708
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 15 <223> constructo sintético
 <400> 708
- ccgtgtgtc 9
- 20 <210> 709
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 709
- 25 caacgcctt 9
 <210> 710
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 710
- ggcgttgtc 9
- 35 <210> 711
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 711
 actgaggtt 9
 5 <210> 712
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 712
 cctcagttc 9
 <210> 713
 <211> 9
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 713
 20 gtgctggtt 9
 <210> 714
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 714
 ccagcactc 9
 <210> 715
 30 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 715
 catcgactt 9
 <210> 716

<211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> constructo sintético
 <400> 716
 gtcgatgct 9
 <210> 717
 <211> 9
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 717
 15 ccatcggt 9
 <210> 718
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 718
 ccgatggtc 9
 <210> 719
 25 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 719
 gctgcactt 9
 <210> 720
 <211>
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 720
 gtcagctc 9
 <210> 721
 <211> 9
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 721
 10 acagaggtt 9
 <210> 722
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 722
 cctctgttc 9
 <210> 723
 20 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 25 <400> 723
 agtgccgtt 9
 <210> 724
 <211> 9
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 724
 cggcacttc 9
 35 <210> 725
 <211> 9
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 725
 5 cggacatt 9
 <210> 726
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 726
 atgtccgtc 9
 <210> 727
 15 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 727
 ggtctggtt 9
 <210> 728
 <211> 9
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 728
 ccagacctc 9
 30 <210> 729
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> constructo sintético
 <400> 729
 gagacggtt 9

<210> 730
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 730
 ccgtctctc 9
 <210> 731
 10 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 15 <400> 731
 ctttccggt 9
 <210> 732
 <211> 9
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 732
 cggaaagtc 9
 25 <210> 733
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> constructo sintético
 <400> 733
 cagatggtt 9
 <210> 734
 <211> 9
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> constructo sintético
 <400> 734
 ccatctgtc 9
 <210> 735
 5 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 735
 cggacactt 9
 <210> 736
 <211> 9
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 736
 ggtccgtc 9
 20 <210> 737
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> constructo sintético
 <400> 737
 actctcgtt 9
 <210> 738
 <211> 9
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 738
 35 cgagagttc 9
 <210> 739
 <211> 9

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 739
 gcagcactt 9
 <210> 740
 <211> 9
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 740
 gtgctgctc 9
 15 <210> 741
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 741
 actctcctt 9
 <210> 742
 <211> 9
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 742
 30 ggagagttc 9
 <210> 743
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 743

accttggtt 9
 <210> 744
 <211> 9
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 744
 ccaagggtc 9
 10 <210> 745
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> constructo sintético
 <400> 745
 agagccgtt 9
 <210> 746
 <211> 9
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 746
 25 cggctcttc 9
 <210> 747
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 747
 accttgctt 9
 <210> 748
 35 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 748
 gcaaggttc 9
 5 <210> 749
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 749
 aagtccggt 9
 <210> 750
 <211> 9
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 750
 20 cggactttc 9
 <210> 751
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 751
 ggactgggt 9
 <210> 752
 30 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 752
 ccagtctc 9
 <210> 753

- <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 5 <223> constructo sintético
 <400> 753
 gtcgttctt 9
 <210> 754
 <211> 9
- 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 754
- 15 gaacgactc 9
 <210> 755
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 755
 cagcatctt 9
 <210> 756
- 25 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
- 30 <400> 756
 gatgctgtc 9
 <210> 757
 <211> 9
 <212> ADN
- 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 757
 ctatccgtt 9
 <210> 758
 <211> 9
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 758
 10 cggatagtc 9
 <210> 759
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 759
 acactcgtt 9
 <210> 760
 20 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 25 <400> 760
 cgagtgttc 9
 <210> 761
 <211> 9
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 761
 atccaggtt 9
 35 <210> 762
 <211> 9
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 762
5 cctggattc 9
<210> 763
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
10 <220>
<223> constructo sintético
<400> 763
gttcctggt 9
<210> 764
15 <211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
20 <400> 764
caggaactc 9
<210> 765
<211> 9
<212> ADN
25 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 765
aactcctt 9
30 <210> 766
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
35 <223> constructo sintético
<400> 766
ggagtgttc 9

<210> 767
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 767
 gttcctctt 9
 <210> 768
 10 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 15 <400> 768
 gaggaactc 9
 <210> 769
 <211> 9
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 769
 ctggctctt 9
 25 <210> 770
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> constructo sintético
 <400> 770
 gagccagtc 9
 <210> 771
 <211> 9
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> constructo sintético
 <400> 771
 acggcattt 9
 <210> 772
 5 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 772
 atgccgttc 9
 <210> 773
 <211> 9
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 773
 ggtgaggtt 9
 20 <210> 774
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> constructo sintético
 <400> 774
 cctcacctc 9
 <210> 775
 <211> 9
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 775
 35 ccttccgtt 9
 <210> 776
 <211> 9

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 776
 cggaaggtc 9
 <210> 777
 <211> 9
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 777
 tacgctctt 9
 15 <210> 778
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 778
 gagcgtatc 9
 <210> 779
 <211> 9
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 779
 30 acggcagtt 9
 <210> 780
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 780

ctgccgttc 9
 <210> 781
 <211> 9
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 781
 actgacgtt 9
 10 <210> 782
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> constructo sintético
 <400>'782
 cgtcagttc 9
 <210> 783
 <211> 9
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 783
 25 acggcactt 9
 <210> 784
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 784
 gtgccgttc 9
 <210> 785
 35 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 785
 actgacctt 9
 5 <210> 786
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 786
 ggtcagttc 9
 <210> 787
 <211> 9
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 787
 20 ttgcggtt 9
 <210> 788
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 788
 cgcgaaatc 9
 <210> 789
 30 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 789
 tggtaggtt 9
 <210> 790

<211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> constructo sintético
 <400> 790
 cctaccatc 9
 <210> 791
 <211> 9
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 791
 15 gttcggctt 9
 <210> 792
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 792
 gccgaactc 9
 <210> 793
 25 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 30 <400> 793
 gccgttctt 9
 <210> 794
 <211> 9
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético

<400> 794
 gaacggctc 9
 <210> 795
 <211> 9
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 795
 10 ggagaggtt 9
 <210> 796
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 796
 cctctcctc 9
 <210> 797
 20 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 25 <400> 797
 cactgactt 9
 <210> 798
 <211> 9
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 798
 gtcagtgtc 9
 35 <210> 799
 <211> 9
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 799
 5 cgtgctctt 9
 <210> 800
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 800
 gagcacgctc 9
 <210> 801
 15 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 801
 aatccgctt 9
 <210> 802
 <211> 9
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 802
 gcggatttc 9
 30 <210> 803
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> constructo sintético
 <400> 803
 aggctggtt 9

<210> 804
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 804
 ccagccttc 9
 <210> 805
 10 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 15 <400> 805
 gctagtggt 9
 <210> 806
 <211> 9
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 806
 cactagctc 9
 25 <210> 807
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> constructo sintético
 <400> 807
 ggagagctt 9
 <210> 808
 <211> 9
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> constructo sintético
 <400> 808
 gctctcctc 9
 <210> 809
 5 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 809
 ggagagatt 9
 <210> 816
 <211> 9
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 816
 tggatggtc 9
 20 <210> 817
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> constructo sintético
 <400> 817
 gctagtctt 9
 <210> 818
 <211> 9
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 818
 35 gactagctc 9
 <210> 819
 <211> 9

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 819
 aggctgatt 9
 <210> 820
 <211> 9
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 820
 tcagccttc 9
 15 <210> 821
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 821
 acagacgtt 9
 <210> 810
 <211> 9
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 810
 30 tctctctc 9
 <210> 811
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 811

aggctgctt 9
 <210> 812
 <211> 9
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 812
 gcagccttc 9
 10 <210> 813
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> constructo sintético
 <400> 813
 gagtgcggt 9
 <210> 814
 <211> 9
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 814
 25 cgactctc 9
 <210> 815
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 815
 ccatccatt 9
 <210> 822
 35 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 822
 cgtctgttc 9
 5 <210> 823
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 823
 gagtgacct 9
 <210> 824
 <211> 9
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 824
 20 ggcactctc 9
 <210> 825
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 825
 acagacctt 9
 <210> 826
 30 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 826
 ggtctgttc 9
 <210> 827

<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
5 <223> constructo sintético
<400> 827
cgagcttt 9
<210> 828
<211> 9
10 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 828
15 aagctcgtc 9
<210> 829
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
20 <220>
<223> constructo sintético
<400> 829
ttagcggtt 9
<210> 830
25 <211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
30 <400> 830
ccgctaac 9
<210> 831
<211> 9
<212> ADN
35 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético

<400> 831
 cctctgtt 9
 <210> 832
 <211> 9
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 832
 10 caagaggtc 9
 <210> 833
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 833
 ggtctctt 9
 <210> 834
 20 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 25 <400> 834
 agagacctc 9
 <210> 835
 <211> 9
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 835
 gccagattt 9
 35 <210> 836
 <211> 9
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 836
 5 atctggctc 9
 <210> 837
 <211>
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 837
 gagacctt 9
 <210> 838
 15 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 838
 aggtctctc 9
 <210> 839
 <211> 9
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 839
 cacacagtt 9
 30 <210> 840
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> constructo sintético
 <400> 840
 ctgtgtgctc 9

<210> 841
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5 <220>
<223> constructo sintético
<400> 841
cctcttctt 9
<210> 842
10 <211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
15 <400> 842
gaagaggtc 9
<210> 843
<211> 9
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 843
tagagcggtt 9
25 <210> 844
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
30 <223> constructo sintético
<400> 844
cgctctatc 9
<210> 845
<211> 9
35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

<223> constructo sintético
 <400> 845
 gcaccttt 9
 <210> 846
 5 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 846
 aagtgctc 9
 <210> 847
 <211> 9
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 847
 ggctgttt 9
 20 <210> 848
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> constructo sintético
 <400> 848
 acaagcctc 9
 <210> 849
 <211> 9
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 849
 35 gacgcgatt 9
 <210> 850
 <211> 9

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 850
 tcgctctc 9
 <210> 851
 <211> 9
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 851
 cgagctgtt 9
 15 <210> 852
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 852
 cagctcgtc 9
 <210> 853
 <211> 9
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 853
 30 tagagcctt 9
 <210> 854
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 854

ggctctatc 9
 <210> 855
 <211> 9
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 855
 catccgttt 9
 10 <210> 856
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> constructo sintético
 <400> 856
 acggatgtc 9
 <210> 857
 <211> 9
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 857
 25 ggtctcgtt 9
 <210> 858
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 858
 cgagacctc 9
 <210> 859
 35 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> constructo sintético
 <400> 859
 gccagagtt 9
 5 <210> 860
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> constructo sintético
 <400> 860
 ctctggctc 9
 <210> 861
 <211> 9
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 861
 20 gagaccgtt 9
 <210> 862
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 862
 cgttctctc 9
 <210> 863
 30 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 35 <400> 863
 cgagctatt 9
 <210> 864

<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
5 <223> constructo sintético
<400> 864
tagctcgtc 9
<210> 865
<211> 9
10 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
<400> 865
15 gcaagtgtt 9
<210> 866
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
20 <220>
<223> constructo sintético
<400> 866
cacttgctc 9
<210> 867
25 <211>
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético
30 <400> 867
ggtctcctt 9
<210> 868
<211> 9
<212> ADN
35 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> constructo sintético

<400> 868
 ggagacctc 9
 <210> 869
 <211> 9
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 869
 10 gccagactt 9
 <210> 870
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 870
 gtctggctc 9
 <210> 871
 20 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 25 <400> 871
 ggtctcatt 9
 <210> 872
 <211> 9
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 872
 tgagacctc 9
 35 <210> 873
 <211> 9
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 873
 5 gagaccatt 9
 <210> 874
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 874
 tggctctc 9
 <210> 875
 15 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 20 <400> 875
 ccttcagtt 9
 <210> 876
 <211> 9
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 876
 ctgaaggtc 9
 30 <210> 877
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> constructo sintético
 <400> 877
 gcacctgtt 9

<210> 878
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 878
 caggtgctc 9
 <210> 879
 10 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 15 <400> 879
 aaaggcgtt 9
 <210> 880
 <211> 9
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 880
 cgccttttc 9
 25 <210> 881
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> constructo sintético
 <400> 881
 cagatcggt 9
 <210> 882
 <211> 9
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

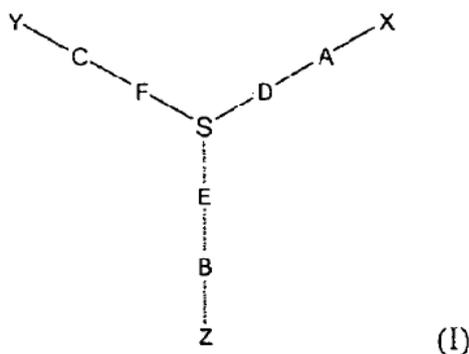
<223> constructo sintético
 <400> 882
 cgatctgtc 9
 <210> 883
 5 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 10 <400> 883
 cataggct 9
 <210> 884
 <211> 9
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 884
 gcctatgtc 9
 20 <210> 885
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> constructo sintético
 <400> 885
 ccttcact 9
 <210> 886
 <211> 9
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 886
 35 gtgaaggtc 9
 <210> 887
 <211> 9

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 5 <400> 887
 gcaccttt 9
 <210> 888
 <211> 9
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 888
 gagtgctc 9
 15 <210> 889
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> constructo sintético
 <400> 889
 cagaagacag acaagctca cctgc 25
 <210> 890
 <211> 27
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 890
 30 gcaggtgaag cttgtctgc ttctgaa 27
 PPI-156CP
 2

REIVINDICACIONES

1. Método de identificación de un compuesto que se une a una diana biológica, comprendiendo dicho método las etapas de

- 5 (a) poner en contacto la diana biológica con una biblioteca de compuestos que comprende al menos aproximadamente 10^2 compuestos distintos, comprendiendo dichos compuestos un resto funcional que comprende dos o más componentes básicos que están unidos operativamente a un oligonucleótido que identifica la estructura del resto funcional en condiciones adecuadas para que al menos un miembro de la biblioteca de compuestos se una a la diana, en el que la biblioteca de compuestos consiste esencialmente en una multiplicidad de compuestos de Fórmula I:



10 en la que:

X es un resto funcional que comprende uno o más componentes básicos;

Z es un oligonucleótido fijado en su extremo terminal 3' a B;

Y es un oligonucleótido que está fijado en su extremo terminal 5' a C;

15 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, independientemente, un grupo de unión bifuncional; y

S un átomo o un armazón molecular; en la que Y y Z están unidos covalentemente; y

20 en la que uno o ambos de Y y Z comprende una secuencia de protección terminal, comprendiendo dicha secuencia de protección terminal una secuencia de nucleótidos que comprende nucleótidos degenerados;

(b) separar los miembros de la biblioteca que no se unen a la diana;

(c) amplificar los oligonucleótidos codificantes del al menos un miembro de la biblioteca de compuestos que se une a la diana;

25 (d) secuenciar los oligonucleótidos codificantes de la etapa (c); y

(e) utilizar 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 a la diana biológica;

identificando de este modo uno o más compuestos que se unen a la diana biológica.

30 2. Método según la reivindicación 1, en el que la biblioteca comprende al menos aproximadamente 10^5 copias de cada uno de los distintos compuestos; opcionalmente al menos aproximadamente 10^6 copias de cada uno de los distintos compuestos.

3. Método según la reivindicación 1, en el que la biblioteca comprende al menos aproximadamente 10^4 compuestos distintos o al menos aproximadamente 10^6 compuestos distintos o al menos aproximadamente 10^8 compuestos distintos o al menos aproximadamente 10^{10} compuestos distintos o al menos aproximadamente 10^{12} compuestos distintos.

35

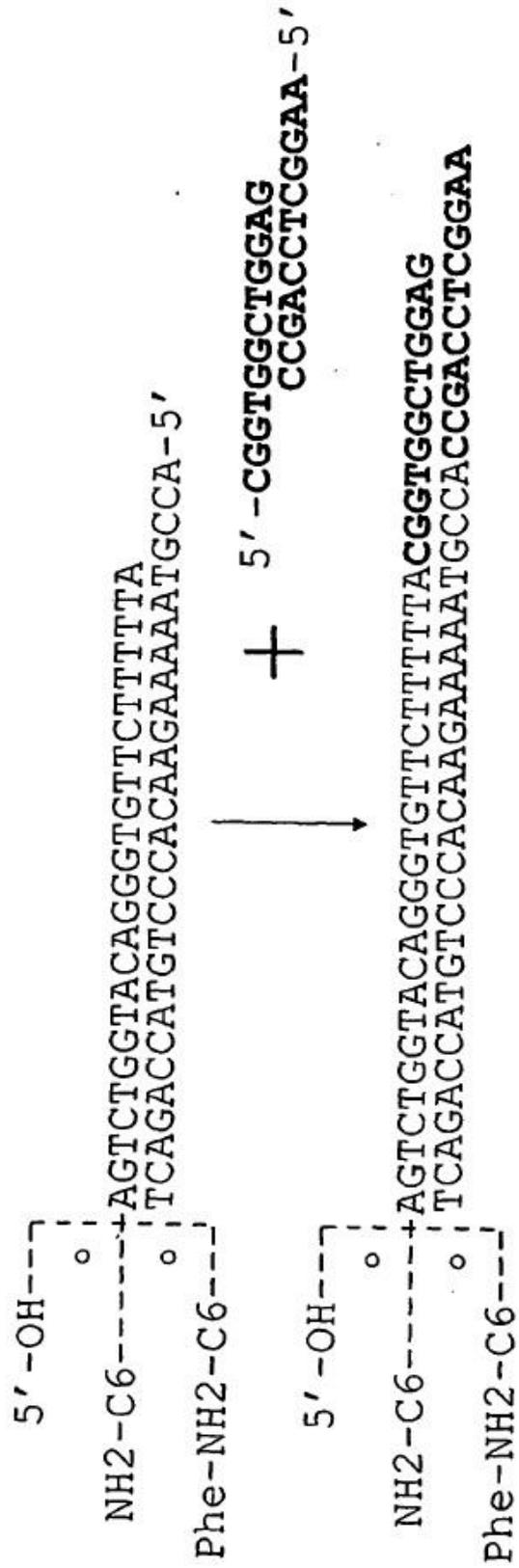


Fig. 1

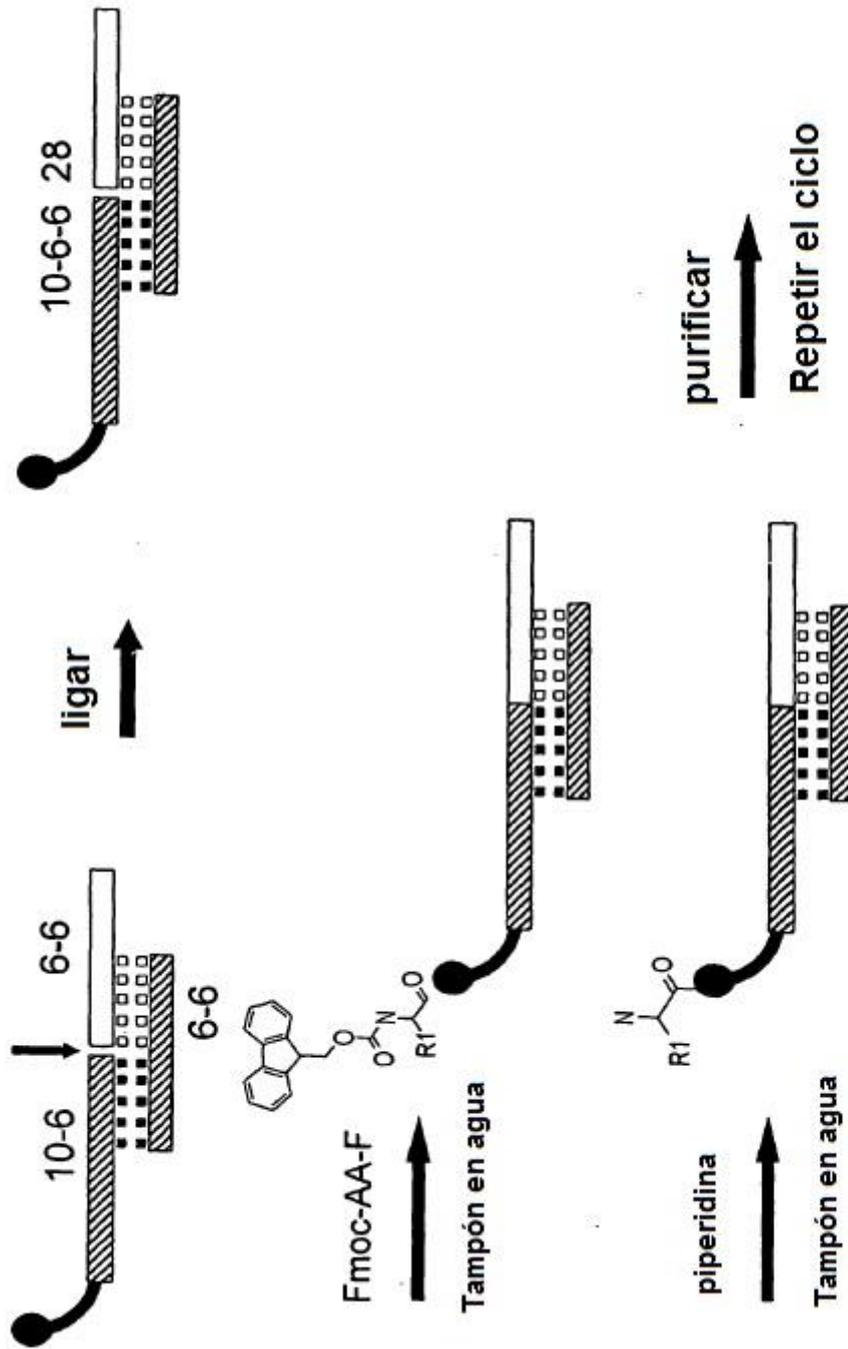


Fig. 2

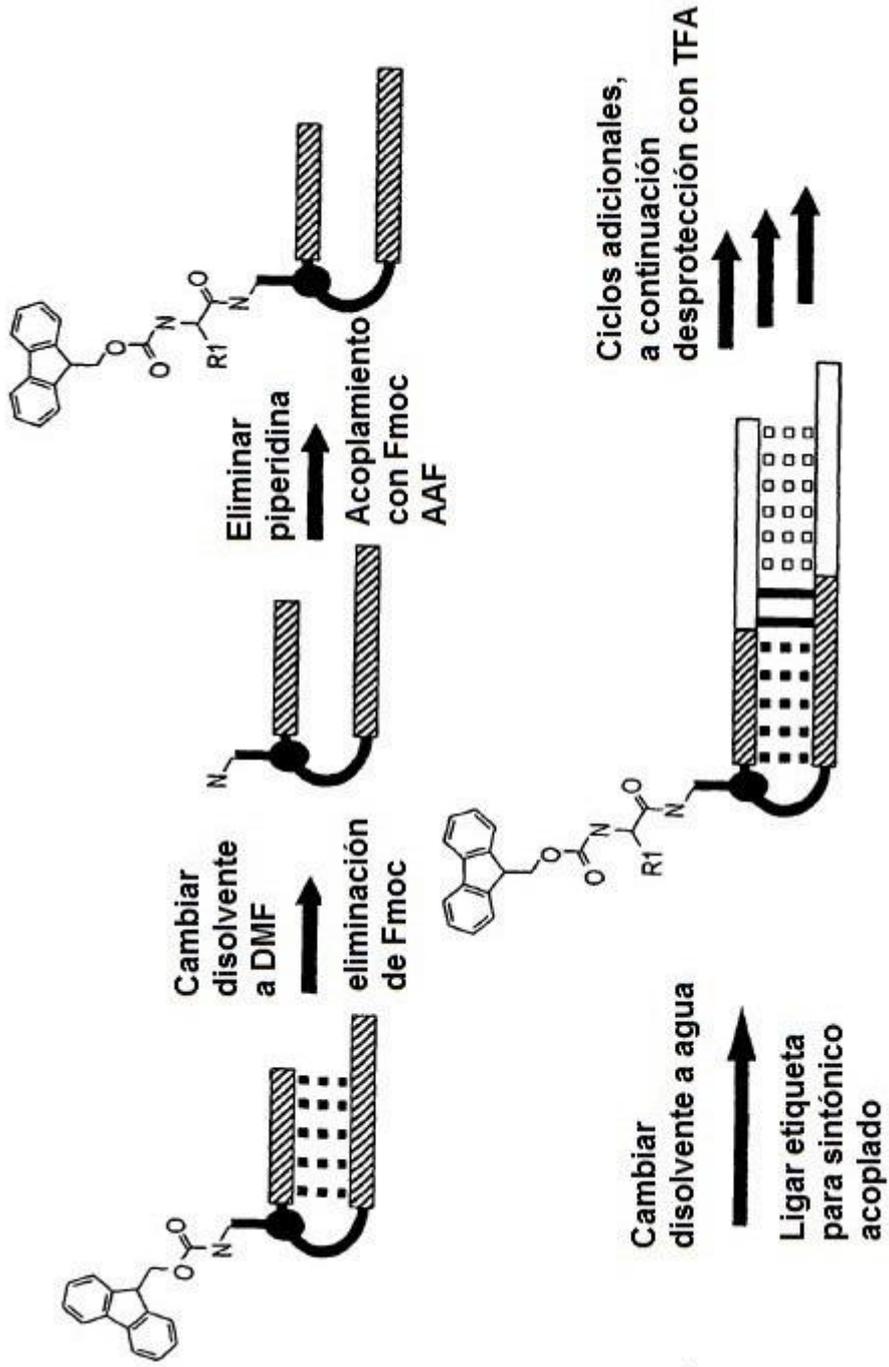


Fig. 3

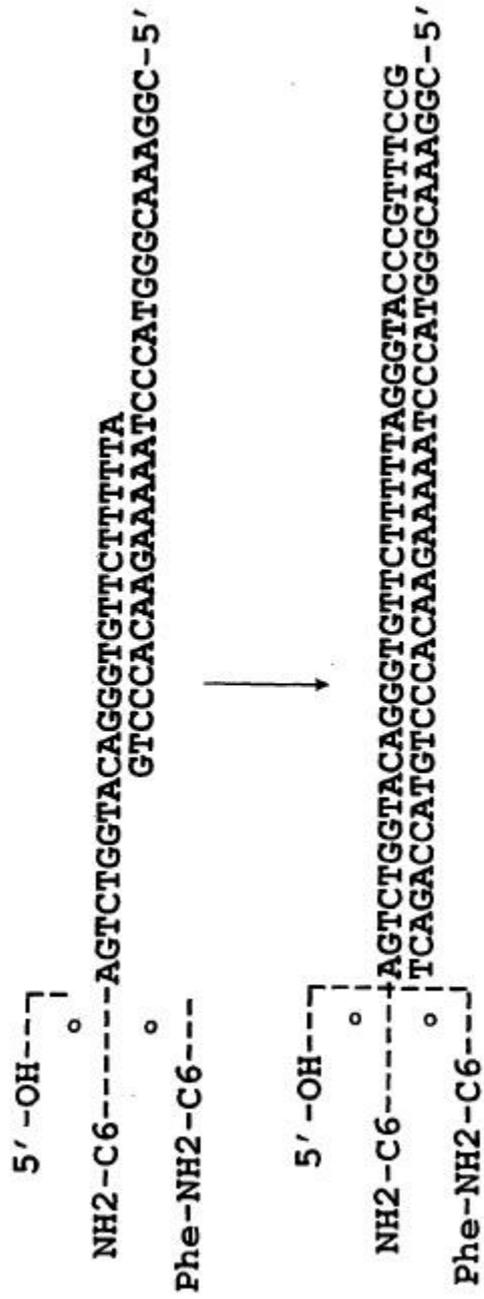


Fig. 4

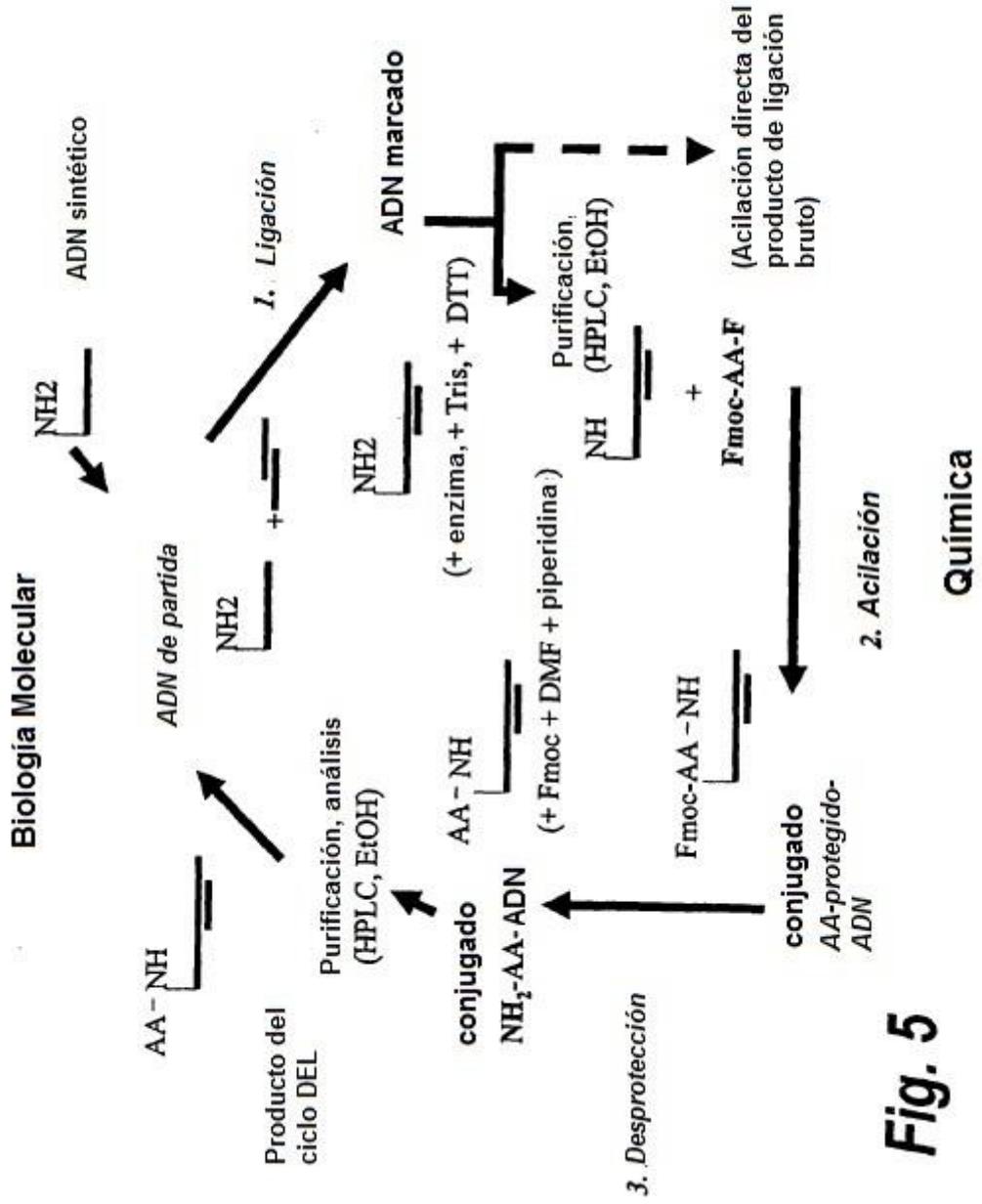


Fig. 5

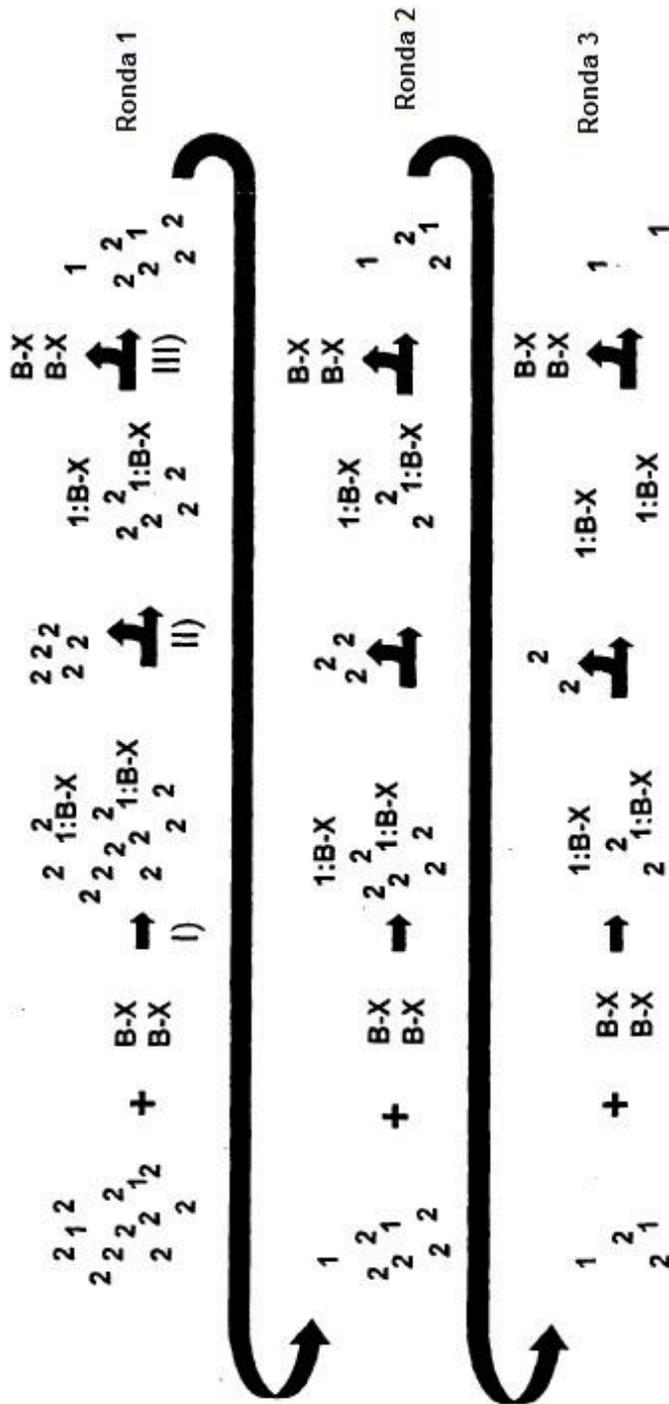


Fig. 6

Leyenda:
 1 define un miembro de la biblioteca que se une a B
 2 define un miembro de la biblioteca que no se une a B
 B define una diana para la que se desea un miembro de la biblioteca con capacidad de unión
 X define un componente que puede separarse 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 I) [captura/lavado]
 III) Define una liberación de 1 de B [elución]

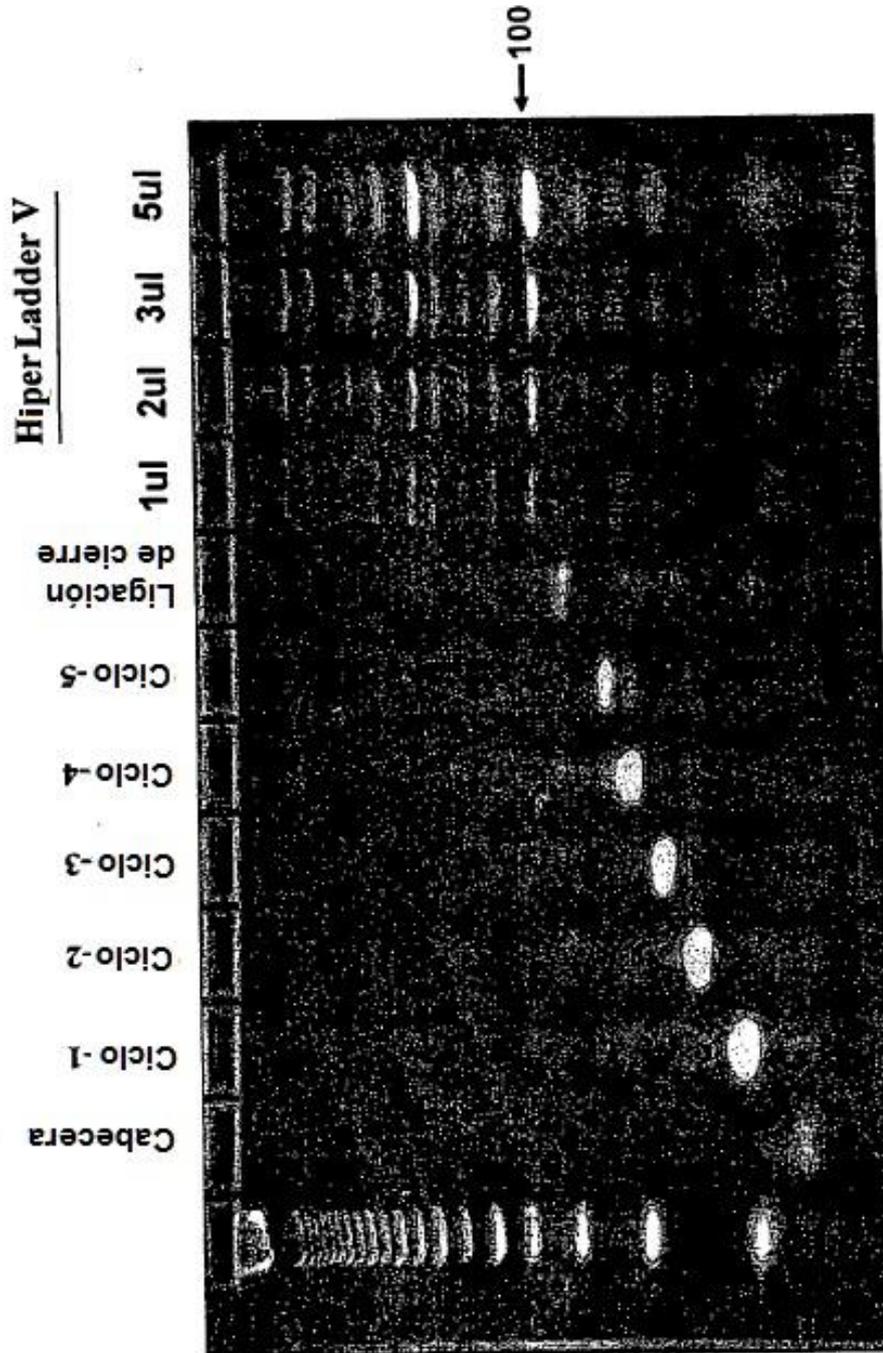


Fig. 7

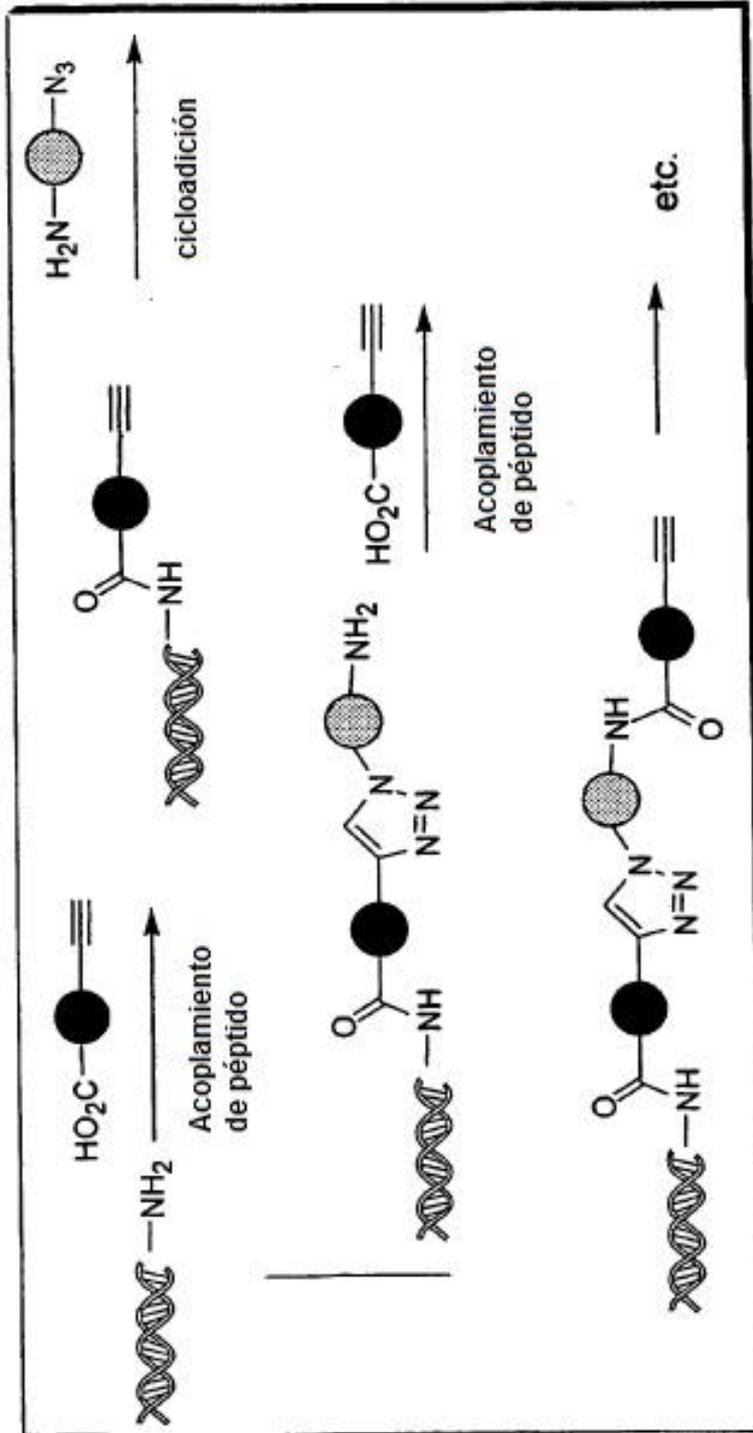


Fig. 8

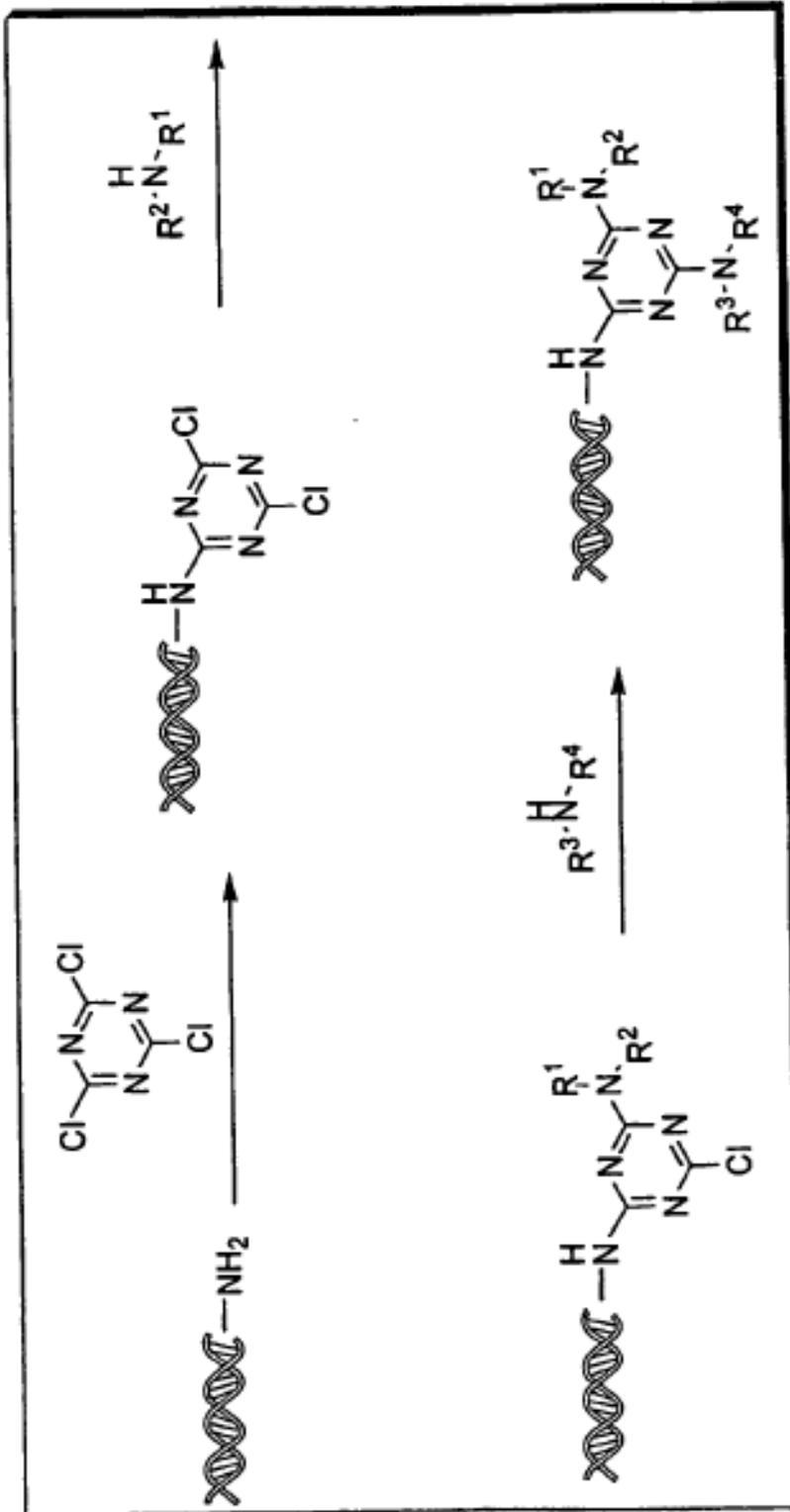


Fig. 9

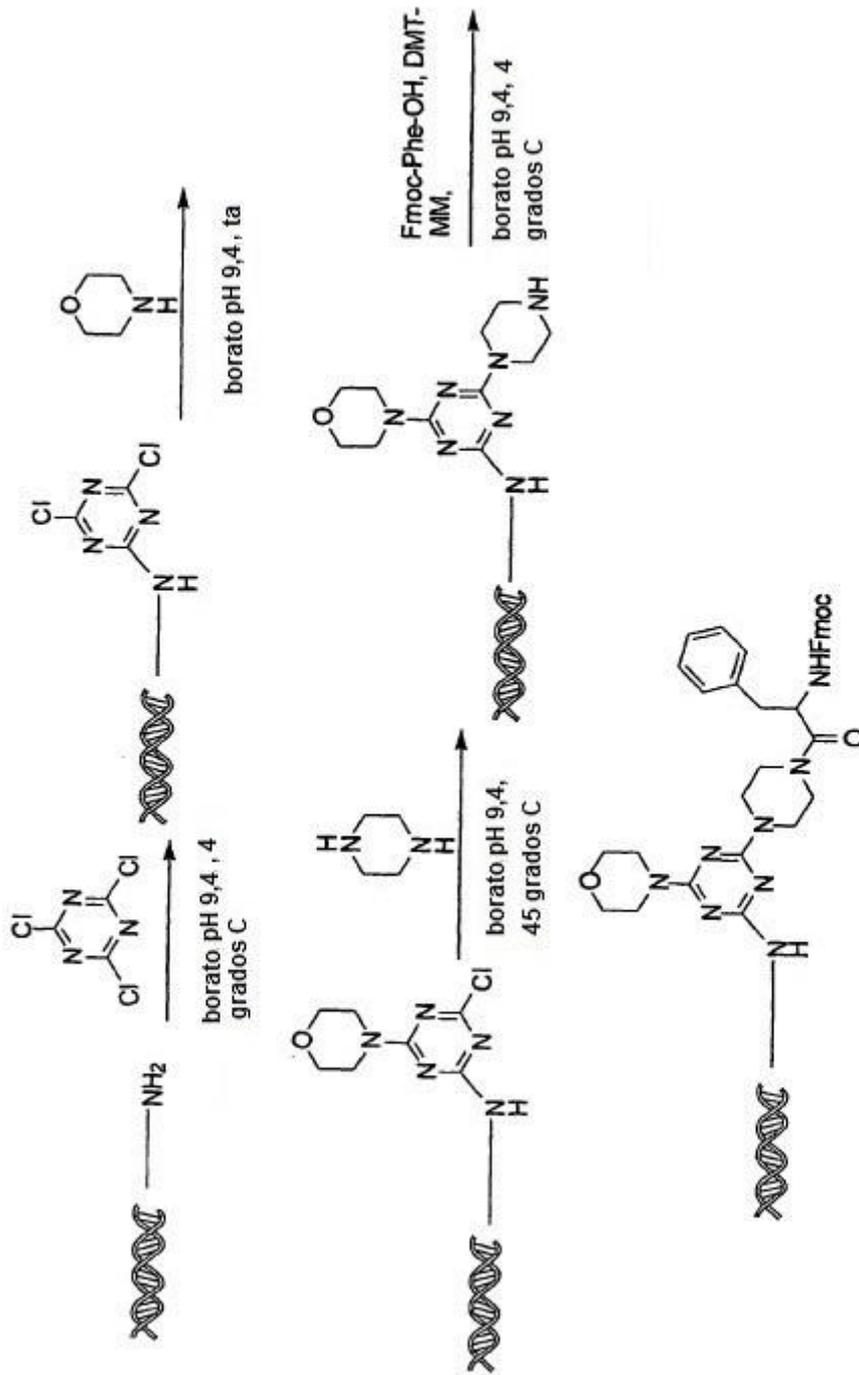


Fig. 10

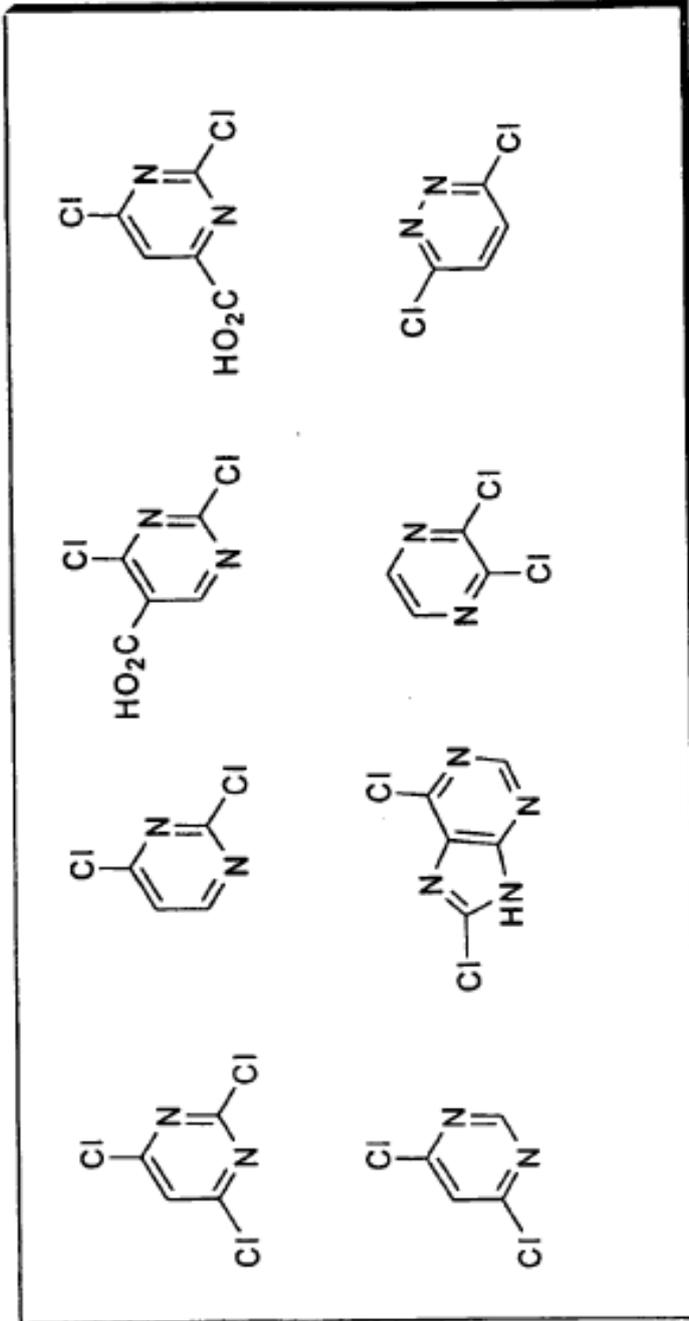


Fig. 11

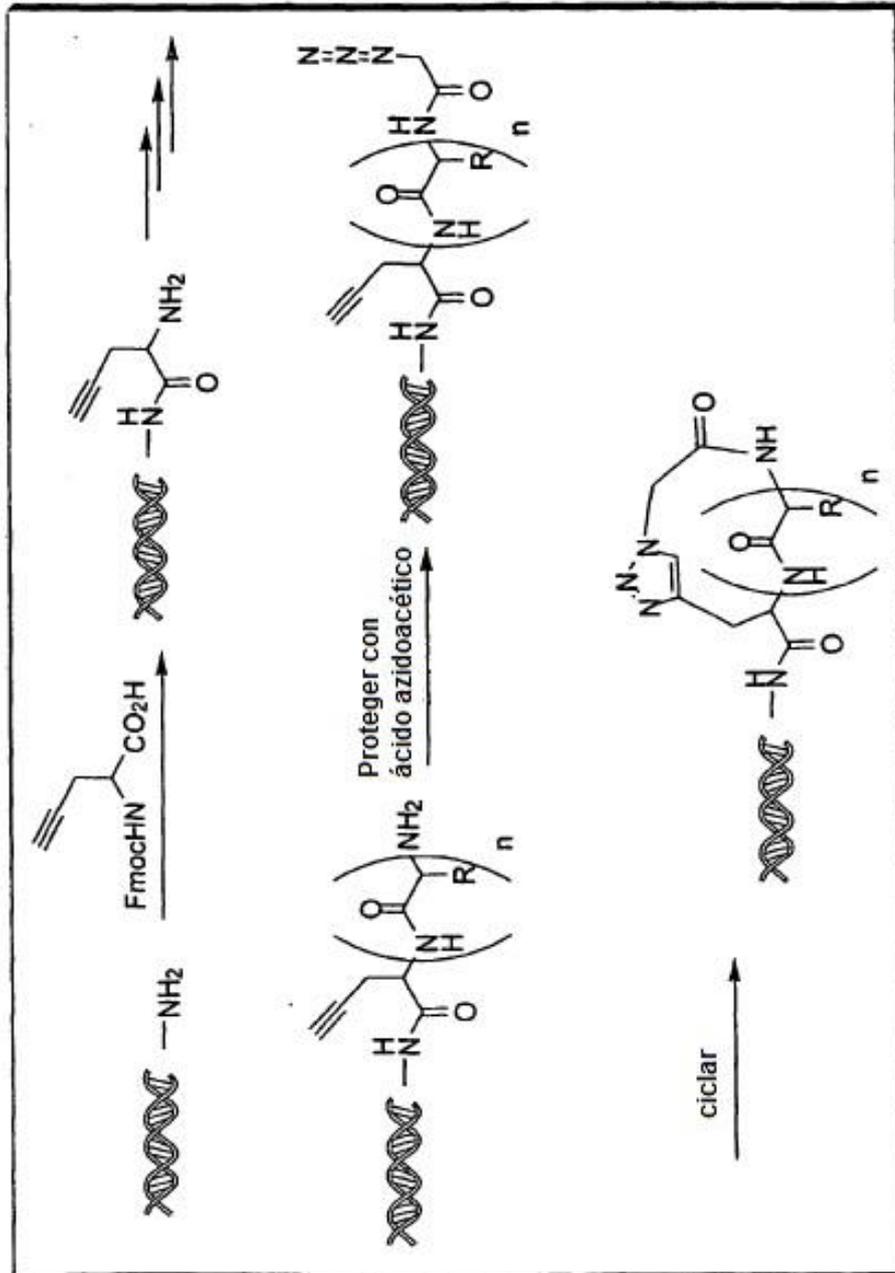


Fig. 12

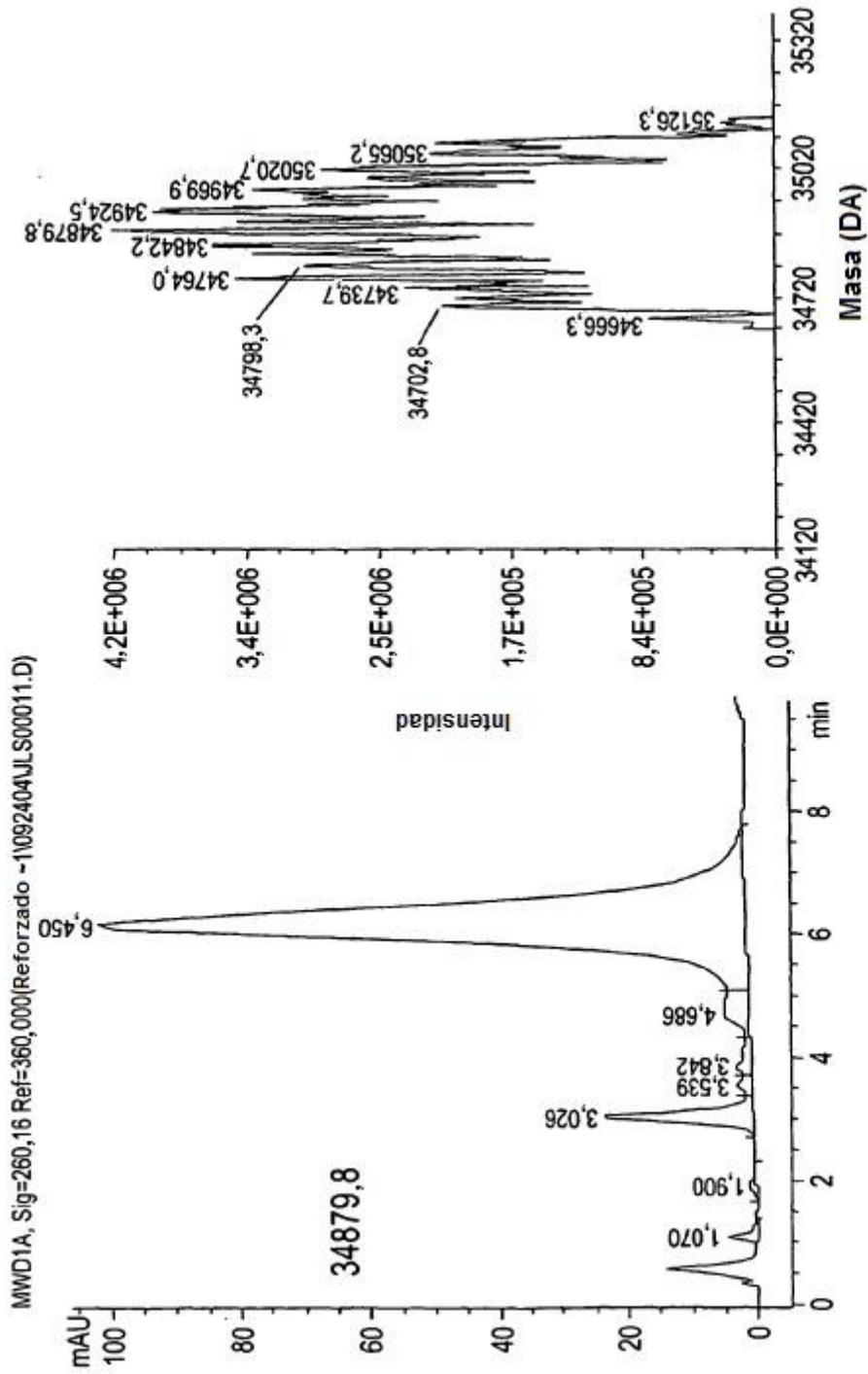


Fig. 13B

Fig. 13A