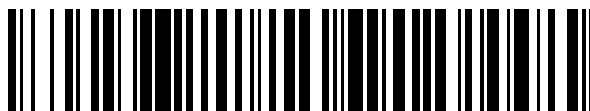


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 914 591**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2018 PCT/EP2018/085179**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2019 WO19121500**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2018 E 18822043 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2022 EP 3728585**

54 Título: **Procedimientos novedosos para la producción de oligonucleótidos**

30 Prioridad:

19.12.2017 GB 201721307

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

14.06.2022

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY
DEVELOPMENT LIMITED (100.0%)
980 Great West Road
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**CRAMERI, ANDREAS y
TEW, DAVID GRAHAM**

74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

ES 2 914 591 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

Procedimientos novedosos para la producción de oligonucleótidos

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a procedimientos novedosos que usan enzimas para la producción de oligonucleótidos, en la que dichos procedimientos son adecuados para su uso en la producción de oligonucleótidos modificados químicamente, tal como para su uso en terapia.

10

Antecedentes de la invención

La síntesis química de oligonucleótidos y oligonucleótidos modificados por medio de química de fosforamidita está bien establecida y ha sido el método de elección para sintetizar estos biopolímeros de secuencia definida durante varias décadas. El procedimiento de síntesis se realiza habitualmente como una síntesis en fase sólida, mediante la cual se añaden secuencialmente nucleótidos individuales requiriendo la adición de cada nucleótido un ciclo de varias etapas químicas para añadir y desproteger el oligonucleótido en crecimiento ("oligo") en preparación para la etapa posterior. Al final de la adición secuencial de nucleótidos, el oligo se libera del soporte de fase sólida, tiene lugar una desprotección adicional y luego el oligonucleótido en bruto se purifica además mediante cromatografía en columna.

20

Aunque este método puede considerarse de rutina y puede automatizarse, hay varias deficiencias en esta metodología, especialmente si el objetivo es preparar oligonucleótidos a gran escala tal como sería necesario para productos terapéuticos de oligonucleótidos. Estas deficiencias incluyen, pero no se limitan a:

25

1) Limitaciones prácticas inherentes al uso de cromatografía que la hacen inadecuada para purificar grandes cantidades de oligonucleótido. El uso de cromatografía a gran escala es caro y difícil de lograr debido a las limitaciones en el tamaño y el rendimiento de la columna.

30

2) El número de errores se acumula con la longitud del oligonucleótido que está sintetizándose. Por consiguiente, la naturaleza secuencial lineal del procedimiento actual da como resultado una disminución geométrica en el rendimiento. Por ejemplo, si el rendimiento para cada ciclo de adición de nucleótido es del 99 %, en el que el rendimiento de un 20 meros sería del 83 %.

35

3) Limitaciones de escala con sintetizadores de oligonucleótidos sintéticos y el equipo de purificación y aislamiento posterior: en la actualidad, la cantidad máxima de producto que puede producirse en un solo lote es del orden de 10 kg.

40

Se necesita, por tanto, tanto reducir (o idealmente eliminar) la cromatografía en columna como realizar la síntesis de un modo que no sea meramente secuencial con el fin de aumentar el rendimiento.

45

A menudo se usa ADN polimerasa para sintetizar oligonucleótidos para su uso en biología molecular y aplicaciones similares. Sin embargo, la ADN polimerasa no es adecuada para sintetizar oligonucleótidos terapéuticos debido a tanto las longitudes relativamente cortas de los oligonucleótidos como la necesidad de discriminar entre nucleótidos con diferentes modificaciones de desoxirribosa o ribosa. Por ejemplo, los oligonucleótidos terapéuticos están a menudo en el intervalo de 20 a 25 nucleótidos. La ADN polimerasa necesita al menos 7 u 8 nucleótidos, y de manera óptima de 18 a 22 nucleótidos, como cebador en cada dirección, de modo que hay poco que ganar en el intento de sintetizar un oligo terapéutico si los cebadores tienen un tamaño similar al producto deseado. Además, la ADN polimerasa requiere que todos los nucleótidos estén presentes en la reacción y se basa en el apareamiento de bases de Watson-Crick para alinear los nucleótidos entrantes. Por tanto, la ADN polimerasa es incapaz de discriminar entre cualquier orden de modificaciones de desoxirribosa o ribosa, tales como las requeridas por un gapmero, y el resultado sería una mezcla de modificaciones de desoxirribosa o ribosa en una posición dada.

50

Sumario de la invención

55

La invención proporciona un procedimiento para producir un producto de oligonucleótido monocatenario que tiene al menos un residuo de nucleótido modificado, que comprende:

60

a) proporcionar un conjunto de oligonucleótidos (I) que comprende segmentos de la secuencia del producto, en el que al menos un segmento de la secuencia del producto contiene al menos un residuo de nucleótido modificado, y en el que cada segmento se ha producido mediante síntesis enzimática;

b) proporcionar un oligonucleótido molde (II) complementario a la secuencia del producto de oligonucleótido monocatenario, teniendo dicho molde una propiedad que permite que se separe del producto y se recicle para su

uso en futuras reacciones;

c) poner en contacto (I) y (II) en condiciones para permitir el apareamiento de los oligonucleótidos de segmento con el oligonucleótido molde;

5

d) unir los oligonucleótidos de segmento usando una ligasa para formar el producto;

e) cambiar las condiciones para desnaturalizar el molde apareado y cualquier hebra de oligonucleótido de impureza, y separar las impurezas;

10

f) cambiar las condiciones para desnaturalizar el molde apareado y las hebras de oligonucleótidos de producto, y separar el producto de oligonucleótido monocatenario; y

g) reciclar el oligonucleótido molde para su uso en futuras reacciones.

15

Descripción de las figuras

Figura 1. Esquema de la producción enzimática de oligonucleótidos de segmento: a) extensión 3' para la síntesis de segmentos que comprende una reacción de dos etapas: adición y desprotección. La etapa de adición a modo de ejemplo implica ligamiento dependiente de ATP de nucleótido-3',5'-bis(tio)fosfato en el 3'-OH de un cebador de ácido nucleico monocatenario y luego desprotección del 3'-fosfato en el oligonucleótido monocatenario mediante una fosfatasa; y b) la extensión 3' a modo de ejemplo (adición y desprotección) para producir una secuencia de segmento seguido por escisión de la cadena usando una nucleasa específica de sitio (por ejemplo, endonucleasa V: escinde una base después de la inosina, es decir, en el segundo enlace fosfodiéster 3' con respecto a la inosina) para liberar el segmento.

20

25

Figura 2. Esquema del procedimiento de la invención, incluyendo las etapas de ligamiento de los oligonucleótidos de segmento para formar el producto y cambiar las condiciones para eliminar impurezas.

30

Figura 3. Esquema de múltiples configuraciones de molde.

Figura 4. Esquema básico del procedimiento de la invención que se lleva a cabo en un sistema de flujo.

35

Figura 5. Esquema detallado del procedimiento de la invención que se lleva a cabo en un sistema de flujo: a) sección de química de ligamiento, b) sección de purificación de ligamiento y c) sección de química de ligamiento alternativa y d) sección de purificación alternativa. N.B. Las secciones a) y b) (alternativamente c) y d)) pueden realizarse en una sola etapa, por ejemplo, recipiente de recogida en a) = salida de la etapa de ligamiento en b).

40

Figura 6. Ejemplos de impurezas que pueden generarse durante el procedimiento de la invención.

Figura 7. Cromatograma que muestra los resultados de una reacción de ligamiento usando ligasa de T4 NEB comercial (SEQ ID NO: 3) y ADN no modificado (ejemplo 1).

45

Figura 8. Cromatograma que muestra los resultados de una reacción de ligamiento usando ligasa de T4 unida a PERLOZA (SEQ ID NO: 4) y ADN no modificado (ejemplo 1).

Figura 9. Cromatograma que muestra los resultados de una reacción de ligamiento usando ligasa de T4 unida a PERLOZA expresada según el ejemplo 2 y fragmentos de oligonucleótidos modificados con 2'-OMe.

50

Figura 10. Trazos de HPLC para el ejemplo 4: Trazo superior (a) - sin control de ligasa. Trazo inferior (b) - clon A4. El producto y el molde se eluyen conjuntamente en este método de HPLC. Pueden observarse dos fragmentos de ligamiento intermedios (segmentos) en el trazo del clon A4 a los 10,3 y 11,2 minutos.

55

Figura 11. Esquema del "núcleo de tres moldes" usado en el ejemplo 13, que comprende un material de soporte denominado "núcleo" y tres secuencias de molde.

Figura 12. Esquema de la plataforma de ligamiento semicontinuo usada en el ejemplo 13.

60

Figura 13. Esquema de la plataforma de filtración sin salida usada en el ejemplo 14.

Figura 14. Esquema de la plataforma de filtración de flujo cruzado usada en el ejemplo 14.

Figura 15. Cromatogramas que muestran los resultados de los experimentos de filtración sin salida usando la membrana NADIR de MWCO de 10 kDa a 60 °C en el ejemplo 14. La figura a) es un cromatograma de la disolución

de material retenido, que permaneció en la celda de filtración y contenía principalmente el núcleo de tres moldes, después de dos volúmenes de diafiltración; y el cromatograma b) es del permeado, disolución enriquecida en el producto, después de dos volúmenes de diafiltración.

5 Figura 16. Cromatogramas que muestran los resultados de los experimentos de filtración de flujo cruzado usando la membrana Snyder de MWCO de 5 kDa a 50 °C y 3,0 bar de presión, en el ejemplo 14. La figura a) es un cromatograma de la disolución de material retenido, que contenía principalmente el núcleo de tres moldes y producto, después de 20 volúmenes de diafiltración; y la figura b) es un cromatograma del permeado, que contenía principalmente oligonucleótidos de segmento, después de 20 volúmenes de diafiltración.

10 Figura 17. Cromatogramas que muestran los resultados de los experimentos de filtración de flujo cruzado usando la membrana Snyder de MWCO de 5 kDa a 80 °C y 3,1 bar de presión, en el ejemplo 14. La figura 17 muestra a) un cromatograma de la disolución de material retenido, que contenía el núcleo de tres moldes solo, después de 20 volúmenes de diafiltración; y la figura b) es un cromatograma de la disolución de permeado, que contenía el producto solo, después de 2 volúmenes de diafiltración.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido", u "oligo" para abreviar, significa un polímero de residuos de nucleótidos. Estos pueden ser desoxirribonucleótidos (en los que el oligonucleótido resultante es ADN), ribonucleótidos (en los que el oligonucleótido resultante es ARN), nucleótidos modificados o una mezcla de los mismos. Un oligonucleótido puede estar completamente compuesto por residuos de nucleótidos que se encuentran en la naturaleza o puede contener al menos un nucleótido, o al menos una unión entre nucleótidos, que se ha modificado. Los oligonucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Un oligonucleótido de la invención puede conjugarse con otra molécula, por ejemplo, N-acetilgalactosamina (GalNAc) o múltiplos de la misma (agrupaciones de GalNAc).

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido terapéutico" significa un oligonucleótido que tiene una aplicación terapéutica, por ejemplo en la prevención o el tratamiento de una afección o enfermedad en un ser humano o animal. Un oligonucleótido de este tipo contiene normalmente uno o más residuos o uniones de nucleótidos modificados. Los oligonucleótidos terapéuticos actúan por medio de varios mecanismos diferentes, que incluyen, entre otros, antisentido, cambio de corte y empalme o salto de exón, inmunoestimulación e interferencia de ARN (iARN), por ejemplo por medio de microARN (miARN) y ARN de interferencia pequeño (ARNip). Un oligonucleótido terapéutico puede ser un aptámero. Los oligonucleótidos terapéuticos normalmente, pero no siempre, tendrán una secuencia definida.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término "molde" significa un oligonucleótido con una secuencia que es complementaria al 100 % a la secuencia del oligonucleótido diana (o producto).

A menos que se especifique lo contrario, tal como se usa en el presente documento, el término "complementario" significa complementario al 100 %.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "producto" significa el oligonucleótido deseado, que tiene una secuencia específica, también denominado en el presente documento "oligonucleótido diana".

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "conjunto" se refiere a un grupo de oligonucleótidos cuya secuencia puede variar, pueden ser más cortos o más largos que la secuencia diana y pueden no tener la misma secuencia que la secuencia diana. El conjunto de oligonucleótidos puede ser el producto de la síntesis de oligonucleótidos, por ejemplo, síntesis enzimática, usada con o sin purificación. El conjunto de oligonucleótidos puede estar compuesto por segmentos de la secuencia diana. Cada segmento, en sí mismo, puede estar presente como un conjunto de ese segmento y puede ser el producto de la síntesis de oligonucleótidos, por ejemplo, síntesis enzimática.

55 Tal como se usa en el presente documento, el término "apareamiento" significa la hibridación de oligonucleótidos complementarios de una manera específica de secuencia, por ejemplo, el apareamiento de dos oligonucleótidos monocatenarios, por medio de enlaces de hidrógeno del apareamiento de bases de Watson y Crick, para formar un oligonucleótido bicatenario. Las "condiciones para permitir el apareamiento" dependerán de la T_m de los oligonucleótidos complementarios hibridados y será fácilmente evidente para un experto en la técnica. Por ejemplo, la temperatura de apareamiento puede estar por debajo de la T_m de los oligonucleótidos hibridados. Alternativamente, la temperatura de apareamiento puede estar próxima a la T_m de los oligonucleótidos hibridados, por ejemplo, +/- 1, 2 o 3 °C. La temperatura de apareamiento no es, en general, superior a 10 °C por encima de la T_m de los oligonucleótidos hibridados. Las condiciones específicas para permitir el apareamiento se describen

resumidamente en la sección de ejemplos.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “desnaturalización” en relación con un oligonucleótido bicatenario se usa para indicar que las cadenas complementarias ya no están apareadas, es decir, el apareamiento de bases de Watson y Crick se ha alterado y las cadenas se han disociado. La desnaturalización se produce como resultado del cambio de las condiciones, por ejemplo, elevando la temperatura, cambiando el pH o cambiando la concentración de sal de la disolución tamponante. Los expertos en la técnica conocen bien las condiciones para la desnaturalización. La desnaturalización de un oligonucleótido bicatenario (un “dúplex”) tal como se describe en el presente documento da como resultado un producto monocatenario o un oligonucleótido de impureza y un oligonucleótido molde monocatenario.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “impureza” o “impurezas” significa oligonucleótidos que no tienen la secuencia de producto deseada. Estos oligonucleótidos pueden incluir oligonucleótidos que son más cortos que el producto (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más residuos de nucleótido más cortos), o que son más largos que el producto (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más residuos de nucleótidos más largos). Cuando el proceso de producción incluye una etapa mediante la cual se forman uniones entre segmentos, las impurezas incluyen oligonucleótidos que quedan si no se forman uno o más de los enlaces. Las impurezas también incluyen oligonucleótidos en los que se han incorporado nucleótidos incorrectos, lo que da como resultado un apareamiento erróneo en comparación con el molde. Una impureza puede tener una o más de las características descritas anteriormente. La figura 6 muestra algunas de las impurezas que pueden producirse.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “segmento” es una porción más pequeña de un oligonucleótido más largo, en particular una porción más pequeña de un producto u oligonucleótido diana. Para un producto dado, cuando todos sus segmentos se aparean con su molde y se unen entre sí, se forma el producto.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “ligamiento enzimático” significa que la unión entre dos nucleótidos adyacentes se forma enzimáticamente, es decir, mediante una enzima. Esta unión puede ser un enlace fosfodiéster (PO) que se produce de manera natural o una unión modificada que incluye, pero no se limita a, fosforotioato (PS) o fosforamidato (PA).

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “síntesis enzimática” significa la producción de oligonucleótidos, incluyendo los segmentos y el producto final, usando enzimas, por ejemplo, ligasas, transferasas, fosfatasas y nucleasas, en particular endonucleasas. Estas enzimas pueden ser enzimas de tipo natural o enzimas mutantes. Dentro del alcance de la presente invención están enzimas mutantes capaces de actuar sobre sustratos de nucleótidos u oligonucleótidos modificados.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término “ligasa” significa una enzima que cataliza la unión, es decir, la unión covalente, de dos moléculas de oligonucleótidos, por ejemplo, mediante la formación de un enlace fosfodiéster entre el extremo 3' de un oligonucleótido (o segmento) y el extremo 5' del mismo u otro oligonucleótido (o segmento). Estas enzimas a menudo se denominan ADN ligasas o ARN ligasas y utilizan cofactores: ATP (ADN ligasas eucariotas, virales y de arqueas) o NAD (ADN ligasas procariotas). A pesar de su presencia en todos los organismos, las ADN ligasas muestran una amplia diversidad de secuencias de aminoácidos, tamaños moleculares y propiedades (Nucleic Acids Research, 2000, vol. 28, n.º 21, 4051-4058). Habitualmente, son miembros de la clase de enzimas EC 6.5 según lo define la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, es decir, ligasas usadas para formar enlaces de éster fosfórico. Dentro del alcance de la invención, se encuentra una ligasa capaz de unir un oligonucleótido no modificado a otro oligonucleótido no modificado, una ligasa capaz de unir un oligonucleótido no modificado a un oligonucleótido modificado (es decir, un oligonucleótido 5' modificado a un oligonucleótido 3' no modificado, y/o un oligonucleótido 5' no modificado a un oligonucleótido 3' modificado), así como una ligasa capaz de unir un oligonucleótido modificado a otro oligonucleótido modificado.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “ligasa monocatenaria” o “ligasa mc” significa una enzima, por ejemplo, una ARN ligasa, que es capaz de catalizar el ligamiento dependiente de ATP de (i) ARN monocatenario fosforilado en 5' al 3'-OH de una hebra de ARN aceptora monocatenaria y (ii) el ligamiento de un solo residuo (incluyendo un residuo modificado), por ejemplo, un nucleótido-3',5'-bisfosfato, 3',5'-tiobisfosfato o 3'-fosfato-5'-tiofosfato, al extremo 3' del ARN o un oligonucleótido modificado (Modified Oligoribonucleotides: 17 (11), 2077-2081, 1978). Un ejemplo de una ligasa mc es la ARN ligasa de T4, que también se ha demostrado que funciona en sustratos de ADN en ciertas condiciones (Nucleic Acids research 7(2), 453-464, 1979). La función natural de la ARN ligasa de T4 en *Escherichia coli* infectada con el bacteriófago T4 es reparar los frenos monocatenarios al ARNt bacteriano provocados por los mecanismos de defensa bacterianos contra el ataque viral. Dentro del alcance de la invención se encuentra una ligasa mc capaz de unir un nucleótido no modificado a un oligonucleótido no modificado, una ligasa mc capaz de unir un nucleótido no modificado a un oligonucleótido modificado, una ligasa mc capaz de unir un nucleótido modificado a un oligonucleótido no modificado, así como una ligasa mc capaz de unir un nucleótido modificado a un oligonucleótido modificado. Una ligasa mc según la invención es una ligasa que no requiere un oligonucleótido molde para que se produzca el ligamiento, es decir, la

actividad de ligamiento de la ligasa es independiente del molde.

5 Tal como se usa en el presente documento, una “ligasa termoestable” es una ligasa que es activa a temperaturas elevadas, es decir, por encima de la temperatura del cuerpo humano, es decir, por encima de 37 °C. Una ligasa termoestable puede ser activa, por ejemplo, a 40 °C - 65 °C; o 40 °C - 90 °C; y así sucesivamente.

10 Tal como se usa en el presente documento, una “transferasa” significa una enzima que cataliza la unión independiente del molde de un nucleótido a otro nucleótido u oligonucleótido. Una transferasa tal como se describe en el presente documento incluye una nucleotidil transferasa terminal (TdT), también conocida como ADN nucleotidilxotransferasa (DNNT) o transferasa terminal. La TdT es una ADN polimerasa especializada que se expresa en células linfoides pre-B y pre-T inmaduras, donde permite la diversidad de unión del gen de anticuerpo V-D-J. TdT cataliza la adición de nucleótidos al extremo 3' de una molécula de ADN. Una transferasa tal como se describe en el presente documento incluye una TdT que no se produce de natural o mutante. Dentro del alcance de la invención se encuentra una transferasa capaz de unir un nucleótido no modificado a un oligonucleótido no modificado, una transferasa capaz de unir un nucleótido modificado a un oligonucleótido modificado, así como una transferasa capaz de unir un nucleótido modificado a un oligonucleótido modificado.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “fosfatasa” significa una enzima que cataliza la hidrólisis de un fosfoéster para producir un alcohol. La fosfatasa alcalina cataliza de manera no específica la desfosforilación de los extremos 5' y 3' del ADN y el ARN (y oligonucleótidos modificados) y también hidroliza trifosfatos de nucleótidos (NTP y dNTP) y es óptimamente activa en entornos de pH alcalino.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “endonucleasa específica de secuencia” o “endonucleasa específica de sitio” se usan indistintamente y significan una nucleasa que escinde específicamente un oligonucleótido monocatenario en una posición particular. Por ejemplo, la endonucleasa V escinde el ARN una base después de la inosina, es decir, en el segundo enlace fosfodiéster 3' con respecto a la inosina. Otros ejemplos de endonucleasas específicas de sitio incluyen la familia de meganucleasas, nucleasas con dedos de zinc, TALEN y Cas9.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “cebador” significa una secuencia de oligonucleótidos que se usa como punto de partida para sintetizar un oligonucleótido de segmento de la invención. Un cebador comprende al menos 3 nucleótidos y puede unirse a un material de soporte.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “residuo de nucleótido modificado” u “oligonucleótido modificado” significa un residuo de nucleótido u oligonucleótido que contiene al menos un aspecto de su química que difiere de un residuo de nucleótido u oligonucleótido que se produce de manera natural. Tales modificaciones pueden producirse en cualquier parte del residuo de nucleótido, por ejemplo, azúcar, base o fosfato. A continuación se dan a conocer ejemplos de modificaciones de nucleótidos.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término “ligasa modificada” significa una ligasa que difiere de una ligasa de “tipo natural” que se produce de manera natural en uno o más residuos de aminoácidos. Tales ligasas no se encuentran en la naturaleza. Tales ligasas son útiles en los procesos novedosos de la invención. A continuación se dan a conocer ejemplos de ligasas modificadas. Los términos “ligasa modificada” y “ligasa mutante” se usan indistintamente.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “transferasa modificada” significa una transferasa que difiere de una transferasa de “tipo natural” que se produce de manera natural en uno o más residuos de aminoácidos. Tales transferasas no se encuentran en la naturaleza. Tales transferasas son útiles en los procesos novedosos de la invención. Los términos “transferasa modificada” y “transferasa mutante” se usan indistintamente.

55 Tal como se usa en el presente documento, el término “gapmero” significa un oligonucleótido que tiene un “segmento de hueco” interno flanqueado por dos “segmentos de ala” externos, en donde el segmento de hueco consiste en una pluralidad de nucleótidos que soportan la escisión de ARNasa H y cada segmento de ala consiste en uno o más nucleótidos que son químicamente distintos a los nucleótidos dentro del segmento de hueco.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término “material de soporte” significa un compuesto o material de alto peso molecular que aumenta el peso molecular de un oligonucleótido, por ejemplo, el molde o el cebador, permitiendo de ese modo que se conserve, por ejemplo, cuando las impurezas y los productos se separan de la mezcla de reacción.

Tal como se usa en el presente documento, el “porcentaje de identidad” entre una secuencia de ácido nucleico de consulta y una secuencia de ácido nucleico sujeto es el valor de “identidades”, expresado como porcentaje, que se calcula mediante el algoritmo BLASTN cuando una secuencia de ácido nucleico sujeto tiene una cobertura de

consulta del 100 % con una secuencia de ácido nucleico de consulta después de realizar una alineación de BLASTN por parejas. Tales alineaciones de BLASTN por parejas entre una secuencia de ácido nucleico de consulta y una secuencia de ácido nucleico sujeto se realizan usando los parámetros por defecto del algoritmo BLASTN disponible en el sitio web del National Center for Biotechnology Institute con el filtro para regiones de baja complejidad desactivado. De manera importante, una secuencia de ácido nucleico de consulta puede describirse mediante una secuencia de ácido nucleico identificada en una o más reivindicaciones del presente documento. La secuencia de consulta puede ser el 100 % idéntica a la secuencia sujeto, o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de nucleótidos en comparación con la secuencia sujeto de manera que el % de identidad sea inferior al 100 %. Por ejemplo, la secuencia de consulta es al menos el 80, el 85, el 90, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99 % idéntica a la secuencia sujeto.

Declaración de la invención

En un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para producir un producto de oligonucleótido monocatenario, que tiene al menos un residuo de nucleótido modificado, comprendiendo dicho procedimiento:

- a) proporcionar un conjunto de oligonucleótidos (I) que comprende segmentos de la secuencia del producto, en el que al menos un segmento de la secuencia del producto contiene al menos un residuo de nucleótido modificado, y en el que cada segmento se ha producido mediante síntesis enzimática;
- b) proporcionar un oligonucleótido molde (II) complementario a la secuencia del producto de oligonucleótido monocatenario, teniendo dicho molde una propiedad que permite que se separe del producto y se recicle para su uso en futuras reacciones;
- c) poner en contacto (I) y (II) en condiciones para permitir el apareamiento de los oligonucleótidos de segmento con el oligonucleótido molde;
- d) unir los oligonucleótidos de segmento usando una ligasa para formar el producto;
- e) cambiar las condiciones para desnaturalizar el molde apareado y cualquier hebra de oligonucleótido de impureza, y separar las impurezas;
- f) cambiar las condiciones para desnaturalizar el molde apareado y las hebras de oligonucleótidos de producto, y separar el producto de oligonucleótido monocatenario; y
- g) reciclar el oligonucleótido molde para su uso en futuras reacciones.

En una realización de la invención, uno o más o todos los oligonucleótidos de segmento se producen enzimáticamente.

En una realización de la invención, uno o más o todos los oligonucleótidos de segmento se producen usando una ligasa monocatenaria (ligasa mc). En una realización, la ligasa mc es una ARN ligasa. En una realización, la ligasa mc es una ARN ligasa de T4 o ARN ligasa de T4 modificada.

En otra realización, el procedimiento para producir un oligonucleótido de segmento usando una ligasa mc comprende:

- (i) añadir un nucleótido, un dinucleótido, un trinucleótido o un tetranucleótido; que tiene un resto o bien fosfato, tiofosfato o bien ditiofosfato en el extremo 3'; y un resto o bien fosfato, tiofosfato o bien ditiofosfato en el extremo 5'; al 3'-OH de un cebador de oligonucleótido monocatenario usando una ligasa mc;
- (ii) eliminar el resto 3'-fosfato, 3'-tiofosfato o 3'-ditiofosfato usando una fosfatasa;
- (iii) repetir las etapas (i) y (ii) para extender el oligonucleótido para producir la secuencia de segmento; y
- (iv) liberar el oligonucleótido de segmento del cebador de oligonucleótido usando una endonucleasa específica de secuencia.

En una realización de la invención, el procedimiento para producir un oligonucleótido de segmento, usando una ligasa mc, comprende añadir un 3',5'-nucleótido bisfosfato, que tiene uno o más de cualquiera de los oxígenos del fosfato sustituidos por azufre, al 3'-OH de un cebador de oligonucleótido monocatenario usando una ligasa mc en la etapa (i).

En una realización de la invención, el procedimiento para producir un oligonucleótido de segmento, usando una

- ligasa mc, comprende añadir un 3',5'-nucleótido-bisfosfato, un 3',5'-nucleótido-tiofosfato (por ejemplo 3',5'-bistiofosfato o 3'-fosfato-5'-tiofosfato o 3'-tiofosfato-5'-fosfato) o un 3',5'-nucleótido-ditiofosfato (por ejemplo 3',5'-bisditiofosfato o 3'-fosfato-5'-ditiofosfato o 3'-ditiofosfato-5'-fosfato) al 3'-OH de un cebador de oligonucleótido monocatenario usando una ligasa mc en la etapa (i).
- 5 En una realización de la invención, se producen uno o más oligonucleótidos de segmento usando una transferasa. En una realización de la invención, el procedimiento para producir un oligonucleótido de segmento usando una transferasa comprende:
- 10 (i) añadir un nucleótido-5'-trifosfato, alfa-tiotrifosfato o alfaditiotrifosfato que tiene un grupo protector en su 3'-OH al 3'-OH de un cebador de oligonucleótido monocatenario usando una transferasa;
- (ii) desproteger la posición 3' para regenerar el 3'-OH;
- 15 (iii) repetir las etapas (i) y (ii) para extender el oligonucleótido para producir la secuencia de segmento;
- (iv) liberar el oligonucleótido de segmento del cebador de oligonucleótido usando una endonucleasa específica de secuencia.
- 20 En una realización de la invención, cada segmento se produce mediante síntesis enzimática. En una realización de la invención, cada segmento se produce usando una ligasa mc. En una realización de la invención, cada segmento se produce usando una transferasa.
- El uso de una ligasa mc, por ejemplo una ARN ligasa, una transferasa o cualquier otra enzima que sea capaz de
- 25 añadir un solo nucleótido a un oligonucleótido monocatenario, de una manera independiente del molde, permite la síntesis de un oligonucleótido con una secuencia definida. Un enfoque de este tipo podría usarse para producir el producto de oligonucleótido completo mediante la adición iterativa de bases individuales. Sin embargo, a menos que cada ciclo de síntesis discorra con un rendimiento del 100 %, se incorporarán errores de delección de secuencia en el producto final. Por ejemplo, si un oligonucleótido se extiende en un nucleótido con un rendimiento del 99 % en un ciclo de síntesis, el 1 % restante estará disponible para reaccionar en ciclos de síntesis posteriores pero el
- 30 producto formado será un nucleótido más corto que el producto deseado. A medida que el número de ciclos aumenta, entonces la tasa de error se acentúa de modo que, en este ejemplo, un rendimiento del ciclo del 99 % daría como resultado la formación de un 20 % de secuencias acortadas en una sola base para producción de un 20 meros.
- 35 Según la presente invención, la acumulación secuencial de errores se evita mediante lo siguiente. En primer lugar, solo se sintetizan secuencias cortas, normalmente de 5 a 8 nucleótidos de longitud, mediante la adición de nucleótidos individuales. Este procedimiento da como resultado secuencias cortas que tienen una mayor pureza que secuencias largas ya que se exponen a menos ciclos de acumulación de errores. En segundo lugar, estas
- 40 secuencias cortas se ensamblan en un molde de ADN complementario y luego se unen entre sí. El uso de un molde complementario conjuntamente con una ligasa garantiza que solo se ensamblen oligonucleótidos cortos que tienen tanto la longitud correcta como la secuencia correcta. Por consiguiente, los procedimientos de la invención dan como resultado tanto un rendimiento global superior como, de manera importante, una fidelidad de secuencia global superior.
- 45 Una realización de la invención proporciona un procedimiento tal como se describió anteriormente en el presente documento, mediante el cual la desnaturalización del dúplex de molde e impureza y/o la desnaturalización del dúplex de molde y producto da como resultado un aumento de temperatura. En una realización, la desnaturalización se produce como resultado del cambio del pH. En una realización adicional, la desnaturalización
- 50 se produce cambiando la concentración de sal en una disolución tamponante.
- Aun otra realización de la invención proporciona un procedimiento tal como se dio a conocer anteriormente en el presente documento, mediante el cual los oligonucleótidos de segmento tienen de 3 a 15 nucleótidos de longitud. En una realización adicional de la invención, los segmentos tienen de 5 a 10 nucleótidos de longitud. En una
- 55 realización adicional de la invención, los segmentos tienen de 5 a 8 nucleótidos de longitud. En una realización adicional de la invención, los segmentos tienen 4, 5, 6, 7 o 8 nucleótidos de longitud. En una realización particular, hay tres oligonucleótidos de segmento: un segmento 5' que tiene 7 nucleótidos de longitud, un segmento central que tiene 6 nucleótidos de longitud y un segmento 3' que tiene 7 nucleótidos de longitud, que cuando se ligan entre sí forman un oligonucleótido que tiene 20 nucleótidos de longitud (un "20 meros"). En una realización particular,
- 60 hay tres oligonucleótidos de segmento: un segmento 5' que tiene 6 nucleótidos de longitud, un segmento central que tiene 8 nucleótidos de longitud y un segmento 3' que tiene 6 nucleótidos de longitud, que cuando se ligan entre sí forman un oligonucleótido que tiene 20 nucleótidos de longitud (un "20 meros"). En una realización particular, hay tres oligonucleótidos de segmento: un segmento 5' que tiene 5 nucleótidos de longitud, un segmento central que tiene 10 nucleótidos de longitud y un segmento 3' que tiene 5 nucleótidos de longitud, que cuando se ligan

- entre sí forman un oligonucleótido que tiene 20 nucleótidos de longitud (un "20 meros"). En una realización particular, hay tres oligonucleótidos de segmento: un segmento 5' que tiene 4 nucleótidos de longitud, un segmento central que tiene 12 nucleótidos de longitud y un segmento 3' que tiene 4 nucleótidos de longitud, que cuando se ligan entre sí forman un oligonucleótido que tiene 20 nucleótidos de longitud (un "20 meros"). En una realización particular, hay cuatro oligonucleótidos de segmento: un segmento 5' que tiene 5 nucleótidos de longitud, un segmento central 5' que tiene 5 nucleótidos de longitud, un segmento central 3' que tiene 5 nucleótidos de longitud y un segmento 3' que tiene 5 nucleótidos de longitud, que cuando se ligan entre sí forman un oligonucleótido que tiene 20 nucleótidos de longitud (un "20 meros").
- Una realización de la invención proporciona un procedimiento tal como se describió anteriormente en el presente documento, mediante el cual el producto tiene de 10 a 200 nucleótidos de longitud. En una realización adicional de la invención, el producto tiene de 15 a 30 nucleótidos de longitud. En una realización de la invención, el producto tiene 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud. En una realización de la invención, el producto tiene 20 nucleótidos de longitud, un "20 meros". En una realización de la invención, el producto tiene 21 nucleótidos de longitud, un "21 meros". En una realización de la invención, el producto tiene 22 nucleótidos de longitud, un "22 meros". En una realización de la invención, el producto tiene 23 nucleótidos de longitud, un "23 meros". En una realización de la invención, el producto tiene 24 nucleótidos de longitud, un "24 meros". En una realización de la invención, el producto tiene 25 nucleótidos de longitud, un "25 meros". En una realización de la invención, el producto tiene 26 nucleótidos de longitud, un "26 meros". En una realización de la invención, el producto tiene 27 nucleótidos de longitud, un "27 meros". En una realización de la invención, el producto tiene 28 nucleótidos de longitud, un "28 meros". En una realización de la invención, el producto tiene 29 nucleótidos de longitud, un "29 meros". En una realización de la invención, el producto tiene 30 nucleótidos de longitud, un "30 meros".
- En una realización de la invención, el procedimiento es un procedimiento para producir un oligonucleótido terapéutico. En una realización de la invención, el procedimiento es un procedimiento para producir un oligonucleótido terapéutico monocatenario. En una realización de la invención, el procedimiento es un procedimiento para producir un oligonucleótido terapéutico bicatenario.
- Otra realización de la invención proporciona un procedimiento tal como se dio a conocer anteriormente en el presente documento, en el que la propiedad que permite que el molde se separe del producto es que el molde está unido a un material de soporte. En una realización adicional de la invención, el material de soporte es un material de soporte soluble. En aún una realización adicional de la invención, el material de soporte soluble se selecciona del grupo que consiste en: polietilenglicol, un polímero orgánico soluble, ADN, una proteína, un dendrímero, un polisacárido, un oligosacárido y un hidrato de carbono. En una realización de la invención, el material de soporte es polietilenglicol (PEG). En una realización adicional de la invención, el material de soporte es un material de soporte insoluble. En una realización adicional de la invención, el material de soporte es un material de soporte sólido. En aún una realización adicional, el material de soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en: una perla de vidrio, una perla polimérica, un soporte fibroso, una membrana, una perla recubierta con estreptavidina y celulosa. En una realización, el material de soporte sólido es una perla recubierta con estreptavidina. En una realización adicional, el material de soporte sólido forma parte del propio recipiente de reacción, por ejemplo una pared de reacción.
- Una realización de la invención proporciona un procedimiento tal como se dio a conocer anteriormente en el presente documento, en el que múltiples copias repetidas del molde se unen de una manera continua por medio de un solo punto de unión al material de soporte. Las múltiples copias repetidas del molde pueden estar separadas por un ligador, por ejemplo, tal como se muestra en la figura 3. Las múltiples copias repetidas del molde pueden ser repeticiones directas, es decir, no están separadas por un ligador.
- En otra realización de la invención, el molde se une al material de soporte en múltiples puntos de unión.
- Aún otra realización de la invención proporciona un procedimiento tal como se dio a conocer anteriormente en el presente documento, en el que la propiedad que permite que el molde se separe del producto es el peso molecular del molde. Por ejemplo, pueden estar presentes copias repetidas de la secuencia de molde en un solo oligonucleótido, con o sin una secuencia de ligador.
- Otra realización de la invención proporciona un procedimiento tal como se dio a conocer anteriormente en el presente documento, en el que el molde, o el molde y el material de soporte, se reciclan para su uso en futuras reacciones, por ejemplo tal como se detalla a continuación. Otra realización de la invención proporciona un procedimiento tal como se dio a conocer anteriormente en el presente documento, en el que la reacción se lleva a cabo usando un procedimiento de flujo continuo o semicontinuo, por ejemplo tal como se muestra en la figura 4 o la figura 5.
- En una realización de la invención, el procedimiento es para la fabricación a gran escala de oligonucleótidos, en particular oligonucleótidos terapéuticos. En el contexto de la presente invención, fabricación a gran escala de

oligonucleótidos significa fabricación a una escala mayor de o igual a 1 litro, por ejemplo el procedimiento se lleva a cabo en un reactor de 1 l o mayor. Alternativamente, o además, en el contexto de la presente invención, fabricación a gran escala de oligonucleótidos significa fabricación a escala de gramos del producto, en particular la producción de más de o igual a 10 gramos de producto. En una realización, el producto se produce a una escala de gramos o kilogramos y/o el procedimiento se lleva a cabo en un reactor de al menos 1 l. En una realización de la invención, la cantidad de producto de oligonucleótido producido está en una escala de gramos. En una realización de la invención, la cantidad de producto producido es mayor de o igual a: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 gramos. En una realización de la invención, la cantidad de producto de oligonucleótido producido es mayor de o igual a: 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 gramos. En una realización de la invención, la cantidad de producto de oligonucleótido producido es de 500 gramos o mayor. En una realización de la invención, el producto de oligonucleótido producido está en una escala de kilogramos. En una realización de la invención, la cantidad de producto de oligonucleótido producido es de 1 kg o más. En una realización de la invención, la cantidad de producto de oligonucleótido producido es mayor de o igual a: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 kg. En una realización de la invención, la cantidad de producto de oligonucleótido producido es mayor de o igual a: 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 kg.

En una realización de la invención, la cantidad de producto producido es de entre 10 gramos y 100 kg. En una realización de la invención, la cantidad de producto producido es de entre 10 gramos y 50 kg. En una realización de la invención, la cantidad de producto producido es de entre 100 gramos y 100 kg. En una realización de la invención, la cantidad de producto producido es de entre 100 gramos y 50 kg. En una realización de la invención, la cantidad de producto producido es de entre 500 gramos y 100 kg. En una realización de la invención, la cantidad de producto producido es de entre 500 gramos y 50 kg. En una realización de la invención, la cantidad de producto producido es de entre 1 kg y 50 kg. En una realización de la invención, la cantidad de producto producido es de entre 10 kg y 50 kg.

En una realización de la invención, la fabricación de oligonucleótidos tienen lugar a una escala mayor de o igual a: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 litros, por ejemplo en un reactor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 l. En una realización de la invención, la fabricación de oligonucleótidos tienen lugar a una escala mayor de o igual a: 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 litros, por ejemplo en un reactor de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 l. En una realización de la invención, la fabricación de oligonucleótidos tiene lugar a una escala mayor de o igual a: 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 litros, por ejemplo en un reactor de 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 l.

En una realización de la invención, el volumen del reactor es de aproximadamente 10.000 l, aproximadamente 5000 l, aproximadamente 2000 l, aproximadamente 1000 l, aproximadamente 500 l, aproximadamente 125 l, aproximadamente 50 l, aproximadamente 20 l, aproximadamente 10 l o aproximadamente 5 l.

En una realización de la invención, el volumen del reactor es de entre 5 y 10.000 l, entre 10 y 5000 l, entre 20 y 2000 l, o entre 50 y 1000 l.

Un oligonucleótido según la presente invención puede tener al menos una modificación de la estructura principal, y/o al menos una modificación de azúcar y/o al menos una modificación de base en comparación con un oligonucleótido a base de ARN o ADN.

En una realización de la invención, uno o más oligonucleótidos de segmento tienen al menos una modificación de la estructura principal, y/o al menos una modificación de azúcar y/o al menos una modificación de base en comparación con un oligonucleótido a base de ARN o ADN. En una realización, todos los oligonucleótidos de segmento tienen al menos una modificación de la estructura principal. En una realización, al menos uno de los segmentos tiene una estructura principal completamente modificada. En una realización, todos los segmentos tienen una estructura principal completamente modificada. En una realización, la estructura principal de todos los oligonucleótidos de segmento consiste en uniones fosforotioato. En una realización, dos o más de los segmentos tienen al menos una modificación de azúcar y/o al menos una modificación de base en comparación con un oligonucleótido a base de ARN o ADN. En una realización, los segmentos de "ala" comprenden al menos una modificación de azúcar. En una realización, los segmentos de "ala" consisten totalmente en azúcares modificados. En una realización, los segmentos de "ala" consisten totalmente en azúcares modificados con 2'-MOE.

Una realización de la invención proporciona un procedimiento tal como se dio a conocer anteriormente en el presente documento, en el que el producto contiene al menos 1 residuo de nucleótido modificado. En una realización adicional, la modificación es en la posición 2' del resto de azúcar.

Los oligonucleótidos usados en el procedimiento de la invención pueden incluir modificaciones de azúcar, es decir,

- una versión modificada del resto ribosilo, tal como ARN modificado con 2'-O tal como 2'-O-alquilo o 2'-O-alquilo (sustituido), por ejemplo 2'-O-metilo, 2'-O-(2-cianoetilo), 2'-O-(2-metoxi)etilo (2'-MOE), 2'-O-(2-tiometil)etilo, 2'-O-butililo, 2'-O-propargilo, 2'-O-alilo, 2'-O-(3-amino)propilo, 2'-O-(3-(dimetilamino)propilo), 2'-O-(2-amino)etilo, 2'-O-(2-(dimetilamino)etilo); 2'-desoxi (ADN); 2'-O-(haloalcoxi)metilo (Arai K. *et al.* Bioorg. Med. Chem. 2011, 21, 6285), por ejemplo 2'-O-(2-cloroetoxi)metilo (MCEM), 2'-O-(2,2-dicloroetoxi)metilo (DCEM); 2'-O-alcoxicarbonilo, por ejemplo 2'-O-[2-(metoxicarbonil)etilo] (MOCE), 2'-O-[2-(N-metilcarbamoil)etilo] (MCE), 2'-O-[2-(N,N-dimetilcarbamoil)etilo] (DCME); 2'-halo, por ejemplo 2'-F, FANA (ácido nucleico de arabinosilo 2'-F); modificaciones de carbazúcar y azazúcar; 3'-O-alquilo por ejemplo 3'-O-metilo, 3'-O-butililo, 3'-O-propargilo; y sus derivados.
- 10 En una realización de la invención, la modificación de azúcar se selecciona del grupo que consiste en 2'-fluoro (2'-F), 2'-O-metilo (2'-OMe), 2'-O-metoxietilo (2'-MOE) y 2'-amino. En aún una realización adicional, la modificación es 2'-MOE.
- 15 Otras modificaciones de azúcar incluyen ácido nucleico "con puente" o "bicíclico" (BNA), por ejemplo ácido nucleico bloqueado (LNA), xilo-LNA, α -L-LNA, β -D-LNA, cEt (2'-O,4'-C etilo restringido) LNA, cMOEt (2'-O,4'-C metoxietilo restringido) LNA, ácido nucleico con puente de etileno (ENA), ADN triciclo; ácido nucleico desbloqueado (UNA); ácido nucleico de ciclohexenilo (CeNA), ácido nucleico de altrial (ANA), ácido nucleico de hexitol (HNA), HNA fluorado (F-HNA), piranosil-ARN (p-ARN), 3'-desoxipiranosil-ADN (p-ADN); morfolino (como por ejemplo en PMO, PPMO, PMOPlus, PMO-X); y sus derivados.
- 20 Los oligonucleótidos usados en el procedimiento de la invención pueden incluir otras modificaciones, tales como ácido nucleico de base peptídica (PNA), PNA modificado con boro, ácido nucleico de oxi-peptido basado en pirrolidina (POPNA), ácido nucleico basado en glicol o glicerol (GNA), ácido nucleico basado en treosa (TNA), ácido nucleico basado en treoninol acíclico (aTNA), oligonucleótidos con bases y estructuras principales integradas (ONIB), oligonucleótidos de pirrolidin-amida (POM); y sus derivados.
- 25 En una realización de la invención, el oligonucleótido modificado comprende un oligómero de fosfordiamidato morfolino (PMO), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico con puente (BNA) tal como (S)-cEt-BNA o un SPIEGELMER.
- 30 En una realización adicional, la modificación está en la nucleobase. Las modificaciones de bases incluyen versiones modificadas de las bases de purina y pirimidina naturales (por ejemplo, adenina, uracilo, guanina, citosina y timina), tales como inosina, hipoxantina, ácido orótico, agmatidina, lisidina, 2-tiopirimidina (por ejemplo, 2-tiouracilo, 2-tiotimina), G-clamp y sus derivados, pirimidina sustituida en 5 (por ejemplo 5-metilcitosina, 5-metiluracilo, 5-halouracilo, 5-propiniluracilo, 5-propinilcitosina, 5-aminometiluracilo, 5-hidroximetiluracilo, 5-aminometilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, Super T), 2,6-diaminopurina, 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, 7-aza-2,6-diaminopurina, 8-aza-7-deazaguanina, 8-aza-7-deazaadenina, 8-aza-7-deaza-2,6-diaminopurina, Super G, Super A y N4-etilcitosina, o derivados de los mismos; N²-ciclopentilguanina (cPent-G), N²-ciclopentil-2-aminopurina (cPent-AP) y N²-propil-2-aminopurina (Pr-AP), o derivados de las mismas; y bases degeneradas o universales, como 2,6-difluorotolueno o bases ausentes como sitios abásicos (por ejemplo 1-desoxirribosa, 1,2-didesoxirribosa, 1-desoxi-2-O-metilribosa; o derivados de pirrolidina en los que el oxígeno del anillo se ha reemplazado por nitrógeno (azarribosa)). Pueden encontrarse ejemplos de derivados de Super A, Super G y Super T en el documento US6683173. Se demostró que cPent-G, cPent-AP y Pr-AP reducían los efectos inmunoestimuladores cuando se incorporaban en ARNip (Peacock H. *et al.* J. Am. Chem. Soc. (2011), 133, 9200).
- 45 En una realización de la invención, la modificación de nucleobase se selecciona del grupo que consiste en 5-metilpirimidinas, 7-deazaguanosinas y nucleótidos abásicos. En una realización, la modificación es una 5-metilcitosina.
- 50 Los oligonucleótidos usados en el procedimiento de esta invención pueden incluir una modificación de la estructura principal, por ejemplo una versión modificada el fosfodiéster presente en el ARN, tal como fosforotioato (PS), fosforoditioato (PS2), fosfonoacetato (PACE), fosfonoacetamida (PACA), tiofosfonoacetato, tiofosfonoacetamida, profármaco de fosforotioato, H-fosfonato, metilfosfonato, metilfosfonotioato, metilfosfato, metilfosforotioato, etilfosfato, etilfosforotioato, boranofosfato, boranofosforotioato, metilboranofosfato, metilboranofosforotioato, metilboranofosfonato, metilboranofosfonotioato, y sus derivados. Otra modificación incluye fosforamidita, fosforamidato, N3'→P5' fosforamidato, fosfordiamidato, fosfortiodiamidato, sulfamato, dimetilsulfóxido, sulfonato, triazol, oxalilo, carbamato, metilnimino (MMI) y ácido nucleico de tioacetamido (TANA); y sus derivados.
- 55 En una realización adicional, la modificación está en la estructura principal y se selecciona del grupo que consiste en: fosforotioato (PS), fosforamidato (PA) y fosfordiamidato. En una realización de la invención, el oligonucleótido modificado es un oligómero de fosfordiamidato morfolino (PMO). Un PMO tiene una estructura principal de anillos de metilniminololona con uniones de fosfordiamidato. En una realización de la invención, el producto tiene una estructura principal de fosforotioato (PS).
- 60

En una realización de la invención, el oligonucleótido comprende una combinación de dos o más modificaciones tal como se dio a conocer anteriormente. Un experto en la técnica apreciará que hay muchos derivados sintéticos de oligonucleótidos.

5 En una realización de la invención, el producto es un gapmero. En una realización de la invención, los segmentos de ala comprenden modificaciones de la estructura principal y de azúcar y el segmento central o 'hueco' comprende modificaciones de la estructura principal, pero no modificaciones de azúcar. En una realización de la invención, las alas 5' y 3' del gapmero comprenden o consisten en nucleótidos modificados con 2'-MOE. En una realización de la invención, el segmento de hueco del gapmero comprende o consiste en nucleótidos que contienen hidrógeno en la posición 2' del resto de azúcar, es decir, es similar al ADN. En una realización de la invención, las alas 5' y 3' del gapmero consisten en nucleótidos modificados con 2'MOE y el segmento de hueco del gapmero consiste en nucleótidos que contienen hidrógeno en la posición 2' del resto de azúcar (es decir, desoxinucleótidos). En una realización de la invención, las alas 5' y 3' del gapmero consisten en nucleótidos modificados con 2'MOE y el segmento de hueco del gapmero consiste en nucleótidos que contienen hidrógeno en la posición 2' del resto de azúcar (es decir, desoxinucleótidos) y las uniones entre todos los nucleótidos son uniones de fosforotioato.

Una realización de la invención proporciona un procedimiento tal como se describió anteriormente en el presente documento, en el que el producto resultante es tiene una pureza mayor del 90 %. En una realización adicional, el producto tiene una pureza mayor del 95 %. En una realización adicional, el producto tiene una pureza mayor del 96 %. En una realización adicional, el producto tiene una pureza mayor del 97 %. En una realización adicional, el producto el producto tiene una pureza mayor del 98 %. En una realización adicional, el producto tiene una pureza mayor del 99 % pure. La pureza de un oligonucleótido puede determinarse usando cualquier método adecuado, por ejemplo cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) o espectrometría de masas (EM), en particular, cromatografía de líquidos-EM (CL-EM), HPLC-EM o electroforesis capilar-espectrometría de masas (CEEM).

En una realización de la invención, el oligonucleótido producido es un oligonucleótido antisentido. En una realización de la invención, el oligonucleótido producido es un aptámero. En una realización de la invención, el oligonucleótido producido es un miARN. En una realización de la invención, el producto es un oligonucleótido terapéutico.

En una realización de la invención, no hay sustancialmente nucleótidos en el recipiente de reacción para ligar los segmentos. En una realización de la invención, no hay nucleótidos en el recipiente de reacción para ligar los segmentos. En otra realización de la invención, el recipiente de reacción para ligar los segmentos no comprende un conjunto de nucleótidos, es decir, la reacción está de sustancialmente libre a completamente libre de nucleótidos.

La invención dada a conocer en el presente documento utiliza las propiedades de oligonucleótidos para proporcionar un procedimiento mejorado para su producción. Al proporcionar un oligonucleótido molde con el 100 % de complementariedad con la secuencia diana, y al controlar las condiciones de reacción de modo que el producto pueda liberarse y separarse en condiciones específicas, puede obtenerse un producto con un alto grado de pureza.

Desnaturalización del dúplex de producto (o impureza):molde y separación del producto (o impureza) del molde

La liberación del producto (o cualquier impureza) del molde requiere que se rompa el apareamiento de bases de Watson-Crick entre la hebra del oligonucleótido molde y el producto (o impureza) (es decir, desnaturalización del dúplex). El producto (o impureza) puede separarse entonces del molde, lo que puede producirse como dos etapas separadas, o como una etapa combinada.

La liberación y separación del producto (o impureza) puede producirse como una etapa, si el procedimiento se lleva a cabo en un reactor de columna. La ejecución en un tampón que altera el pH o la concentración de sal, o que contiene un agente químico que altera el emparejamiento de bases (tal como formamida o urea) provocará la desnaturalización de las cadenas de oligonucleótidos y el producto (o impureza) se eluirá en el tampón.

Cuando el procedimiento se lleva a cabo en otros recipientes de reacción, la liberación y separación del producto (o impureza) puede producirse como un procedimiento de dos etapas. En primer lugar, los pares de bases de Watson-Crick se alteran para desnaturalizar las hebras y luego el producto (o impureza) se separa del molde, por ejemplo se retira del recipiente de reacción. Cuando la liberación y separación del producto se lleva a cabo como un procedimiento de dos etapas, la rotura de los pares de bases Watson-Crick puede lograrse alterando las condiciones del tampón (pH, sal) o introduciendo un agente químico disruptivo (formamida, urea). Alternativamente, elevar la temperatura también provocará la disociación de las dos hebras, es decir, la desnaturalización. El producto (o las impurezas) pueden separarse entonces (y también retirarse del recipiente de reacción, si se desea) por medio de métodos que incluyen separación basada en el peso molecular, separación

basada en la carga, separación basada en la hidrofobicidad, separación basada en secuencias específicas o una combinación de estos métodos.

5 Cuando el procedimiento se lleva a cabo en un reactor de flujo continuo o semicontinuo, la liberación y separación del producto (o impureza) puede ser en una o dos etapas. Por ejemplo, la liberación y separación del producto (o impureza) en una etapa podría verse afectada por el aumento de la temperatura para provocar la disociación de las dos hebras, y la separación de las hebras liberadas basándose en peso molecular en la misma parte del reactor que se usa para elevar la temperatura. La liberación y separación del producto (o impureza) en dos etapas podría verse afectada por el aumento de la temperatura para provocar la disociación de las dos hebras en una parte del reactor y la separación de las hebras liberadas basándose en el peso molecular en una parte diferente del reactor.

Liberación y separación específicas de las impurezas del molde, pero reteniendo el producto en el molde

15 Las impurezas surgen cuando se incorpora un nucleótido incorrecto en la hebra de oligonucleótido durante la extensión de la cadena, o cuando la reacción de extensión de la cadena termina antes de tiempo. Las impurezas también surgen cuando la reacción incluye el paso de ligar los oligonucleótidos de segmento y una o más de las etapas de ligamiento fallan. Los tipos de impurezas que pueden surgir se ilustran en la figura 6.

20 Las propiedades del apareamiento de bases de Watson-Crick pueden aprovecharse para liberar específicamente cualquier impureza unida al molde antes de la liberación del producto. Cada oligonucleótido bicatenario se disociará en condiciones específicas, y esas condiciones son diferentes para secuencias que no tienen un 100 % de complementariedad en comparación con secuencias con un 100 % de complementariedad. La determinación de tales condiciones está dentro del ámbito de competencia de un experto en la técnica.

25 Un modo común de desnaturalización de oligonucleótidos es elevando la temperatura. La temperatura a la que se disocian la mitad de los pares de bases, es decir, cuando el 50% del dúplex está en estado monocatenario, se denomina temperatura de fusión, T_m . El medio más confiable y preciso para determinar la temperatura de fusión es empíricamente. Sin embargo, esto es engorroso y no es necesario habitualmente. Pueden usarse varias fórmulas para calcular los valores de T_m (Nucleic Acids Research 1987, 15 (13): 5069-5083; PNAS 1986, 83 (11): 3746-3750; Biopolymers 1997, 44 (3): 217-239) y pueden encontrarse numerosas calculadoras de temperatura de fusión en línea, alojadas por proveedores de reactivos y universidades. Se sabe que, para una secuencia de oligonucleótidos dada, una variante con todas las uniones de fosforotioato se fundirá a una temperatura más baja que una variante con todas las uniones de fosfodiéster. El aumento del número de uniones de fosforotioato en un oligonucleótido tiende a disminuir la T_m del oligonucleótido para su objetivo previsto.

35 Para separar específicamente las impurezas de una mezcla de reacción, en primer lugar se calcula la temperatura de fusión del dúplex de producto:molde. Entonces, el recipiente de reacción se calienta hasta una primera temperatura, por ejemplo, una temperatura por debajo de la temperatura de fusión del dúplex de producto:molde, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 grados centígrados por debajo de la temperatura de fusión. Esta etapa de calentamiento provoca la desnaturalización de los oligonucleótidos que no son el producto, es decir, no son el 100% complementarios al molde, del molde. Entonces, estos oligonucleótidos desnaturalizados pueden retirarse del recipiente de reacción usando uno de los métodos dados a conocer anteriormente, por ejemplo, separación basada en el peso molecular, separación basada en la carga, separación basada en la hidrofobicidad, separación basada en secuencias específicas o una combinación de estos métodos. Entonces, el recipiente de reacción se elevará hasta una segunda temperatura más alta, por ejemplo, por encima de la temperatura de fusión calculada, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 grados centígrados por encima de la temperatura de fusión, para provocar la desnaturalización del producto del molde. Entonces, el producto puede separarse (y retirarse del recipiente de reacción) usando uno de los métodos descritos anteriormente, por ejemplo, separación basada en el peso molecular, separación basada en la carga, separación basada en la hidrofobicidad, separación basada en secuencias específicas o una combinación de estos métodos.

45 Puede usarse un procedimiento similar cuando el agente disruptivo es un agente que provoca un cambio en el pH o la concentración de sal o es un agente disruptivo químico. La concentración del agente disruptivo se aumenta hasta justo por debajo de la concentración a la que se disociaría el producto, para provocar la desnaturalización de los oligonucleótidos que no son el producto del molde. Entonces, estas impurezas pueden retirarse del recipiente de reacción usando uno de los métodos dados a conocer anteriormente. Entonces, se aumenta la concentración del agente disruptivo hasta por encima de la concentración a la que el producto se disocia del molde. Entonces, el producto puede retirarse del recipiente de reacción usando uno de los métodos dados a conocer anteriormente.

60 El producto obtenido de un procedimiento tal como se dio a conocer anteriormente tiene un alto grado de pureza sin necesidad de etapas de purificación adicionales. Por ejemplo, el producto obtenido tiene una pureza mayor del 95%.

Propiedades del molde

El molde requiere una propiedad que le permita quedar retenido en el recipiente de reacción cuando se retira el producto, para evitar que se convierta en una impureza en el producto. En otras palabras, el molde tiene propiedades que permiten separarlo del producto. En una realización de la invención, esta retención se logra acoplando el molde a un material de soporte. Este acoplamiento da como resultado un complejo molde-soporte que tiene un alto peso molecular y, por tanto, puede retenerse en el recipiente de reacción cuando se retiran las impurezas y el producto, por ejemplo, mediante filtración. El molde puede acoplarse a un material de soporte sólido, tal como perlas poliméricas, soportes fibrosos, membranas, perlas recubiertas con estreptavidina y celulosa. El molde también puede acoplarse a un material de soporte soluble tal como polietilenglicol, un polímero orgánico soluble, ADN, una proteína, un dendrímero, un polisacárido, un oligosacárido y un hidrato de carbono.

Cada material de soporte puede tener múltiples puntos donde puede unirse un molde, y cada punto de unión puede tener múltiples moldes unidos, por ejemplo, de la manera mostrada en la figura 3.

El molde puede tener un alto peso molecular por sí mismo, sin estar unido a un material de soporte, por ejemplo, puede ser una molécula con múltiples copias del molde, por ejemplo, separadas por un ligador, de la manera mostrada en la figura 3.

La capacidad de retener el molde en el recipiente de reacción también permite reciclar el molde para futuras reacciones, ya sea recuperándolo o usándolo en un proceso de flujo continuo o semicontinuo.

Métodos de separación del molde del producto (o impurezas)

Las propiedades del molde, tal como se dio a conocer anteriormente, permiten la separación del molde y el producto, o la separación del producto unido al molde y las impurezas. Pueden usarse separación basada en el peso molecular, separación basada en la carga, la separación basada en la hidrofobicidad, separación basada en secuencias específicas o una combinación de estos métodos.

En el caso de que el molde esté unido a un soporte sólido, la separación del molde del producto, o la separación de las impurezas del producto unido al molde, se logra lavando el soporte sólido en condiciones apropiadas, tal como resultaría evidente para un experto en la técnica. En los casos en los que el molde está acoplado a un soporte soluble o está compuesto por secuencias de molde repetidas, la separación del molde del producto o la separación del producto unido al molde de las impurezas puede lograrse por medio de una separación basada en el peso molecular, por ejemplo, usando técnicas tales como ultrafiltración o nanofiltración en las que el material del filtro se elige de modo que la molécula más grande quede retenida por el filtro y la molécula más pequeña pase a través. En los casos en los que una sola etapa de separación de impurezas del complejo molde-producto, o separación del producto del molde, no sea lo suficientemente eficiente, pueden emplearse múltiples etapas de filtración secuenciales para aumentar la eficiencia de separación y así generar un producto que cumpla con la pureza deseada.

Es deseable proporcionar un procedimiento para la separación de tales oligonucleótidos que sea eficiente y aplicable a escala de producción industrial. "Therapeutic oligonucleotides: The state of the art in purification technologies" Sanghvi *et al.* Current Opinion in Drug Discovery (2004) vol. 7 n.º 8 revisa los procedimientos usados para la purificación de oligonucleótidos.

El documento WO 01/55160 A1 da a conocer la purificación de oligonucleótidos mediante la formación de uniones de imina con contaminantes y luego eliminando las impurezas unidas a imina con cromatografía u otras técnicas. "Size Fractionation of DNA Fragments Ranging from 20 to 30000 Base Pairs by Liquid/Liquid chromatography" Muller *et al.* Eur. J. Biochem (1982) 128-238 da a conocer el uso de una columna sólida de celulosa microcristalina sobre la que se ha depositado una fase de PEG/dextrano para la separación de secuencias de nucleótidos. "Separation and identification of oligonucleotides by hydrophilic interaction chromatography". Easter *et al.* The Analyst (2010); 135(10) da a conocer la separación de oligonucleótidos usando una variante de HPLC que emplea una fase de soporte de sílice sólida. "Fractionation of oligonucleotides of yeast soluble ribonucleic acids by countercurrent Distribution" Doctor *et al.* Biochemistry (1965) 4(1) 49-54 da a conocer el uso de una columna sólida seca rellena con DEAE-celulosa seca. "Oligonucleotide composition of a yeast lysine transfer ribonucleic acid" Madison *et al.* Biochemistry, 1974, 13 (3) da a conocer el uso de cromatografía en fase sólida para la separación de secuencias de nucleótidos.

La cromatografía líquido-líquido es un método de separación conocido. "Countercurrent Chromatography The Support-Free Liquid Stationary Phase" Billardello, B.; Berthod, A; Wilson & Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry 38; Berthod, A., Ed.; Elsevier Science B.V.: Amsterdam (2002) págs. 177-200 proporciona una descripción general útil de la cromatografía líquido-líquido. Se conocen diversas técnicas de cromatografía líquido-

líquido. Una de tales técnicas es la cromatografía en contracorriente líquido-líquido (denominada en el presente documento "CCC"). Otra técnica conocida es la cromatografía de partición centrífuga (denominada en el presente documento "CPC").

- 5 Los métodos dados a conocer anteriormente y los métodos establecidos en el documento WO 2013/030263 pueden usarse para separar un oligonucleótido de producto, por ejemplo del molde y/o una impureza.

Ligasas para su uso en los procedimientos de la invención, es decir, etapa de ligamiento (d)

- 10 En una realización de la invención, la ligasa es una ligasa dependiente de ATP. Las ligasas dependientes de ATP oscilan en tamaño entre 30 y >100 kDa. En una realización de la invención, la ligasa es una ligasa dependiente de NAD. Las enzimas dependientes de NAD son altamente homólogas y son proteínas monoméricas de 70-80 kDa. En una realización de la invención, la ligasa es una ligasa termoestable. Una ligasa termoestable puede derivarse de una bacteria termófila.

- 15 En una realización de la invención, la ligasa es una ligasa dependiente de molde.

- En una realización de la invención, la ligasa es una ADN ligasa de fago CC31 de enterobacterias de tipo natural (SEQ ID NO: 6) o una ADN ligasa de fago Shf125875 de *Shigella* de tipo natural (SEQ ID NO: 8).

- 20 En una realización de la invención, la ligasa es una ligasa modificada. Por ejemplo, una ligasa modificada incluye una ADN ligasa de T4 modificada, una ligasa de fago CC31 de enterobacterias modificada, una ligasa de fago Shf125875 de *Shigella* modificada y una ligasa de *Chlorella* modificada.

- 25 En una realización, la ADN ligasa de T4 de tipo natural está modificada en la posición de aminoácido 368 o en la posición de aminoácido 371 de SEQ ID NO: 3.

- En una realización, la ligasa mutante comprende o consiste en SEQ ID NO: 3 en la que el aminoácido en la posición 368 es R o K.

- 30 En una realización, la ligasa mutante comprende o consiste en SEQ ID NO: 3 en la que el aminoácido en la posición 371 es uno cualquiera de los siguientes aminoácidos: L, K, Q, V, P, R.

- 35 En una realización, el/los residuo(s) correspondiente(s) dados a conocer anteriormente en relación con la ADN ligasa de T4 están mutados en una cualquiera de la ligasa de fago CC31 de enterobacterias, la ligasa de fago Shf125875 de *Shigella* y la ligasa de *Chlorella*. Se dan a conocer regiones conservadas de ADN ligasas en Chem. Rev. 2006, 106, 687-699 y Nucleic Acids Research, 2000, vol. 28, n.º 21, 4051-4058. En una realización, la ligasa está modifica en una región de ligador.

- 40 En una realización de la invención, la ligasa comprende o consiste en SEQ ID NO: 23 o una ligasa con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la misma, excluyendo una ligasa de tipo natural, por ejemplo ligasa de fago CC31 de enterobacterias.

- 45 En una realización de la invención, la ligasa comprende o consiste en una cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 10-28.

En una realización de la invención, la ligasa se inmoviliza, por ejemplo, sobre una perla.

Oligonucleótidos usados como materiales de partida

- 50 Los oligonucleótidos usados como material de partida para los procedimientos de la invención se describen en el presente documento como un "conjunto" y anteriormente se proporcionó una definición de los mismos. El conjunto es un grupo no homogéneo de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos que forman el conjunto se habrán producido mediante otros métodos de producción de oligonucleótidos, por ejemplo, síntesis enzimática y, por tanto, es probable que contenga impurezas.

- 55 El conjunto está compuesto por segmentos de los oligonucleótidos de producto, que luego se unen entre sí mientras se ensamblan en el molde. Cada segmento será un grupo no homogéneo con impurezas de diferentes longitudes y/o residuos incorporados incorrectamente.

- 60 **Producción de los oligonucleótidos de segmento usando enzimas**

1) Ligasa mc, por ejemplo ARN ligasa

La ligasa mc cataliza la adición impulsada por ATP de, por ejemplo, 3',5'-nucleótido-bisfosfatos, 3',5'-nucleótido-tiofosfatos (por ejemplo 3',5'-bistiofosfato o 3'-fosfato-5'-tiofosfato o 3'-tiofosfato-5'-fosfato) o 3',5'-nucleótido-ditiofosfatos (por ejemplo 3',5'-bisditiofosfato o 3'-fosfato-5'-ditiofosfato o 3'-ditiofosfato-5'-fosfato) al 3'-OH de un oligonucleótido corto (cebador) de manera independiente del molde. Un experto apreciaría que también pueden usarse difosfatos (o ditiofosfatos) o trifosfatos (u otros oligofosfatos en donde uno o más átomos de oxígeno se han sustituido por azufre) en la posición 3' del resto de azúcar, aunque los restos fosfato (o tiofosfato) adicionales no se requieren. Puede usarse un dinucleótido, trinucleótido o tetranucleótido modificado de manera equivalente en lugar de los nucleótidos individuales mencionados anteriormente. El cebador de oligonucleótido tiene habitualmente un mínimo de tres nucleótidos de longitud. El oligonucleótido resultante de esta reacción de adición es un nucleótido más largo que el oligonucleótido de partida (o dos, tres o cuatro nucleótidos más largo que el oligonucleótido de partida si se usa un dinucleótido, trinucleótido o tetranucleótido, respectivamente). La nueva posición 3' está ahora fosforilada. Con el fin de añadir un nucleótido posterior, el fosfato 3' del oligonucleótido en crecimiento se elimina para generar un 3'-OH mediante hidrólisis. Esta hidrólisis se realiza normalmente usando una enzima fosfatasa tal como se muestra en la figura 1.

2) Transferasa

Las enzimas desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) catalizan la adición de nucleótido trifosfatos protegidos en 3', por ejemplo, protegidos mediante un grupo 3'-O-azidometilo, 3'-aminoxilo o 3'-O-alilo, al 3'-OH de un oligonucleótido corto (cebador) de manera independiente del molde. Este cebador de oligonucleótido tiene habitualmente un mínimo de tres nucleótidos de longitud.

Se exponen métodos adecuados, por ejemplo, en los documentos EP2796552, US8808989, WO16128731 A1 y WO16139477 A1.

El oligonucleótido cebador usado en los métodos de ligasa mc y transferasa descritos anteriormente para producir oligonucleótidos de segmento puede:

- (1) quedar retenido como parte del oligonucleótido de segmento si se desea, o
- (2) escindirse del oligonucleótido de producto para permitir la separación del producto deseado y permitir la posibilidad de reciclaje para producir oligonucleótidos de segmento adicionales. La escisión del cebador del oligonucleótido de segmento puede realizarse usando una nucleasa específica de secuencia y un diseño apropiado del cebador y el segmento de manera que la escisión sea tanto eficaz como precisa.

EJEMPLOS

Abreviaturas

40	Ome	O-Metilo
	MOE	O-Metoxietilo (estructura principal de ADN) o metoxietilo (estructura principal de ARN)
	CBD	Dominio de unión a celulosa
45	HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
	PBS	Solución salina tamponada con fosfato
50	HAA	Acetato de hexilamonio
	SDS PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
	CLEM	Cromatografía de líquidos-espectrometría de masas
55	PO	Fosfodiéster
	DTT	Ditiotreitol
60	Ni-NTA	Níquel-ácido nitrilotriacético
	/3Phos/	Grupo 3'-fosfato
	/5Phos/	Grupo 5'-fosfato

	(p)	Grupo fosfato
5	PS o □	Fosforotioato
	/ideoxil/	2'-Desoxilinosina
	5mC	5-Metilcitosina
10	BSA	Albúmina sérica bovina
	LNA	Ácido nucleico bloqueado
15	WT	Tipo natural

Ejemplo 1: Ensamblaje de segmentos de oligonucleótidos (ADN) y ligamiento con ADN ligasa de T4 de tipo natural

1.1 Síntesis química de secuencias de partida y de control

Con el fin de demostrar que podrían ensamblarse múltiples oligonucleótidos cortos ("segmentos") en el orden correcto sobre una hebra molde complementaria y ligarse para dar el producto final deseado ("diana"), los segmentos, las secuencias de molde y diana, tal como se detalla en la tabla 1, se sintetizaron químicamente usando métodos convencionales.

1.2 Análisis de HPLC

Se llevó a cabo el análisis de HPLC usando una columna Agilent ZORBAX Eclipse Plus XDB-C18 (4,6 × 150 mm, 5 µm dp. Agilent P/N 993967-902) ejecutándose a 0,2 ml/min al tiempo que se monitorizó la absorbancia a 258 nm. Se mantuvo la columna a 60 °C. Se inyectaron 20 µl de muestra y se ejecutó un gradiente desde el 20-31 % de tampón B a lo largo de 20 minutos antes de aumentarse hasta el 80 % de tampón B durante 5 minutos.

Tampón A: 75 ml de HAA 1 M, 300 ml de alcohol isopropílico, 200 ml de acetonitrilo, 4425 ml de agua

35 Tampón B: 650 ml de alcohol isopropílico, 350 ml de acetonitrilo

Tabla 1

Nombre	Secuencia	% de pureza por HPLC	Cantidad (mg)
Segmento 5'	5'-GGC CAA-3'	100,0	21,6
Segmento central	5'-(p)ACC TCG GC-3'	96,9	58,1
Segmento 3'	5'-(p)T TAC CT-3'	98,8	39,8
Diana	5'-GGC CAA ACC TCG GCT TAC CT-3' (SEQ ID NO: 1)	98,4	101,7
Molde biotinilado	5'-biotina TT TAG GTA AGC CGA GGT TTG GCC-3' (SEQ ID NO: 2)	96,9	130,7
(p) fosfato			

40 1.3 Ensamblaje de oligonucleótido y método de ligamiento con ADN ligasa de T4 comercial (SEQ ID NO: 3)

El segmento 5', el segmento central y el segmento 3' se ensamblaron sobre el molde: cada segmento y el molde se disolvieron en agua a una concentración de 1 mg/ml y luego se mezclaron tal como sigue.

Segmento 5'	2 µl
Segmento central	2 µl
Segmento 3'	2 µl
Molde biotinilado	2 µl
H ₂ O	36 µl

45 Se incubó la disolución de oligonucleótidos combinados a 94 °C durante 5 minutos y se enfrió hasta 37 °C antes

de incubarse a 37 °C durante 5 minutos adicionales para permitir que los segmentos se aparearan con el molde. Entonces se añadieron 2 µl (equivalentes a 2 µg) de ADN ligasa de T4 (NEB) y 4 µl de 1 × tampón de ligamiento de ADN de T4 (NEB) y se incubó la reacción (volumen de reacción total 50 µl) a temperatura ambiente durante una hora. Después de esto, se añadieron 40 µl de perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina y se incubó la suspensión a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir que el molde biotinilado se uniera a las perlas de estreptavidina. Se lavaron las perlas de estreptavidina con 2 × 100 µl de PBS para eliminar los segmentos no unidos. Se analizó el lavado mediante HPLC. Entonces se incubó la mezcla de reacción a 94 °C durante 10 minutos para separar los productos de ligamiento unidos (o cualquier segmento unido) del molde antes de enfriarse rápidamente sobre hielo para ‘fundir’ el ADN y detener el reapareamiento de los productos de oligonucleótidos (o segmentos) con el molde. Entonces se llevó a cabo el análisis de la reacción de ligamiento mediante HPLC.

1.4 Ensamblaje de oligonucleótidos y método de ligamiento con suspensión de perlas de ADN ligasa de T4 interna

1.4.1 Generación de la suspensión de perlas

Se produjo ligasa de T4 (SEQ ID NO: 4) fusionada en el extremo N-terminal a un dominio de unión a celulosa (CBD) usando métodos de clonación, expresión y extracción convencionales. Esta secuencia de aminoácidos de ligasa de T4 difiere de la secuencia de ligasa de T4 comercial (SEQ ID NO: 3) en que la metionina N-terminal (M) se ha reemplazado por glicina y serina (GS). Estas sustituciones de aminoácidos se realizaron para ayudar en la generación y expresión de la proteína de fusión de CBD. La proteína de fusión de CBD-ligasa de T4 se expresó en células BL21 A1 (INVITROGEN). Se recogió el sobrenadante y se añadió a 600 µl de perlas PERLOZA 100 (PERLOZA) y se agitaron 26 °C durante 1 hora. Entonces se recogieron las perlas de celulosa PERLOZA y se lavaron con 2 ml de tampón (Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 200 mM, Tween 20 al 0,1 %, glicerol al 10 %) seguido por 5 ml de PBS y se resuspendieron finalmente en 200 µl de PBS (PO₄³⁻ 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM pH 7,4). Con el fin de analizar la expresión de proteínas, se mezclaron 15 µl de la suspensión de perlas PERLOZA con 5 µl de tampón de carga SDS y se incubaron a 80 °C durante 10 minutos antes de ejecutarse sobre un gel de gradiente de SDS PAGE (4 - 20 %) según un protocolo convencional.

1.4.2 Ensamblaje de oligonucleótidos y ligamiento usando una suspensión de perlas

Para ligasa de T4 unida a perlas PERLOZA, el método de ensamblaje y ligamiento en 1.3 anterior se modificó tal como sigue. En la mezcla de segmentos inicial, 36 µl de H₂O se redujeron a 8 µl de H₂O. Tras el apareamiento, se reemplazaron 2 µl de ADN ligasa de T4 comercial por 20 µl de suspensión de perlas PERLOZA. Antes de añadir las perlas magnéticas de estreptavidina, se centrifugaron las perlas PERLOZA y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron las perlas magnéticas de estreptavidina al sobrenadante y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir que el molde biotinilado se uniera a las perlas de estreptavidina.

1.5 Resultados y conclusiones

Los oligonucleótidos de producto, molde y los tres de segmento se resolvieron claramente en el cromatograma de control.

El análisis de HPLC de las reacciones de ligasa mostró que quedaban algunos segmentos de oligonucleótidos sin ligar, pero la ADN ligasa de T4 comercial (NEB) fue capaz de catalizar el ligamiento de los tres segmentos para generar el oligonucleótido de producto deseado (figura 7). La ADN ligasa de T4 unida a perlas PERLOZA parecía ser menos eficiente en el ligamiento de los segmentos de oligonucleótidos, apareciendo segmentos de oligonucleótidos tanto en la muestra de lavado de control como en la muestra de reacción (figura 8). Sin embargo, es difícil estar seguro de si se añadió la misma cantidad de enzima sobre las perlas en comparación con la enzima comercial, de modo que no fue posible una comparación directa de la eficiencia de ligamiento.

Ejemplo 2: Ensamblaje de segmentos de oligonucleótidos modificados con 2'-OMe ribosa y ligamiento con ADN ligasa de T4 de tipo natural

2.1 2'OMe en cada posición de nucleótido en cada segmento

Con el fin de determinar si la ADN ligasa de T4 era capaz de ligar segmentos de oligonucleótidos con modificación en la posición 2' del anillo de ribosa, se sintetizaron segmentos de oligonucleótidos con la misma secuencia que para el ejemplo 1, pero la posición 2' del anillo de ribosa se sustituyó con un grupo OMe grupo y la timidina se reemplazó por uridina tal como se muestra a continuación.

Tabla 2

Nombre	Secuencia	% de pureza por HPLC	Cantidad (mg)
Segmento 5' 2'-OMe	5'-GGC CAA-3'	21	97,8
Segmento central 2'-OMe	5'-(p)ACC UCG GC-3'	15,5	97,7
Segmento 3' 2'-OMe	5'-(p)U UAC CU-3'	21,2	98,1
2'-OMe diana	5'-GGC CAA ACC UCG GCU UAC CU-3' (SEQ ID NO: 5)	88	96,9
(p) = fosfato			

5 El ensamblaje, el ligamiento y el análisis de HPLC se llevaron a cabo usando los métodos del ejemplo 1, con tanto ligasa NEB comercial como fusión de ligasa de T4-CBD unida a perlas PERLOZA. La cantidad de agua usada en la mezcla de reacción para el experimento de ADN ligasa de T4 comercial (NEB) fue de 26 μ l, en vez de 36 μ l, de modo que el volumen de reacción final fue de 40 μ l. La cantidad de agua usada en la mezcla de reacción para el experimento de suspensión de perlas de ADN ligasa de T4 interna fue de 23 μ l, y la cantidad de perlas usada fue de 5 μ l, de modo que el volumen de reacción final fue también de 40 μ l. Se ejecutaron en paralelo experimentos de control usando ADN no modificado en contraposición a 2'-OMe ADN.

10 Los resultados de los experimentos de control fueron según el ejemplo 1. No se detectó producto usando HPLC para los experimentos de 2'-OMe, lo que indica que la ADN ligasa de T4 es incapaz de ligar segmentos de oligonucleótidos completamente modificados con 2'-OMe independientemente de si se usó una ADN ligasa de T4 comercial o una fusión de ADN ligasa de T4 interna-CBD unida a perlas PERLOZA.

15 2.2 2'-OMe en cada posición de nucleótido en un solo segmento

Usando una disolución de 1 mg/ml de cada oligonucleótido, se establecieron las reacciones tal como se detalla en la tabla 3.

20 Tabla 3

Experimento 1 (sin control de ligasa)	Experimento 2 (segmento-3' 2'-OMe individual)	Experimento 3 (segmento-5' 2'-OMe individual)	Experimento 4 (todos 2'-OMe)	Experimento 5 (todos sin modificar)	Volumen (μ l)
Molde	Molde	Molde	Molde	Molde	2
Segmento 5'	Segmento 5'	Segmento 5' sustituido con 2'-OMe'	Segmento 5' sustituido con 2'-OMe	Segmento 5'	2
Segmento 3'	Segmento 3' sustituido con 2'-OMe	Segmento 3'	Segmento 3' sustituido con 2'-OMe	Segmento 3'	2
Segmento central	Segmento central	Segmento central	Segmento central sustituido con 2'-OMe	Segmento central	2
H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	hasta 40 en total

25 El ensamblaje y el ligamiento se llevaron a cabo usando los métodos del ejemplo 1 con ligasa NEB comercial y ADN ligasa de T4 unida a PERLOZA interna.

30 Las reacciones se incubaron a 94 °C durante 5 minutos, seguido por incubación durante 5 minutos a 37 °C para permitir el apareamiento. Se añadieron 4 μ l de 1x tampón de ligamiento de ADN de T4 NEB a cada reacción junto con 5 μ l (aproximadamente 2 μ g) de ADN ligasa de T4 interna o 2 μ l (aproximadamente 2 μ g) e ADN ligasa de T4 comercial (aparte del experimento 1 que era un control sin ligasa) y se permitió que la reacción de ligamiento prosiguiera durante 2 horas a temperatura ambiente. Entonces se añadieron perlas magnéticas de estreptavidina a cada reacción y se calentaron las reacciones hasta 94 °C antes de enfriar rápidamente sobre hielo tal como se describe en el ejemplo 1 para separar el molde de los materiales y productos de partida.

35 Las reacciones procesadas se dividieron en dos: la mitad se analizaron mediante HPLC tal como se describió para el ejemplo 1 (sección 1.2). La otra mitad de la muestra se retuvo para espectrometría de masas para confirmar los resultados de HPLC.

El ligamiento de los segmentos de oligonucleótidos sin modificar (experimento 5) prosiguió tal como se esperaba

para producir el producto de longitud completa. Se observó una pequeña cantidad de ligamiento cuando el segmento 5' estaba sustituido con 2'-OMe (experimento 3) tal como se muestra en la figura 9, pero no se observó ligamiento cuando el segmento 3' estaba sustituido con 2'-OMe (experimento 2). No se observó producto significativo cuando los tres segmentos estaban sustituidos con 2'-OMe (experimento 4) según 2.1.

5

2.3 Conclusión

ADN ligasa de T4 de tipo natural produce un ligamiento deficiente de segmentos de oligonucleótidos sustituidos con 2'-OMe, pero es ligeramente menos sensible a la modificación del segmento de oligonucleótido 5' que el segmento 3'.

10

Ejemplo 3: Ensamblaje de segmentos de oligonucleótidos modificados con 2'-OMe ribosa y ligamiento con ligasas de tipo natural y mutantes

15

3.1 Materiales

Se produjeron ligasa de fago CC31 de enterobacterias de tipo natural (SEQ ID NO: 6), ligasa de fago Shf125875 de *Shigella* de tipo natural (SEQ ID NO: 8) y 10 ligasas de T4 mutantes de SEQ ID NO: 10-19, cada una fusionada en el extremo N-terminal a un CBD, usando métodos de clonación, expresión y extracción convencionales. Tal como se da a conocer en 1.4.1, con el fin de generar y expresar las proteínas de fusión de CBD, la metionina N-terminal (M) se reemplazó por glicina y serina (GS) en cada caso (por ejemplo SEQ ID NO: 7 para ligasa de fago CC31 de enterobacterias y SEQ ID NO: 9 para ligasa de fago Shf125875 de *Shigella*).

20

Se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos mediante métodos en fase sólida convencionales.

25

Tabla 4

Nombre	Secuencia	% de pureza por HPLC	Cantidad (mg)
Segmento 5' *	5'-(OMe)G(OMe)G(OMe)C(OMe)C(OMe)AA-3'	99,35	24,7
Segmento central	5'-(p)ACC TCG GC-3'	96,9	58,1
Segmento 3'	5'-(p)TTA CCT-3'	97,88	29,5
Molde biotinilado	5'-biotina TT TAG GTA AGC CGA GGT TTG GCC-3' (SEQ ID NO: 2)	96,9	130,7
N.B. OMe indica sustitución de 2'-metoxilo en el anillo de ribosa (p) = fosfato * obsérvese que los primeros 5 nucleótidos están modificados con 2'-OMe (GGCCA), pero la A final no			

30

3.2 Ensamblaje de oligonucleótidos y método de ligamiento con suspensiones de perlas de ligasa

3.2.1 Generación de la suspensión de perlas

Se unieron ligasas fusionadas a CBD a perlas PERLOZA tal como se describió en 1.4 para generar una suspensión de perlas.

35

3.2.2 Ensamblaje de oligonucleótidos y ligamiento usando una suspensión de perlas

Se prepararon reacciones de ligamiento con los componentes a continuación hasta un volumen final de 50 µl en una placa de 96 pocillos:

40

2 µl	segmento 5' (2'-OMe) ~1 mg/ml
2 µl	segmento central ~1 mg/ml
2 µl	segmento 3' ~1 mg/ml
2 µl	molde ~1 mg/ml
5 µl	tampón de ADN ligasa de T4 NEB
22 µl	H ₂ O
15 µl	suspensión de perlas unidas PERLOZA

Se incubó la reacción durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de la suspensión de perlas PERLOZA para permitir que los segmentos se aparearan con el molde. Se añadió suspensión de perlas PERLOZA

5 y se incubó la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de una hora de incubación, se transfirió la disolución a una placa de filtro ACOPREP advance 350 (PN 8082) y se colocó la placa de filtro encima de una superplaca ABGENE (Thermo Scientific, n.º AB-2800) y se centrifugó durante 10 minutos a 4.000 rpm para eliminar la suspensión de perlas PERLOZA. Entonces se analizaron las disoluciones mediante HPLC usando el método descrito en el ejemplo 1 (sección 1.2).

Cada ensamblaje y ligamiento de oligonucleótidos se repitió 6 veces para cada ligasa.

10 3.3 Resultados y conclusiones

15 La ligasa de fago CC31 de enterobacterias de tipo natural (SEQ ID NO: 6) y la ligasa de fago Shf125875 de *Shigella* de tipo natural (SEQ ID NO: 8) son capaces de ligar un segmento 5' sustituido con 2' OMe que contiene cinco nucleobases 2'-OMe y una desoxinucleobase con un segmento que contiene solo ADN no modificado. Además, mientras que la ADN ligasa de T4 de tipo natural (SEQ ID NO: 3 y 4) es deficiente en la realización de esta reacción, tal como se muestra en el ejemplo 2 y se reconfirma en este ejemplo, varias mutaciones en las posiciones 368 y 371 confieren la capacidad de ligar un segmento 5' sustituido con 2'-OMe que contiene cinco nucleobases 2' OMe y una desoxinucleobase con un segmento que contiene solo ADN no modificado en la ligasa (SEQ ID NO: 10-19).

20 Ejemplo 4: Ensamblaje de segmentos de oligonucleótidos modificados con 2' MOE ribosa y modificados con 5-metilpirimidina y ligamiento con ADN ligasas mutantes

4.1 Materiales

25 Se sintetizaron segmentos de oligonucleótidos modificados tal como se establece en la tabla 5 a continuación mediante métodos basados en fase sólida convencionales.

Tabla 5

Segmento	Secuencia	PM	Masa (mg)	% de pureza
Segmento central	5'-(p)dCdCdTdCdGdG-3'	2044,122	39	98,96
Segmento 3' MOE	5'-(p)dCdTmTmAmCmCmT-3'	2699,679	52	97,79
Segmento 5' MOE	5'-mGmGmCmCmAdAdA-3'	2644,771	48	99,13
(p) = fosfato, mX = bases MOE, dX = bases de ADN todas 5-metilpirimidinas				

30 Se fusionaron ADN ligasas mutantes (SEQ ID NO: 20-28) basadas en ligasa de fago CC31 de enterobacterias de tipo natural, ligasa de T4 de tipo natural y ligasa de fago Shf125875 de *Shigella* de tipo natural cada una en el extremo N-terminal a un dominio de unión a celulosa (CBD), usando métodos de clonación, expresión y extracción convencionales. Las ligasas fusionadas a CBD se unieron a perlas PERLOZA tal como se describió en 1.4 para generar una suspensión de perlas. Con el fin de liberar las ligasas de las perlas PERLOZA, se añadieron 2 µl de proteasa TEV a la suspensión y se incubaron durante la noche a 4 °C. La proteína escindida, que carece ahora del dominio de unión a celulosa, se recogió mediante centrifugación durante 10 min a 4000 rpm.

4.2 Método

40 Se estableció la reacción tal como sigue:

Segmento central	20 µM final
Segmento 3' MOE	20 µM final
Segmento 5' MOE	20 µM final
Molde	20 µM final
Tampón de ADN ligasa de T4 NEB	5 µl
ADN ligasa mutante	15 µl
H ₂ O	Para preparar el volumen de reacción final de 50 µl

45 Se mezclaron todos los componentes y se agitaron con vórtex antes de la adición de la ADN ligasa. Se incubaron las reacciones durante 1 hora a 35 °C. Después de 1 hora, se detuvieron las reacciones calentando a 95 °C durante 5 minutos en un bloque de PCR.

Se analizaron las muestras mediante tanto HPLC como CLEM para confirmar la identidad del producto según el

protocolo de HPLC usado en el ejemplo 1 (sección 1.2). Se incluyeron controles de ADN ligasa de T4 NEB comercial y un control negativo (H₂O en lugar de cualquier ligasa).

4.3 Resultados y conclusiones

5 La figura 10 muestra los trazos de HPLC para la reacción de control y la reacción catalizada por SEQ ID NO: 23 (clon A4 - ligasa de fago CC31 de enterobacterias mutante). El producto y el molde se eluyen conjuntamente usando este método de HPLC de modo que el producto aparece como un aumento en el área de pico del pico del producto + molde. En el trazo de la ligasa mutante (b) no solo aumenta el pico del producto + molde, sino que
10 aparecen dos nuevos picos a los 10,3 y 11,2 minutos. Estos picos corresponden al ligamiento del segmento central con o bien el segmento 5' MOE o bien el segmento 3' MOE. Además, los picos del segmento de entrada son sustancialmente más pequeños que el control en línea con el aumento de los picos intermedios y de producto. El trazo de la ligasa de T4 comercial NEB (a) mostró un ligero aumento en el área de pico para el molde + producto, una pequeña cantidad de producto de ligamiento intermedio junto con una disminución concomitante en segmentos de oligonucleótidos de entrada. La ligasa mutante (SEQ ID NO: 23), sin embargo, mostró un área de pico de producto + molde sustancialmente mayor y una reducción concomitante en las áreas de pico para segmentos de oligonucleótidos de entrada. Por tanto, la ligasa mutante (SEQ ID NO: 23) es una ligasa mucho más eficaz para los segmentos sustituidos con 2' MOE que la ADN ligasa de T4 comercial. Se mostraron mejoras similares para las otras ligasas mutantes (SEQ ID NO: 20, 21, 24-28).

Ejemplo 5: Efecto de un apareamiento de nucleótidos diferente en el sitio de ligamiento

5.1 Materiales

25 Se produjo ligasa de fago CC31 de enterobacterias mutante (SEQ ID NO: 23) fusionada en el extremo N-terminal con un dominio de unión a celulosa (CBD) usando métodos de clonación, expresión y extracción convencionales. La proteína de fusión de CBD-ligasa de fago CC31 de enterobacterias mutante extraída se añadió a 25 ml de perlas de celulosa PERLOZA 100 (PERLOZA) y se agitó a 20 °C durante 1 hora. Entonces, se recogieron las perlas PERLOZA y lavaron con 250 ml de tampón (Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 200 mM, Tween 20 al 0,1 %, glicerol al 10 %) seguido por 250 ml de PBS y finalmente se resuspendieron en 10 ml de PBS (PO₄³⁻ 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM pH 7,4). Con el fin de analizar la expresión de proteínas, se mezclaron 15 µl de la suspensión de perlas PERLOZA con 5 µl de tampón de carga SDS y se incubaron a 80 °C durante 10 minutos antes de procesarlos en un gel de gradiente de SDS PAGE (4 - 20 %) según un protocolo convencional. Para la liberación de la ligasa de las perlas, se añadieron 70 µl de proteasa TEV y se incubaron durante la noche a 4 °C con agitación. La ligasa se recogió lavando las perlas digeridas con 80 ml de PBS. Entonces, se concentró la ligasa hasta 1,2 ml usando un filtro Amicon de MCO de 30 Kd.

Los siguientes oligonucleótidos molde de ADN biotinilados (tabla 6) y oligonucleótidos de segmento de ADN (tabla 7) se sintetizaron mediante métodos en fase sólida convencionales. Obsérvese que los nucleótidos en **negrita** son los presentes en el sitio de ligamiento (es decir, los nucleótidos que se unieron en la reacción de ligamiento - tabla 7; y los nucleótidos que son complementarios a los que se unieron por medio de la reacción de ligamiento - tabla 6).

Tabla 6:

Número de molde	Secuencia (los nucleótidos complementarios a los nucleótidos de unión están en negrita)	SEQ ID NO
1	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG ACT GAGGC-3'	30
2	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG AGT GAGGC-3'	31
3	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG ATT GAGGC-3'	32
4	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG AAT GAGGC-3'	33
5	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG TCT GAGGC-3'	34
6	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG TGT GAGGC-3'	35
7	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG TTT GAGGC-3'	36
8	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG TAT GAGGC -3'	37
9	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG CCT GAGGC-3'	38
10	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG CGT GAGGC-3'	39
11	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG CTT GAGGC-3'	40
12	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG CAT GAGGC-3'	41

13	5'-biotina TTTGGTGCGAAGCAGGCTGAGGC-3'	42
14	5'-biotina TTTGGTGCGAAGCAGGGTGAGGC-3'	43
15	5'-biotina TTTGGTGCGAAGCAGGTTGAGGC-3'	44
16	5'-biotina TTTGGTGCGAAGCAGGATGAGGC-3'	45

Tabla 7

Segmento	Identificador	Secuencia (los nucleótidos de unión están en negrita)
5'	A	5'-GCCTCAG-3'
5'	B	5'-GCCTCAC-3'
5'	C	5'-GCCTCAA-3'
5'	D	5'-GCCTCAT-3'
3'	E	5'-(p)TCTGCT-3'
3'	F	5'-(p)ACTGCT-3'
3'	G	5'-(p)CCTGCT-3'
3'	H	5'-(p)GCTGCT-3'

(p) = fosfato

- 5 N.B. Obsérvese que, a diferencia de los ejemplos previos, las reacciones de ligamiento en este ejemplo implican la unión de dos segmentos entre sí: un segmento 5' y un segmento 3', es decir, no hay segmento central.

5.2 Método

- 10 Se establecieron las reacciones tal como sigue:

Tabla 8

Molde	Segmento 5'	Segmento 3'
1	A	E
2	B	E
3	C	E
4	D	E
5	A	F
6	B	F
7	C	F
8	D	F
9	A	H
10	B	H
11	C	H
12	D	H
13	A	G
14	B	G
15	C	G
16	D	G

- 15 Por cada 50 µl de reacción:

Segmento 3' (disolución madre 1 mM, 20 µM final)	1 µl
Segmento 5' (disolución madre 1 mM, 20 µM final)	1 µl
Molde (disolución madre 1 mM, 20 µM final)	1 µl

ES 2 914 591 T3

Tampón de ADN ligasa NEB (para ligasa de T4)	5 µl
ADN ligasa de CC31 mutante (disolución madre 0,45 mM, 90 µM final)	10 µl
H ₂ O	hasta 50 µl

Se incubó cada mezcla de reacción a 35 °C durante tanto 30 minutos como 1 hora. Cada reacción se terminó calentando a 95 °C durante 5 minutos. Se llevó a cabo el análisis de HPLC.

5 5.3 Resultados y conclusiones

Todas las reacciones produjeron un pico de producto después de 1 hora de incubación en el análisis de HPLC. Por consiguiente, el método de ligamiento funciona para todas las combinaciones de nucleótidos en las uniones que van a unirse. Es posible una optimización para mejorar el rendimiento del producto, pero no fue necesario ya que los resultados fueron concluyentes y quedó claro que la reacción funcionaba para todas las combinaciones de nucleótidos en las uniones que iban a unirse.

Ejemplo 6: Efecto de diferentes modificaciones en el sitio de ligamiento

15 6.1 Materiales

Se produjo ligasa de fago CC31 de enterobacterias mutante (SEQ ID NO: 23) tal como se describió en 5.1 y se adquirió ADN ligasa de virus de *Chlorella* (SEQ ID NO: 29, comercialmente disponible como ligasa SplintR, NEB).

20 Se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos de segmento y oligonucleótido molde biotinilado (tabla 9) mediante métodos en fase sólida convencionales.

Tabla 9

Nombre	Secuencia (modificación de la unión en negrita)
Molde	5'-biotina TTTAGGTAAGCCGAGGTTTGGCC-3' (SEQ ID NO: 2)
Segmento 5' (WT)	5'-GGCCAAA-3'
Segmento 5' (Mo1)	5'-GGCCAA(OMe)A-3'
Segmento 5' (Mo2)	5'-GGCCAA(F)A-3'
Segmento central (WT)	5'-(p)CCTCGG-3'
Segmento central (Mo4A)	5'-(p)(OMe)CCTCGG-3'
Segmento central (Mo5A)	5'-(p)(F)CCTCGG-3'
Segmento central (Mo7)	5'(p)(Me)CCTCGG-3'
Segmento 3' (WT)	5'-(p)CTTACCT-3'
Segmento 3' (Mo8)	5'-(p)(Me)CTTACCT3'
OMe indica sustitución de 2' metoxi en el anillo de ribosa F indica sustitución de 2' fluoro en el anillo de ribosa Todos los residuos de azúcar restantes son residuos de desoxirribosa Me indica 5-metilcitosinas	

25

6.2 Método

Se establecieron las reacciones tal como sigue:

30

Tabla 10

Reacción	Segmento 5'	Segmento central	Segmento 3'
1	WT	WT	WT
2	WT	Mo4A	WT
3	WT	Mo5A	WT
4	WT	Mo7	WT
5	Mo1	WT	WT
6	Mo1	Mo4A	WT

ES 2 914 591 T3

7	Mo1	Mo5A	WT
8	Mo1	Mo7	WT
9	Mo2	WT	WT
10	Mo2	Mo4A	WT
11	Mo2	Mo5A	WT
12	Mo2	Mo7	WT
13	WT	WT	Mo8
14	WT	Mo4A	Mo8
15	WT	Mo5A	Mo8
16	WT	Mo7	Mo8
17	Mo1	WT	Mo8
18	Mo1	Mo4A	Mo8
19	Mo1	Mo5A	Mo8
20	Mo1	Mo7	Mo8
21	Mo2	WT	Mo8
22	Mo2	Mo4A	Mo8
23	Mo2	Mo5A	Mo8
24	Mo2	Mo7	Mo8

Por cada 50 µl de reacción:

Segmento 3' (1 mM, disolución madre, 20 µM final)	1 µl
Segmento central (1 mM, disolución madre, 20 µM final)	1 µl
Segmento 5' (1 mM, disolución madre, 20 µM final)	1 µl
Molde (1 mM, disolución madre, 20 µM final)	1 µl
H ₂ O	hasta 50 µl

- 5 Para ligasa de fago CC31 de enterobacterias mutante (SEQ ID NO: 23)

Tampón de ADN ligasa (Tris-HCl 50 mM, DTT 1 mM)	5 µl
ADN ligasa de CC31 mutante (0,45 mM)	10 µl
MnCl ₂ (50 mM)	5 µl
ATP (10 mM)	10 µl

Mientras que para la ADN ligasa de virus de *Chlorella* (SEQ ID NO: 29, comercialmente disponible como ligasa SplintR, NEB)

10

Tampón de ADN ligasa NEB (para <i>Chlorella</i>)	5 µl
ADN ligasa de virus de <i>Chlorella</i>	2 µl

Se incubó cada mezcla de reacción a 20 °C 1 hora. Se terminó cada reacción calentando a 95 °C durante 10 minutos. Se llevó a cabo análisis de HPLC usando el método del ejemplo 1.

15 6.3 Resultados y conclusiones

20 Todas las reacciones produjeron un pico de producto en el análisis de HPLC. Por consiguiente, el método de ligamiento funciona para todas las combinaciones de modificaciones sometidas a prueba en las uniones que van a unirse. Es posible una optimización para mejorar el producto, pero no fue necesario ya que los resultados fueron concluyentes y quedó claro que la reacción funcionaba para todas las combinaciones de modificaciones sometidas a prueba en las uniones que iban a unirse.

Ejemplo 7: Capacidad para usar diferentes números de segmentos para construir oligonucleótidos más grandes

7.1 Materiales

Se produjo ligasa de fago CC31 de enterobacterias mutante (SEQ ID NO: 23) tal como se describió en 5.1.

Se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos de segmento de ADN y oligonucleótidos de ADN molde biotinilados (tabla 11) mediante métodos en fase sólida convencionales.

Tabla 11

Nombre	Secuencia
Molde	5'-biotina TTTGGTGCGAAGCAGAAGGTAAGCCGAGGTTTGGCC-3' (SEQ ID NO: 47)
Segmento 5' (1)	5'-GGCCAAA-3'
Segmento central (2)	5'-(p)CCTCGG-3'
Segmento central/segmento 3' (5)	5'-(p)TCTGCT-3'
Segmento central (3)	5'-(p)CTTACCT-3'
Segmento 3' (4)	5'-(p)TCGCACC-3'
(p) = fosfato,	

7.2 Método

Se establecieron las reacciones tal como sigue:

Tabla 12

Segmento 5'	Segmento(s) central(es)	Segmento 3'	Número total de segmentos
1	2 y 3	5	4
1	2, 3 y 5	4	5

Se ejecutaron las reacciones en solución salina tamponada con fosfato, pH = 7,04 en un volumen total de 100 µl y se establecieron tal como sigue:

Molde (20 µM final)

Cada segmento (20 µM final)

MgCl₂ (10 mM final)

ATP (100 µM final)

ADN ligasa de CC31 mutante (25 µM final)

Se incubó cada reacción at 28 °C durante la noche antes de terminarse calentando a 94 °C durante 1 minuto. Se analizaron los productos mediante HPLC-espec. de masas.

7.3 Resultados y conclusiones

La reacción usando 4 segmentos produjo un producto completamente ligado de 27 pares de bases de longitud. La reacción usando 5 segmentos produjo un producto de 33 pares de bases de longitud. En ambos casos, la masa observada del producto estaba de acuerdo con lo esperado para la secuencia deseada. En conclusión, claramente es posible ensamblar múltiples segmentos para generar oligonucleótidos de la longitud y secuencia deseadas tal como se define mediante la secuencia molde complementaria apropiada.

Ejemplo 8: Ensamblaje y ligamiento de 5-10-5 segmentos para formar un gapmero, en el que los segmentos 5' y 3' comprenden (i) modificaciones de azúcar de 2'-OMe ribosa, (ii) uniones fosforotioato o (iii) modificaciones de azúcar de 2'-OMe ribosa y uniones fosforotioato; y en los que el segmento central es ADN no modificado

8.1 Materiales

Se produjo ligasa de fago CC31 de enterobacterias mutante (SEQ ID NO: 23) tal como se describió en 5.1, los siguientes oligonucleótidos de segmento y oligonucleótido de ADN molde biotinilado (tabla 13) se sintetizaron mediante métodos en fase sólida convencionales.

Tabla 13

Nombre	Secuencia
Molde	5'-biotina TTTGGTGCGAAGCAGACTGAGGC-3' (SEQ ID NO: 30)
Segmento 3' (3OMe)	5'-(p)(OMe)G(OMe)C(OMe)C(OMe)T(OMe)C-3'
Segmento 3' (3PS+OMe)	5'-(p)(OMe)G*(OMe)C*(OMe)C*(OMe)T*(OMe)C-3'
Segmento 3' (3PS)	5'-(p)G*C*C*T*C-3'
Segmento central (D)	5'-(p)AGTCTGCTTC-3'
Segmento 5' (5OMe)	5'-(OMe)G(OMe)C(OMe)A(OMe)C(OMe)C-3'
Segmento 5' (5PS+OMe)	5'-(OMe)G*(OMe)C*(OMe)A*(OMe)C*(OMe)C-3'
Segmento 5' (5PS)	5'-G*C*A*C*C-3'
OMe indica sustitución de 2' metoxi en el anillo de ribosa Todos los residuos de azúcar restantes son residuos de desoxirribosa *fosforotioato	

8.2 Método

Se establecieron las reacciones tal como sigue:

Tabla 14

Reacción	Segmento 3'	Segmento(s) central(es)	Segmento 5'
1	3PS	D	5PS
2	3OMe	D	5OMe
3	3PS+OMe	D	5PS+OMe

Cada una de las reacciones 1, 2 y 3 se estableció en 100 µl de volumen final en solución salina tamponada con fosfato con los siguientes componentes:

Segmento 3'	20 µM final
Segmento central	20 µM final
Segmento 5'	20 µM final
Molde	20 µM final
MgCl ₂	10 mM final
ATP	50 µM final
Enzima	25 µM final

Se incubó cada mezcla de reacción a 20 °C durante la noche. Se terminó cada reacción calentando a 95 °C durante 10 minutos. Se llevó a cabo análisis de HPLC-espec. de masas.

8.3 Resultados y conclusiones

Se produjo oligonucleótido de producto correspondiente al ligamiento satisfactorio de los tres fragmentos en las tres reacciones.

Por consiguiente, la ligasa de fago CC31 de enterobacterias mutante (SEQ ID NO: 23) es capaz de ligar 3 segmentos entre sí formando un 'gapmero' donde las 'alas' 5' y 3' tienen una estructura principal de fosforotioato, mientras que la región central tiene una estructura principal de fosfodiéster, y todos los residuos de azúcar en el gapmero son residuos de desoxirribosa. La ligasa de fago CC31 de enterobacterias (SEQ ID NO: 23) es también capaz de ligar 3 segmentos entre sí formando un 'gapmero' donde las 'alas' 5' y 3' tienen residuos de 2'-

metoxirribosa (2'-OMe), mientras que la región central tiene residuos de desoxirribosa, y todas las uniones son uniones fosfodiéster. Finalmente, la ligasa de fago CC31 de enterobacterias (SEQ ID NO: 23) es capaz de ligar 3 segmentos entre sí formando un 'gapmero' donde las 'alas' 5' y 3' tienen las modificaciones combinadas (una estructura principal e fosforotioato y residuos de 2'-metoxirribosa), mientras que la región central tiene residuos de desoxirribosa y uniones fosfodiéster.

Ejemplo 9: Ensamblaje y ligamiento de segmentos que comprenden ácidos nucleicos bloqueados (LNA)

9.1 Materiales

- Se produjo ligasa de fago CC31 de enterobacterias mutante (SEQ ID NO: 23) tal como se describió en 5.1. Se produjo una ligasa dependiente de NAD de *Staphylococcus aureus* mutante (NAD-14) tal como se describe en 13.1.
- Se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos de segmento y oligonucleótido de ADN molde biotinilado (tabla 15) mediante métodos en fase sólida convencionales.

Tabla 15

Nombre	Secuencia
Molde	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAGACTGAGGC-3' (SEQ ID NO: 30)
Segmento 5'	5'- GCCTCAG-3'
Segmento 5' de LNA (oligo 1)	5'-GCCTCA(LNA)G-3'
Segmento central	5'-(p)TCTGCT-3'
Segmento central de LNA (oligo 2)	5'-(p) (LNA)TCTGCT-3'
(p) = fosfato LNA = ácido nucleico bloqueado	

9.2 Método

Se establecieron las reacciones tal como sigue:

Volumen de reacción de 100 µl

Molde	20 µM final
Enzima	25 µM final
Todos los segmentos de oligonucleótidos	20 µM final

Se establecieron las reacciones variando la enzima (ligasa de fago CC31 de enterobacterias mutante (SEQ ID NO: 23) o NAD-14), el catión divalente (Mg²⁺ o Mn²⁺) y las combinaciones de segmentos de oligonucleótidos tal como se establece en la tabla 16.

Tabla 16

Enzima	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 23	NAD-14	NAD-14
Catión divalente	MgCl ₂ 10 mM	MnCl ₂ 10 mM	MgCl ₂ 10 mM	MnCl ₂ 10 mM
Cofactor	ATP 100 µM	ATP 100 µM	NAD 100 µM	NAD 100 µM
Tampón	PBS, pH = 7,04	PBS, pH = 7,04	KH ₂ PO ₄ 50 mM, pH 7,5	KH ₂ PO ₄ 50 mM, pH 7,5
Segmento 5' + segmento central	Producto	Producto	Producto	Producto
Oligo 1 + segmento central	Producto	Producto	Producto	Producto
Segmento 5' + oligo 2	Producto	Producto	Producto	Producto
Oligo 1 + oligo 2	Sin producto	Sin producto	Sin producto	Sin producto

- Se incubó cada mezcla de reacción a 28 °C durante la noche. Se terminó cada reacción calentando a 94 °C durante 1 minuto. Se llevó a cabo análisis de HPLC-espec. de masas.

9.3 Resultados y conclusiones

Se produjo el oligonucleótido de producto en reacciones de reacción de control (oligonucleótidos no modificados solo) y donde se incluyó un solo ácido nucleico bloqueado en un segmento en la unión de ligamiento independientemente de si estaba en el lado 3' o 5' de la unión. Cuando se incluyeron ácidos nucleicos bloqueados en ambos lados (oligo 1 + oligo 2), no se detectó producto. Los datos fueron similares para ambas enzimas e independientemente de si se usó Mg²⁺ o Mn²⁺.

Podrían llevarse a cabo mutaciones enzimáticas y/o cribados de selección para identificar una enzima capaz de ligar segmentos con un ácido nucleico bloqueado tanto en el lado 3' como 5' de la unión.

Ejemplo 10: Ensamblaje y ligamiento de tres segmentos (7-6-7) para formar un gapmero en el que los segmentos 5' y 3' comprenden modificaciones de azúcar de 2' MOE ribosa y todas las uniones son uniones fosforotioato, usando una variante de ligasa de fago CC31 de enterobacterias en presencia de Mg²⁺ o Mn²⁺

10.1 Formación de enlaces fosforotioato

Con el fin de determinar si una ligasa de fago CC31 de enterobacterias mutante (SEQ ID NO: 23) era capaz de ligar segmentos de oligonucleótidos modificados con una estructura principal de fosforotioato, modificaciones de azúcar de 2' MOE ribosa y bases de pirimidina 5-metiladas, se realizaron reacciones usando los segmentos de oligonucleótidos mostrados en la tabla 15. Las reacciones se realizaron en presencia de iones Mg²⁺ y Mn²⁺.

10.2 Materiales

Se sintetizaron químicamente oligonucleótidos usando métodos convencionales tal como se muestra a continuación:

Tabla 17

Nombre	Secuencia
Segmento 5' 2'-MOE PS	5'-mG*mG*mC*mC*mA*dA*dA-3'
Segmento central PS	5'-(p)*dC*dC*dT*dC*dG*dG -3'
Segmento 3' 2'-MOE PS	5'-(p)*dC*dT*mU*mA*mC*mC*mU-3'
Molde biotinilado	5'- biotina dT dT dT dA dG dG dT dA dA dG dC dC dG dA dG dG dT dT dT dG dG dC dC- 3' (SEQ ID NO:2)
(p)* = 5'-fosforotioato, * = unión fosforotioato, mX = bases MOE bases, dX = bases de ADN todos los segmentos y el producto tienen 5-metilpirimidinas (con la excepción del molde) mT y m (Me)U se consideran equivalentes	

N.B. La molécula de 2'MOE PS diana producida mediante ligamiento de los segmentos de la tabla 17, cuando se hibrida con el molde biotinilado mostrado en la tabla 17, es:

5'-mG[□]mG[□]mC[□]mC[□]mA[□]dA[□]dA[□]dC[□]dC[□]dT[□]dC[□]dG[□]dG[□]dC[□]dT[□]mU[□]mA[□]mC[□]mC[□]mU-3' (SEQ ID NO: 1)

Se preparó ligasa de fago CC31 de enterobacterias mutante purificada (SEQ ID NO: 23) tal como se describió en el ejemplo 5.1. Se llevó a cabo el análisis de HPLC.

10.3 Ensamblaje de oligonucleótidos y método de ligamiento con variante de ligasa de fago CC31 de enterobacterias (SEQ ID NO: 23)

Se prepararon las reacciones tal como sigue:

Reacción con MgCl₂

10 × tampón de ADN ligasa de T4 (NEB)*	5 µl
Molde	Concentración final 20 µM
Segmento 5' 2' MOE PS	Concentración final 20 µM
Segmento central PS	Concentración final 20 µM

Segmento 3' 2' MOE PS	Concentración final 20 µM
Ligasa (24,3 µM)	10 µl
Agua	hasta 50 µl

*1 × tampón contiene Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, DTT 10 mM, pH 7,5

Reacción con MnCl₂

10 × tampón de ligasa*	5 µl
ATP (10 mM)	5 µl
MnCl ₂ (50 mM)	5 µl
Molde	Concentración final 20 µM
Segmento 5' 2' MOE PS	Concentración final 20 µM
Segmento central PS	Concentración final 20 µM
Segmento 3' 2' MOE PS	Concentración final 20 µM
Ligasa (24,3 µM)	10 µl
Agua	hasta 50 µl

*1 × tampón contiene Tris-HCl 50 mM, DTT 10 mM, pH 7,5

5 Las reacciones finales contenían 20 µM de cada segmento y molde, MgCl₂ 5 mM o MnCl₂ 5 mM, ATP 1 mM, Tris-HCl 50 mM, DTT 10 mM, pH 7,5 y ligasa 4,9 µM. Se prepararon reacciones adicionales que no contenían enzima y sirvieron como control negativo. Se incubaron las reacciones durante 16 horas a 25 °C y luego se extinguieron calentando hasta 95 °C durante 5 minutos. Se clarificaron las proteínas precipitadas mediante centrifugación y se analizaron las muestras mediante HPLC.

10

10.4 Resultados y conclusión

Los oligonucleótidos de producto, molde y segmento se resolvieron claramente en el cromatograma de control y no se observó ligamiento. Las reacciones de ligasa realizadas en presencia de MgCl₂ 5 mM condujeron a la formación de un producto intermedio formado a partir del ligamiento del segmento 5' y los segmentos centrales, pero no se detectó producto de longitud completa. Las reacciones de ligasa realizadas en presencia de MnCl₂ produjeron tanto el producto de longitud completa como el producto intermedio (producto intermedio de segmento 5' más segmento central). Ambas reacciones de ligasa mostraron que quedaban segmentos de oligonucleótidos sin ligar. Sin embargo, es posible una optimización del protocolo con el fin de maximizar el rendimiento del producto.

20

Ejemplo 11: Ensamblaje y ligamiento de tres segmentos (7-6-7) para formar un gapmero en el que los segmentos 5' y 3' comprenden modificaciones de azúcar de 2' MOE ribosa y todas las uniones son uniones fosforotioato, usando ADN ligasa de virus de *Chlorella* de tipo natural en presencia de Mg²⁺ nativo

25 11.1 Materiales

Con el fin de determinar si la ADN ligasa de virus de *Chlorella* (SEQ ID NO: 29, comercialmente disponible como ligasa SplintR, NEB) era capaz de ligar segmentos de oligonucleótidos modificados con una estructura principal de fosforotioato, se realizaron modificaciones de azúcar de 2' MOE y reacciones con bases de pirimidina 5-metiladas usando los segmentos de oligonucleótidos mostrados en el ejemplo 10.2, tabla 17. Se realizaron las reacciones a 25 °C, 30 °C y 37 °C para investigar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.

30

11.2 Ensamblaje de oligonucleótidos y método de ligamiento con ADN ligasa de virus de *Chlorella* comercial (SEQ ID NO: 29)

35

Cada segmento de oligonucleótido y molde se disolvieron en agua libre de nucleasa tal como se detalla a continuación:

Molde biotilado	249,6 ng/µl
Segmento 5' 2' MOE PS	182,0 ng/µl
Segmento central PS	534,0 ng/µl
Segmento 3' 2' MOE PS	531,0 ng/µl

Se prepararon las reacciones tal como sigue:

10 × tampón (NEB)*	6 µl
Molde	3,8 µl
Segmento 5' 2' MOE PS	18,1 µl
Segmento central PS	4,8 µl
Segmento 3' 2' MOE PS	6,3 µl
Agua	15 µl
Ligasa SplintR (25 U/µl)	6 µl

*1 × tampón contiene Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, DTT 10 mM, pH 7,5

- 5 Las reacciones finales contenían 20 µM de cada segmento y molde, Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, DTT 10 mM, pH 7,5 y ligasa 2,5 U/µl. Se incubaron las reacciones a 25 °C, 30 °C y 37 °C. Se prepararon reacciones adicionales que no contenían enzima y sirvieron como control negativo. Tras 16 horas de incubación, se extinguieron las reacciones calentando hasta 95 °C durante 10 minutos. Se clarificaron las proteínas precipitadas mediante centrifugación y se analizaron las muestras mediante HPLC.

10 11.3 Resultados y conclusión

Los oligonucleótidos de producto, molde y segmento se resolvieron claramente en el cromatograma de control y no se observó ligamiento. El análisis de HPLC de las reacciones de ligasa mostró que quedaban segmentos de oligonucleótidos sin ligar, pero la ADN ligasa de virus de *Chlorella* fue capaz de ligar satisfactoriamente los segmentos. La actividad de la ligasa aumentó con el aumento de la temperatura. A 25 °C, la ADN ligasa de virus de *Chlorella* fue capaz de ligar satisfactoriamente el segmento 5' y el segmento central pero no se observó producto de longitud completa. A 30 °C y 37 °C, se detectó producto de longitud completa además del producto intermedio formado a partir del segmento 5' y el segmento central.

20 **Ejemplo 12: Cribado de un panel de 15 ATP y NAD ligasas para determinar la actividad hacia el ligamiento de tres segmentos (7-6-7) para formar un gapmero en el que los segmentos 5' y 3' comprenden modificaciones de azúcar de 2' MOE ribosa y todas las uniones son uniones fosforotioato**

25 12.1 Materiales

Se fusionaron ligasas dependientes de ATP y NAD de tipo natural descritas en las tablas 18 y 19 cada una en el extremo N-terminal con un CBD. Se sintetizaron genes, se clonaron en pET28a y se expresaron en *E. coli* BL21(DE3) usando métodos de clonación, expresión y extracción convencionales.

30 Tabla 18

Ligasas dependientes de ATP		
Nombre	Origen	SEQ ID
M115D1_Pbcv	Virus de <i>Chlorella</i> de <i>Paramecium bursaria</i> NE-JV-4	SEQ ID NO: 48
M11998_Pbcv	Virus de <i>Chlorella</i> de <i>Paramecium bursaria</i> NYs1	SEQ ID NO: 49
M1HX09_Pbcv	Virus de <i>Chlorella</i> de <i>Paramecium bursaria</i> NE-JV-1	SEQ ID NO: 50
M1HUL0_Atcv	Virus de <i>Chlorella</i> de <i>Acanthocystis turfacea</i> Canal-1	SEQ ID NO: 51
M1HRK1_Atcv	Virus de <i>Chlorella</i> de <i>Acanthocystis turfacea</i> Br0604L	SEQ ID NO: 52
M1I273_Atcv	Virus de <i>Chlorella</i> de <i>Acanthocystis turfacea</i> NE-JV-2	SEQ ID NO: 53
M1I600_Atcv	Virus de <i>Chlorella</i> de <i>Acanthocystis turfacea</i> TN603,4.2	SEQ ID NO: 54
M1H4A4_Atcv	Virus de <i>Chlorella</i> de <i>Acanthocystis turfacea</i> GM0701.1	SEQ ID NO: 55
F5B464_Sphage	Fago de <i>Synechococcus</i> S-CRM01	SEQ ID NO: 56
A0A0F9M1S3	Metagenoma de sedimento marino - proteína no caracterizada	SEQ ID NO: 57

Tabla 19

Ligasas dependientes de NAD		
Nombre	Origen	SEQ ID

MitNAD	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (cepa ATCC 25618/H37Rv)	SEQ ID NO: 58
EfnAD	<i>Enterococcus faecalis</i> (cepa ATCC 700802/V583)	SEQ ID NO: 59
HiNAD	<i>Haemophilus influenzae</i> (cepa ATCC 51907/DSM 11121/ KW20/Rd)	SEQ ID NO: 60
SaNAD	<i>Staphylococcus aureus</i>	SEQ ID NO: 61
SpNAD	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (cepa P1031)	SEQ ID NO: 62

5 Se unieron fusiones de CBD-ligasa a perlas PERLOZA tal como se describió en 1.4 con las siguientes modificaciones. Se hicieron crecer proteínas de fusión de CBD-ligasa a partir de una sola colonia de células BL21(DE3) (NEB) y se hicieron crecer en un cultivo de expresión de 50 ml. Se recogieron las células mediante centrifugación, se resuspendieron en 5-10 ml de Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) y se lisaron mediante sonicación. Se clarificó el lisado mediante centrifugación y se añadió 1 ml de perlas PERLOZA 100 (PERLOZA) (suspensión al 10 %, preequilibrada con Tris-HCl 50 mM pH 7,5) al sobrenadante que se agitó a 20 °C durante 1 hora. Entonces se recogieron las perlas de celulosa PERLOZA y se lavaron con 30 ml de tampón (Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 200 mM, Tween 20 al 0,1 %, glicerol al 10 %) seguido por 10 ml de Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) y se resuspendieron finalmente en 1 ml de Tris-HCl (50 mM, pH 7,5). Con el fin de analizar la expresión de proteínas, se mezclaron 20 µl de la suspensión de perlas PERLOZA con 20 µl de tampón de carga SDS y se incubaron a 95 °C durante 5 minutos antes de ejecutarse sobre un gel de gradiente de SDS PAGE (4 - 20 %) según un protocolo convencional.

15 12.2 Método de ensamblaje y ligamiento de oligonucleótidos modificados con 2' MOE y fosforotioato

Se usaron segmentos de oligonucleótidos modificados con una estructura principal de fosforotioato, modificaciones de azúcar de 2' MOE ribosa y bases de pirimidina 5-metiladas que se muestran en el ejemplo 10.2, tabla 17. Cada segmento de oligonucleótido y molde se disolvió en agua libre de nucleasa tal como se detalla a continuación:

20

Molde biotinilado	1500 ng/µl
Segmento 5' 2' MOE PS	1008 ng/µl
Segmento central PS	725 ng/µl
Segmento 3' 2' MOE PS	1112 ng/µl

La mezcla de ensayo de ATP se preparó tal como sigue:

Molde	85,6 µl
Segmento 5' 2' MOE PS	43,5 µl
Segmento central PS	46,8 µl
Segmento 3' 2' MOE PS	40,1 µl
DTT 1 M	8 µl
MgCl ₂ 1 M	4 µl
ATP (50 mM)	16 µl
Tris 0,5 M	80 µl
Agua	476 µl

25 La mezcla de ensayo de NAD se preparó tal como sigue:

Molde	85,6 µl
Segmento 5' 2' MOE PS	43,5 µl
Segmento central PS	46,8 µl
Segmento 3' 2' MOE PS	40,1 µl
DTT 1 M	8 µl
MgCl ₂ 1 M	4 µl
NAD (50 mM)	1,6 µl
Tris 0,5 M	80 µl
Agua	490,4 µl

Cada proteína inmovilizada (40 µl, suspensión de perlas PERLOZA al 50 %) se pipeteó a un tubo de PCR. Se sedimentaron las perlas mediante centrifugación y se eliminó el sobrenadante mediante pipeteo. Se añadió mezcla de ensayo (40 µl) a cada reacción (las reacciones finales contenían 20 µM de cada segmento y molde, Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM o NAD 100 µM, DTT 10 mM, pH 7,5 y 40 µl de ligasa sobre perlas PERLOZA).
 5 Una reacción que no contenía proteína sirvió como control negativo. Se incubaron las reacciones durante 18 horas a 30 °C y luego se extinguieron calentando hasta 95 °C durante 10 minutos. Se clarificaron las proteínas precipitadas mediante centrifugación y se analizaron las muestras mediante HPLC.

12.3 Resultados y conclusión

Los oligonucleótidos de producto, molde y segmento se resolvieron claramente en el cromatograma de control y no se observó ligamiento. El análisis de HPLC de las reacciones de ligasa mostró que todas las proteínas catalizaron el ligamiento satisfactorio del segmento 5' y el segmento central para formar un producto intermedio, pero solo algunas ligasas catalizaron el ligamiento de los tres segmentos para producir el producto de longitud completa tal como se describe en la tabla 20. La ligasa dependiente de NAD de *Staphylococcus aureus* (SaNAD, SEQ ID NO: 61) produjo el producto de longitud más completa. Es posible una optimización para mejorar el rendimiento del producto y está dentro del conjunto de habilidades del experto en la técnica.

Tabla 20

Nombre del gen	SEQ ID NO	Conversión (%)*	
		producto intermedio	producto
M1I5D1_Pbcv	48	5,0	0,8
M1I998_Pbcv	49	5,1	0,0
M1HX09_Pbcv	50	14,4	6,6
M1HUL0_Atcv	51	9,5	2,0
M1HRK1_Atcv	52	2,8	9,4
M1I273_Atcv	53	12,0	6,4
M1I600_Atcv	54	8,8	5,1
M1H4A4_Atcv	55	2,1	0,0
F5B464_Sphage	56	2,1	0,0
A0A0F9M1S3_ms_metagenome	57	1,4	0,0
MtNAD	58	7,1	0,0
EfNAD	59	19,1	0,0
HiNAD	60	0,3	0,0
SaNAD	61	10,5	11,8
SpNAD	62	19,0	0,0

* La conversión se calculó a partir del área de pico de HPLC en relación con el molde que no se consume en la reacción y sirve como patrón interno. Conversión=área de producto / (molde + área de producto)*100

Ejemplo 13: Reacción de ligamiento semicontinuo

13.1 Materiales

Se produjo una ligasa de *Staphylococcus aureus* mutante (NAD-14) fusionada en el extremo N-terminal a un CBD usando métodos de clonación, expresión y extracción convencionales. Entonces se unió la CBD-ligasa mutante NAD-14 a perlas PERLOZA: se añadieron 50 ml de lisado proteico a 7,5 ml de perlas PERLOZA, se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se recogieron las perlas en una columna de vidrio (BioRad Econo-Column, 10 cm de longitud, 2,5 cm de diámetro, n.º 7372512). Se lavaron las perlas con 200 ml de tampón Y (Tris8 50 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 al 0,1 %, glicerol al 10 %), luego con 200 ml de tampón Z (Tris8 50 mM, NaCl 200 mM, Tween 20 al 0,1 %, glicerol al 10 %) y 200 ml de PBS. La concentración estimada de ligasa NAD-14 mutante sobre las perlas era de 69 µM de ligasa por ml de perlas.

Se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos de segmento y oligonucleótido de ADN molde (tabla 21) mediante métodos en fase sólida convencionales.

Tabla 21

Segmento	Secuencia	PM	% de pureza por HPLC
Molde 3	5' TTTGGTGC GAAGCAGACTGAGGC-3' (SEQ ID NO: 30)		
Segmento central	5'-(p)dTdCdTdGdCdT-3'	1865,4	97,5
Segmento 3' MOE	5'-(p)dTdCmGmCmAmCmC-3'	2546,7	98,0
Segmento 5' MOE	5'-mGmCmCmUmCdAdG-3'	2492,7	98,3
(p) = fosfato, mX = bases MOE, dX = bases de ADN todas 5-metilpirimidinas todas las uniones son uniones fosfodiéster			

Se produjo un "núcleo de tres moldes" (aproximadamente 24 kDa) que comprende un material de soporte denominado "núcleo" y tres secuencias de molde (figura 11). Cada copia del molde de unión covalentemente, en su propio punto de unión individual, al "núcleo". La molécula de "núcleo de tres moldes" tiene un peso molecular mayor que el oligonucleótido diana (producto) (complementario al 100 % con la secuencia de molde), permitiendo de ese modo que se retenga cuando se separan las impurezas y los productos de la mezcla de reacción. Debe observarse que, en este caso particular, la secuencia de molde era SEQ ID NO: 30 y se unieron tres copias al núcleo. En el siguiente ejemplo, también se produce un núcleo de tres moldes, pero con una secuencia de molde diferente. Por consiguiente, puesto que la secuencia de molde varía entre los ejemplos, también lo hace el núcleo de tres moldes.

Se preparó la siguiente mezcla de reacción (volumen total de 5 ml):

250 µl	KH ₂ PO ₄ 1 M, pH 7,5	(50 mM final)
108 µl	Segmento central 0,07011 M	(1,5 mM final)
137 µl	Segmento 3' 0,05481 M	(1,5 mM final)
168 µl	Segmento 5' 0,04461 M	(1,5 mM final)
750 µl	Núcleo (molde) 0,00387 M	(0,55 mM final)
350 µl	NAD ⁺ 50 mM	(3,5 mM final)
1000 µl	MgCl ₂ 50 mM	(10 mM final)
2237 µl	H ₂ O libre de nucleasa	

15

13.2 Métodos

Se estableció un sistema semicontinuo tal como se muestra en la figura 12.

Se empaquetaron 4 ml de perlas PERLOZA y ligasa NAD-14 mutante inmovilizada en una columna Pharmacia XK16 (B). Se usó un baño de agua y una bomba peristáltica (C) para mantener la temperatura de la columna, usando el compartimiento de agua de la columna, a 30 °C. Se equilibraron las perlas procesando 120 ml (30x el volumen de la columna) de tampón que contenía KH₂PO₄ 50 mM a pH 7,5 durante 120 minutos a 1 ml/min. Se usó una bomba AKTA explorer A1 (A) para crear el flujo a través de la columna Pharmacia XK16.

25

Tras el equilibrado de la columna, se cargaron sobre la columna la mezcla de reacción de 5 ml (bien mezclada mediante agitación con vórtex), se recogió en el tubo de depósito (D) y se recirculó a través de la columna usando la bomba AKTA explorer A1. Se recirculó la mezcla de reacción a través del sistema a una velocidad de flujo de 1 ml/min en modo de circulación continua durante 16 horas. Se recogieron muestras después de 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 14 horas y 16 horas para el análisis de HPLC.

30

13.3 Resultados y conclusiones

Tabla 22

35

Muestra	Segmento 5' (%)	Segmento central (%)	Segmento 3' (%)	Producto intermedio 5' + central (%)	Producto (%)
30 min	7,80	11,00	24,00	39,40	4,40
60 min	3,30	4,50	18,80	41,50	18,90
90 min	2,10	2,80	15,10	33,80	34,40

4 h	1,80	2,40	9,60	19,20	56,80
5 h	1,72	2,40	8,30	15,70	61,50
6 h	1,69	2,50	8,60	15,90	69,40
7 h	1,70	2,40	8,30	14,80	70,90
14 h	2,00	2,70	1,60	5,40	88,10
16 h	0,80	1,90	1,70	3,30	89,50

El porcentaje de cada segmento, producto intermedio y producto se expresa como área de pico fraccionaria en relación con el área de pico del núcleo de tres moldes.

- 5 En conclusión, la reacción de flujo semicontinuo funcionó y, después de 16 horas, la reacción casi se completó.

10 **Ejemplo 14: Separación de oligonucleótidos de diferentes tamaños mediante filtración: a) separación de un oligonucleótido de 20 meros (SEQ ID NO: 1) y un núcleo que comprende tres oligonucleótidos de 20 meros no complementarios (SEQ ID NO: 30); (b) separación de un oligonucleótido de 20 meros (SEQ ID NO: 1) de oligonucleótidos de segmento de 6 meros y 8 meros (véase la tabla 1) y un núcleo que comprende tres oligonucleótidos de 20 meros complementarios (SEQ ID NO: 2)**

14.1 Materiales

- 15 Todos los oligonucleótidos usados se sintetizaron mediante métodos en fase sólida convencionales.

Se usó un núcleo de tres moldes, tal como se describió en 13.1 (figura 11).

- 20 Se usó una variedad de filtros de puntos de corte de peso molecular variables y de diferentes fabricantes tal como se muestra en las tablas 23 y 24.

14.2 Métodos

- 25 **14.2.1 Configuración de filtración sin salida y protocolo para el examen de membranas poliméricas: (protocolo 1)**

30 Se estableció una plataforma de filtración sin salida tal como se muestra en la figura 13 que comprende una celda de filtración sin salida MET colocada en un baño de agua que se sitúa sobre un agitador magnético y una placa caliente. La presión dentro de la célula se proporcionó a partir de un flujo de nitrógeno.

35 La muestra de membrana (14 cm²) que va a someterse a prueba se cortó en primer lugar al tamaño apropiado y se colocó en la celda. La membrana se acondicionó en primer lugar con agua de calidad para HPLC (200 ml) y luego con tampón PBS (200 ml). Entonces se despresurizó la celda, se eliminó la disolución de PBS restante y se reemplazó por una disolución que contenía oligonucleótidos (40 ml de oligonucleótidos en PBS a una concentración de 1 g/l). Se colocó la celda sobre una placa agitadora caliente y se calentó la disolución hasta la temperatura deseada al tiempo que se agitaba usando agitación magnética. Se aplicó presión a la celda (con un objetivo de aproximadamente 3,0 bar; la presión real se registró en cada caso). La agitación de la disolución o bien se detuvo o bien continuó y se recogió disolución de permeado (aproximadamente 20 ml) y se analizó mediante HPLC. Se registró el flujo. Entonces se despresurizó el sistema para permitir el muestreo y el análisis por HPLC de la disolución de material retenido. Entonces se añadió más tampón PBS (20 ml) a la celda de filtración y se repitió el procedimiento anterior 3 veces. Finalmente, se lavó la membrana con tampón PBS.

Se analizaron todas las muestras mediante HPLC sin ninguna dilución.

- 45 **14.2.2 Configuración de filtración de flujo cruzado y protocolo para el examen de membranas poliméricas: (protocolo 2)**

50 Se estableció una plataforma de filtración de flujo cruzado tal como se muestra en la figura 14. El recipiente de alimentación (1) que consistía en un matraz cónico contenía la disolución de oligonucleótidos que iba a purificarse. Se bombeó la disolución hasta una celda de filtración de flujo cruzado (4) usando una bomba de HPLC (2) al tiempo que se mantuvo la temperatura dentro de la celda usando una placa caliente (3). Se recirculó la disolución dentro de la celda usando una bomba de engranajes (6). Un manómetro (5) permitió que se leyera la presión durante el experimento. Se tomaron muestras de la disolución de material retenido a partir de la válvula de muestreo (7) al tiempo que se muestreó la disolución de permeado a partir del recipiente de recogida de permeado (8).

55 La muestra de membrana que va a someterse a prueba se cortó en primer lugar al tamaño apropiado y se colocó

5 en la celda. Se lavó el sistema con una disolución de PBS (100 ml). Se ajustó la temperatura de la disolución al punto de ajuste deseado. Se alimentó una disolución que contenía productos de oligonucleótidos en PBS (7,5 ml a 1 g/l) al sistema. Entonces se bombeó la disolución de PBS al sistema usando la bomba e HPLC a una velocidad de flujo que coincidía con la velocidad de flujo de la disolución de permeado (normalmente 3 ml/min). Se registró la presión usando el manómetro. Se muestreó la disolución de material retenido para el análisis de HPLC cada 5 volúmenes de diafiltración. Se muestreó la disolución de permeado para el análisis de HPLC cada volumen de diafiltración. Se detuvo el experimento después de 20 volúmenes de diafiltración.

10 En el caso del experimento que usó la membrana Snyder que tenía un corte de peso molecular de 5 kDa (número de lote 120915R2) y SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 30, se modificó la metodología anterior tal como sigue. La muestra de membrana que va a someterse a prueba se cortó en primer lugar al tamaño apropiado y se colocó en la célula. Se lavó el sistema con una disolución de fosfato de potasio (100 ml, 50 mM, pH 7,5). Se ajustó la temperatura de la disolución al punto de ajuste deseado. Se añadió una disolución que contenía productos de oligonucleótidos en fosfato de potasio (aproximadamente 1 g/l) a ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) (230 µl de una disolución 500 mM). Entonces se alimentó la disolución al sistema. Luego se bombeó tampón fosfato de potasio al sistema usando la bomba de HPLC a una velocidad de flujo que coincidía con la velocidad de flujo de la disolución de permeado (normalmente 4 ml/min). Se registró la presión usando el manómetro. Se muestreó la disolución de material retenido para el análisis de HPLC cada 5 volúmenes de diafiltración. Se muestreó la disolución de permeado para el análisis de HPLC cada volumen de diafiltración. Se detuvo el experimento después de 15 volúmenes de diafiltración

14.3 Resultados

Tabla 23: Resultados de los experimentos de filtración sin salida siguiendo el protocolo 1 (14.2.1)

25

Agitación (sí o no)	Membrana	MWCO (kDa)	Número de lote	SEQ ID NO	Temp. (°C)	Rechazo (%)	
						Producto	Núcleo de tres moldes
Sí	NADIR	10	226162	1 y 30	60	38	96
Sí	NADIR	10	226162	1 y 2	60	90	98
					80	40	43
Sí	NADIR	10	226162	1 y 2	60	83	92
					65	77	84
					70	38	41
					75	12	20
Sí	NADIR	5	226825	1 y 2	60	97	95
					65	99	93
					70	97	92
					75	90	95
No	NADIR	5	226825	1 y 2	75	66	96
No	NADIR	10	226162	1 y 2	75	80	80
No	Snyder	5	120915R2	1 y 2	75	97	98
No	Osmonics	5	622806PT	1 y 2	75	99	98
No	Osmonics	10	622806PW	1 y 2	75	86	95
MWCO = corte de peso molecular							

30 En el experimento que usó la membrana NADIR de MWCO de 10 kDa a 60 °C, se demostró una clara separación entre la secuencia de producto (SEQ ID NO: 1) y el núcleo de tres moldes no complementario (que comprende SEQ ID NO: 30). La figura 15 muestra a) un cromatograma de la disolución de material retenido, que permaneció en la celda de filtración y contenía principalmente núcleo de tres moldes, después de dos volúmenes de diafiltración; y b) un cromatograma del permeado, disolución enriquecida en el producto, después de dos volúmenes de diafiltración.

Tabla 24: Resultados para los experimentos de filtración de flujo cruzado (siguiendo el protocolo 2) (14.2.2)

Membrana	MWCO (kDa)	Número de lote	SEQ ID NO	Temp. (°C)	Presión	Volumen de diafiltración	Rechazo (%)			Producto	Núcleo de tres moldes
							Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3		
Osmonics	10	622806PW	1 y 2	75	3,1	0	N/A	N/A	N/A	100	88
						5	N/A	N/A	N/A	64	88
						10	N/A	N/A	N/A	40	82
						15	N/A	N/A	N/A	12	74
Snyder	5	120915R2	1 y 2	75	3,1	0	N/A	N/A	N/A	100	100
						5	N/A	N/A	N/A	88	100
						10	N/A	N/A	N/A	98	100
						15	N/A	N/A	N/A	98	100
						20	N/A	N/A	N/A	96	100
Snyder	5	120915R2	1 and 2	85	3,1	0	N/A	N/A	N/A	99	99
						5	N/A	N/A	N/A	63	99
						10	N/A	N/A	N/A	79	99
						15	N/A	N/A	N/A	100	98
						20	N/A	N/A	N/A	100	99
						0	100	100	100	100	100
Snyder	5	120915R2	1 y 2+ segmentos de la tabla 1	50	3,0	5	39	39	40	100	100
						10	82	86	86	100	100
						15	77	81	79	100	100
						20	*	*	*	100	100
						0	N/A	N/A	N/A	96	100
Snyder	5	120915R2	1 y 2	80	3,1	5	N/A	N/A	N/A	22	96
						10	N/A	N/A	N/A	10	100
						20	N/A	N/A	N/A	38	100
Snyder	5	120915R2	46 y 30	80	3,4	0	N/A	N/A	N/A	98	100
						5	N/A	N/A	N/A	83	100
						10	N/A	N/A	N/A	68	100
						15	N/A	N/A	N/A	72	100

MWCO = corte de peso molecular

* concentración de solutos demasiado baja que impide un análisis significativo

En el experimento que usó la membrana Snyder de MWCO de 5 kDa a 50 °C y 3,0 bar de presión, se demostró una clara separación entre las secuencias de segmentos (véase la tabla 1) y el núcleo de tres moldes complementario (que comprende SEQ ID NO: 2) y el producto (SEQ ID NO: 1). La figura 16 muestra a) un cromatograma de la disolución de material retenido, que contenía principalmente núcleo de tres moldes y producto, después de 20 volúmenes de diafiltración; y b) un cromatograma del permeado, que contenía principalmente oligonucleótidos de segmento, después de 20 volúmenes de diafiltración.

En el experimento que usó la membrana Snyder de MWCO de 5 kDa a 80 °C y 3,1 bar de presión, se demostró una clara separación entre el núcleo de tres moldes complementario (que comprende SEQ ID NO: 2) y el producto (SEQ ID NO: 1). La figura 17 muestra a) un cromatograma de la disolución de material retenido, que contenía núcleo de tres moldes solo, después de 20 volúmenes de diafiltración; y b) un cromatograma de la disolución de permeado, que contenía el producto solo, después de 2 volúmenes de diafiltración.

14.4 Conclusiones

Pueden separarse oligonucleótidos de diferentes longitudes y pesos moleculares usando filtración. Tal como se mostró anteriormente, el tipo de membrana y las condiciones, tales como la temperatura, afectan al nivel de separación. Para un conjunto dado de oligonucleótidos de diferentes longitudes/pesos moleculares, pueden seleccionarse membranas y condiciones adecuadas para permitir la separación requerida. Por ejemplo, se ha demostrado que oligonucleótidos de segmento (meros cortos de 6 y 8 nucleótidos de longitud), tal como se explica resumidamente en la tabla 1, pueden separarse del oligonucleótido de producto (oligonucleótido de 20 meros que tiene SEQ ID NO: 1) y el núcleo de tres moldes (que comprende 3 x 20 meros de SEQ ID NO: 2 unido a un soporte sólido), y el oligonucleótido de producto y el núcleo de tres moldes, a su vez, pueden separarse entre sí.

25 Ejemplo 15: Extensión 3' por ligamiento de una sola base para la síntesis de oligonucleótidos con modificación de base de 2'-OMe y uniones fosfato

Se fusionaron ligasas mc de tipo natural (SEQ ID NO: 63 a 83) cada una en el extremo N-terminal a una etiqueta de histidina que consistía en 6xHis. Se sintetizaron genes, se clonaron en pET28a y se produjo proteína que codifica el gen en *E. coli* BL21(DE3) Star usando métodos de clonación, expresión y extracción convencionales. Se purificaron proteínas usando Ni-NTA usando métodos convencionales y se usaron directamente.

Se establecieron las reacciones según la tabla 25 a continuación, con adición de ligasa en último lugar. Se incubaron las reacciones a 25 °C durante 20 horas. Entonces se extinguieron las reacciones calentando hasta 95 °C durante 15 min, se centrifugaron a 4000 x g durante 15 min y se transfirieron 10 µl de sobrenadante a un vial de HPLC. Se analizaron entonces las reacciones mediante HPLC para detectar la presencia de SEQ ID NO: 85.

Tabla 25

	Concentración final en la reacción (mM)	Volumen por reacción (µl)
Cebador: (2'-OMe) - SEQ ID NO: 84	0,125	2,5
Monómero: Adenosín-3,5-bisfosfato (2'OMe pAp)	1	2
Adenosín trifosfato trisódico (ATP)	0,25	0,5
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	10	0,2
Ligasa - SEQ ID NO: 63 a 83		5
Tampón (Tris 20 mM, NaCl 30 mM a pH 8)		9,8
Volumen de reacción final:		20

40

Tabla 26: Resultados de las reacciones:

Nombre del gen	SED ID NO	Conversión (%) en producto*
ARN ligasa de T4 de fago de enterobacterias 1 - 'Rnl1'	63	23,9
ARN ligasa de T4 de fago de enterobacterias 2 - 'Rnl2'	64	12,1
Ligasa de virus Aeh1 de <i>Aeromonas</i> - 'RNA3'	65	15,7
Ligasa de fago JD18 de <i>Klebsiella</i> - 'RNA6'	66	25,5
Ligasa de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i> - 'RNA8'	67	29,9
Ligasa de fago JSE de <i>Escherichia</i> - 'RNA9'	68	16,7
Ligasa de fago Acj61 de <i>Acinetobacter</i> - 'RNA16'	69	18,0

Ligasa de fago VH7D de <i>Vibrio</i> - 'RNA20'	70	14,4
Ligasa de fago JS98 de <i>Escherichia</i> - 'RNA22'	71	23,9
Ligasa de fago vB_EcoM_112 de <i>Escherichia</i> - 'RNA23'	72	24,7
Ligasa de fago CC2 de <i>Aeromonas</i> - 'RNA28'	73	19,3
Ligasa de fago RB69 de enterobacterias - 'RNA29'	74	19,1
Ligasa de fago Ac42 de <i>Acinetobacter</i> - 'RNA31'	75	24,2
Ligasa de fago CBB de <i>Pectobacterium</i> - 'RNA33'	76	0,0
Ligasa de fago phiAS5 de <i>Aeromonas</i> - 'RNA35'	77	22,4
Ligasa de fago vB_SenMS16 de <i>Salmonella</i> - 'RNA36'	78	22,0
Ligasa de fago KVP40 de <i>Vibrio</i> - 'RNA39'	79	20,2
Ligasa de virus CP220 de <i>Campilobacter</i> - 'RNA49'	80	10,4
Ligasa de fago phiPMW de <i>Pseudomonas</i> - 'RNA59'	81	2,2
Ligasa de fago vB_PaeM_C2-10_Ab1 de <i>Pseudomonas</i> - 'RNA61'	82	3,4
Ligasa de <i>Butyrivibrio proteoclasticus</i> - 'RNA82'	83	2,3
*Conversión (%) en producto - % de área de pico de cebador N frente a pico de producto N+1(pi) a una longitud de onda de 258 nm		

Ejemplo 16: Extensión 3' mediante ligamiento de una sola base para la síntesis de oligonucleótidos con modificación de base de 2'-OMe y uniones fosforotioato

- 5 Se fusionaron ligasas mc de tipo natural (SEQ ID NO: 63 a 83) cada una en el extremo N-terminal a una etiqueta de histidina que consistía en 6xHis. Se sintetizaron genes, se clonaron en pET28a y se produjo proteína que codifica el gen en *E. coli* BL21(DE3) Star usando métodos de clonación, expresión y extracción convencionales. Se purificaron proteínas usando Ni-NTA usando métodos convencionales y se usaron directamente.
- 10 Se establecieron las reacciones según la tabla 27 a continuación, con adición de ligasa en último lugar. Se incubaron las reacciones a 25 °C durante 20 horas. Entonces se extinguieron las reacciones calentando hasta 95 °C durante 15 min, se centrifugaron a 4000 x g durante 15 min y se transfirieron 10 µl de sobrenadante a un vial de HPLC. Se analizaron entonces las reacciones mediante HPLC para detectar la presencia de SEQ ID NO: 85.

15 Tabla 27

	Concentración final en la reacción (mM)	Volumen por reacción (µl)
Cebador: (2'-OMe) - SEQ ID NO: 84	0,125	2,5
Monómero: Adenosín-3-fosfato-5-tiofosfato (2'OMe psAp)	1	2
Adenosín trifosfato trisódico (ATP)	0,25	0,5
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	10	0,2
Ligasa - SEQ ID NO: 63 a 83		5
Tampón (Tris 20 mM, NaCl 30 mM at pH 8)		9,8
Volumen de reacción final:		20

Tabla 28: Resultados de las reacciones:

Nombre del gen	SEQ ID NO	Conversión (%) en producto*
ARN ligasa de T4 de fago de enterobacterias 1 - 'Rnl1'	63	0
ARN ligasa de T4 de fago de enterobacterias 2 - 'Rnl2'	64	0
Ligasa de virus Aeh1 de <i>Aeromonas</i> - 'RNA3'	65	0
Ligasa de fago JD18 de <i>Klebsiella</i> - 'RNA6'	66	0,8
Ligasa de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i> - 'RNA8'	67	2,8
Ligasa de fago JSE de <i>Escherichia</i> - 'RNA9'	68	1,5
Ligasa de fago Acj61 de <i>Acinetobacter</i> - 'RNA16'	69	0

Ligasa de fago VH7D de <i>Vibrio</i> - 'RNA20'	70	0
Ligasa de fago JS98 de <i>Escherichia</i> - 'RNA22'	71	0
Ligasa de fago vB_EcoM_112 de <i>Escherichia</i> - 'RNA23'	72	0
Ligasa de fago CC2 de <i>Aeromonas</i> - 'RNA28'	73	0
Ligasa de fago RB69 de enterobacterias - 'RNA29'	74	0
Ligasa de fago Ac42 de <i>Acinetobacter</i> - 'RNA31'	75	1,2
Ligasa de fago CBB de <i>Pectobacterium</i> - 'RNA33'	76	0
Ligasa de fago phiAS5 de <i>Aeromonas</i> - 'RNA35'	77	0
Ligasa de fago vB_SenMS16 de <i>Salmonella</i> - 'RNA36'	78	0
Ligasa de fago KVP40 de <i>Vibrio</i> - 'RNA39'	79	0
Ligasa de virus CP220 de <i>Campilobacter</i> - 'RNA49'	80	0
Ligasa de fago phiPMW de <i>Pseudomonas</i> - 'RNA59'	81	0
Ligasa de fago vB_PaeM_C2-10_Ab1 de <i>Pseudomonas</i> - 'RNA61'	82	0
Ligasa de <i>Butyrivibrio proteoclasticus</i> - 'RNA82'	83	0
*Conversión (%) en producto - % de área de pico de cebador N frente a pico de producto N + 1(pi) a una longitud de onda de 258 nm		

Ejemplo 17: Extensión 3' mediante ligamiento de una sola base para la síntesis de oligonucleótidos con modificación de base de 2'MOE y uniones fosforotioato

- 5 Se fusionaron ligasas mc de tipo natural (SEQ ID NO: 63 a 83) cada una en el extremo N-terminal a una etiqueta de histidina que consistía en 6xHis. Se sintetizaron genes, se clonaron en pET28a y se produjo proteína que codifica el gen en *E. coli* BL21(DE3) Star usando métodos de clonación, expresión y extracción convencionales. Se purificaron proteínas usando Ni-NTA usando métodos convencionales y se usaron directamente.
- 10 Se establecieron las reacciones según la tabla 29 a continuación, con adición de ligasa en último lugar. Se incubaron las reacciones a 25 °C durante 20 horas. Entonces se extinguieron las reacciones calentando hasta 95 °C durante 15 min, se centrifugaron a 4000 x g durante 15 min y se transfirieron 10 µl de sobrenadante a un vial de HPLC. Se analizaron entonces las reacciones mediante HPLC para detectar la presencia de SEQ ID NO: 87.

15 Tabla 29

	Concentración final en la reacción (mM)	Volumen por reacción (µl)
Cebador: (2'-MOE) - SEQ ID NO: 86	0,125	2,5
Monómero: Adenosín-3-fosfafo-5-tiofosfato (2'MOE psAp)	1	2
Adenosín trifosfato trisódico (ATP)	0,25	0,5
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	10	0,2
Ligasa - SEQ ID NO: 63 a 83		5
Tampón (Tris 20 mM, NaCl 30 mM a pH 8)		9,8
Volumen de reacción final:		20

Tabla 30: Resultados de las reacciones:

Nombre del gen	SEQ ID NO	Conversión (%) en producto*
ARN ligasa de T4 de fago de enterobacterias 1 - 'Rnl1'	63	0
ARN ligasa de T4 de fago de enterobacterias 2 - 'Rnl2'	64	0
Ligasa de virus Aeh1 de <i>Aeromonas</i> - 'RNA3'	65	0
Ligasa de fago JD18 de <i>Klebsiella</i> - 'RNA6'	66	0
Ligasa de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i> - 'RNA8'	67	0,4
Ligasa de fago JSE de <i>Escherichia</i> - 'RNA9'	68	0
Ligasa de fago Acj61 de <i>Acinetobacter</i> - 'RNA16'	69	0

Ligasa de fago VH7D de <i>Vibrio</i> - 'RNA20'	70	0
Ligasa de fago JS98 de <i>Escherichia</i> - 'RNA22'	71	0
Ligasa de fago vB_EcoM_112 de <i>Escherichia</i> - 'RNA23'	72	0
Ligasa de fago CC2 de <i>Aeromonas</i> - 'RNA28'	73	0
Ligasa de fago RB69 de enterobacterias - 'RNA29'	74	0
Ligasa de fago Ac42 de <i>Acinetobacter</i> - 'RNA31'	75	0,2
Ligasa de fago CBB de <i>Pectobacterium</i> - 'RNA33'	76	0
Ligasa de fago phiAS5 de <i>Aeromonas</i> - 'RNA35'	77	0
Ligasa de fago vB_SenMS16 de <i>Salmonella</i> - 'RNA36'	78	0
Ligasa de fago KVP40 de <i>Vibrio</i> - 'RNA39'	79	0
Ligasa de virus CP220 de <i>Campilobacter</i> - 'RNA49'	80	0
Ligasa de fago phiPMW de <i>Pseudomonas</i> - 'RNA59'	81	0
Ligasa de fago vB_PaeM_C2-10_Ab1 de <i>Pseudomonas</i> - 'RNA61'	82	0,5
Ligasa de <i>Butyrivibrio proteoclasticus</i> - 'RNA82'	83	0
*Conversión (%) en producto - % de área de pico de cebador N frente a pico de producto N + 1(pi) a una longitud de onda de 258 nm		

Ejemplo 18: Extensión 3' mediante ligamiento de una sola base para la síntesis de oligonucleótidos con modificación de base de 2'H y uniones fosfato

- 5 Se fusionaron ligasas mc de tipo natural (SEQ ID NO: 63 a 83) cada una en el extremo N-terminal a una etiqueta de histidina que consistía en 6xHis. Se sintetizaron genes, se clonaron pET28a y se produjo proteína que codifica el gen en *E. coli* BL21(DE3) Star usando métodos de clonación, expresión y extracción convencionales. Se purificaron proteínas usando Ni-NTA usando métodos convencionales y se usaron directamente.
- 10 Se establecieron las reacciones según la tabla 31 a continuación, con adición de ligasa en último lugar. Se incubaron las reacciones a 25 °C durante 20 horas. Entonces se extinguieron las reacciones calentando hasta 95 °C durante 15 min, se centrifugaron a 4000 x g durante 15 min y se transfirieron 10 µl de sobrenadante a un vial de HPLC. Se analizaron entonces las reacciones mediante HPLC para detectar la presencia de SEQ ID NO: 87.

15 Tabla 31

	Concentración final en la reacción (mM)	Volumen por reacción (µl)
Cebador: (2'H) - SEQ ID NO: 86	0,125	2,5
Monómero: Adenosín-3-fosfato-5-tiofosfato (2'MOE psAp)	1	2
Adenosín trifosfato trisódico (ATP)	0,25	0,5
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	10	0,2
Ligasa - SEQ ID NO: 63 a 83		5
Tampón (Tris 20 mM, NaCl 30 mM a pH 8)		9,8
Volumen de reacción final:		20

Tabla 32: Resultados de las reacciones:

Nombre del gen	SEQ ID NO	Conversión (%) en producto*
ARN ligasa de T4 de fago de enterobacterias 1 - 'Rnl1'	63	6,3
ARN ligasa de T4 de fago de enterobacterias 2 - 'Rnl2'	64	0
Ligasa de virus Aeh1 de <i>Aeromonas</i> - 'RNA3'	65	0
Ligasa de fago JD18 de <i>Klebsiella</i> - 'RNA6'	66	2,3
Ligasa de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i> - 'RNA8'	67	5,1
Ligasa de fago JSE de <i>Escherichia</i> - 'RNA9'	68	1,1
Ligasa de fago Acj61 de <i>Acinetobacter</i> - 'RNA16'	69	0

Ligasa de fago VH7D de <i>Vibrio</i> - 'RNA20'	70	0
Ligasa de fago JS98 de <i>Escherichia</i> - 'RNA22'	71	0
Ligasa de fago vB_EcoM_112 de <i>Escherichia</i> - 'RNA23'	72	0
Ligasa de fago CC2 de <i>Aeromonas</i> - 'RNA28'	73	2,3
Ligasa de fago RB69 de enterobacterias - 'RNA29'	74	0
Ligasa de fago Ac42 de <i>Acinetobacter</i> - 'RNA31'	75	0
Ligasa de fago CBB de <i>Pectobacterium</i> - 'RNA33'	76	2,2
Ligasa de fago phiAS5 de <i>Aeromonas</i> - 'RNA35'	77	0
Ligasa de fago vB_SenMS16 de <i>Salmonella</i> - 'RNA36'	78	0
Ligasa de fago KVP40 de <i>Vibrio</i> - 'RNA39'	79	0
Ligasa de virus CP220 de <i>Campilobacter</i> - 'RNA49'	80	0
Ligasa de fago phiPMW de <i>Pseudomonas</i> - 'RNA59'	81	0
Ligasa de fago vB_PaeM_C2-10_Ab1 de <i>Pseudomonas</i> - 'RNA61'	82	1,3
Ligasa de <i>Butyrivibrio proteoclasticus</i> - 'RNA82'	83	0

*Conversión (%) en producto - % de área de pico de cebador N frente a pico de producto N + 1(pi) a una longitud de onda de 258 nm

Ejemplo 19: Extensión 3' mediante ligamiento de una sola base para la síntesis de oligonucleótidos con modificación de base de 2'MOE y uniones fosfato

- 5 Se fusionaron ligasas mc de tipo natural (SEQ ID NO: 63 a 83) cada una en el extremo N-terminal a 6xHis. Se sintetizaron genes, se clonaron en pET28a y se produjo proteína que codifica el gen en *E. coli* BL21(DE3) Star usando métodos de clonación, expresión y extracción convencionales. Se purificaron proteínas usando Ni-NTA usando métodos convencionales y se usaron directamente.
- 10 Se establecieron las reacciones según la tabla 33, con adición de ligasa en último lugar. Se incubaron las reacciones a 25 °C durante 20 horas. Entonces se extinguieron las reacciones calentando hasta 95 °C durante 15 min, se centrifugaron a 4000 x g durante 15 min y se transfirieron 10 µl de sobrenadante a un vial de HPLC. Se analizaron entonces las reacciones mediante HPLC para detectar la presencia de SEQ ID NO: 87.

15 Tabla 33

	Concentración final en la reacción (mM)	Volumen por reacción (µl)
Cebador: (2'MOE) - SEQ ID NO: 86	0,125	2,5
Monómero: Adenosín-3,5-bisfosfato (2'MOE pAp)	1	2
Adenosín trifosfato trisódico (ATP)	0,25	0,5
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	10	0,2
Ligasa - SEQ ID NO: 63 a 83		5
Tampón (Tris 20 mM, NaCl 30 mM a pH 8)		9,8
Volumen de reacción final:		20

Tabla 34: Resultados de las reacciones:

Nombre del gen	SEQ ID NO	Conversión (%) en producto*
ARN ligasa de T4 de fago de enterobacterias 1 - 'Rnl1'	63	1,4
ARN ligasa de T4 de fago de enterobacterias 2 - 'Rnl2'	64	0
Ligasa de virus Aeh1 de <i>Aeromonas</i> - 'RNA3'	65	0
Ligasa de fago JD18 de <i>Klebsiella</i> - 'RNA6'	66	3,9
Ligasa de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i> - 'RNA8'	67	8,8
Ligasa de fago JSE de <i>Escherichia</i> - 'RNA9'	68	0
Ligasa de fago Acj61 de <i>Acinetobacter</i> - 'RNA16'	69	0

Ligasa de fago VH7D de <i>Vibrio</i> - 'RNA20'	70	0
Ligasa de fago JS98 de <i>Escherichia</i> - 'RNA22'	71	0
Ligasa de fago vB_EcoM_112 de <i>Escherichia</i> - 'RNA23'	72	1,2
Ligasa de fago CC2 de <i>Aeromonas</i> - 'RNA28'	73	0
Ligasa de fago RB69 de enterobacterias - 'RNA29'	74	1,1
Ligasa de fago Ac42 de <i>Acinetobacter</i> - 'RNA31'	75	4,0
Ligasa de fago CBB de <i>Pectobacterium</i> - 'RNA33'	76	0
Ligasa de fago phiAS5 de <i>Aeromonas</i> - 'RNA35'	77	0
Ligasa de fago vB_SenMS16 de <i>Salmonella</i> - 'RNA36'	78	0
Ligasa de fago KVP40 de <i>Vibrio</i> - 'RNA39'	79	0
Ligasa de virus CP220 de <i>Campilobacter</i> - 'RNA49'	80	0
Ligasa de fago phiPMW de <i>Pseudomonas</i> - 'RNA59'	81	0
Ligasa de fago vB_PaeM_C2-10_Ab1 de <i>Pseudomonas</i> - 'RNA61'	82	1,3
Ligasa de <i>Butyrivibrio proteoclasticus</i> - 'RNA82'	83	0

*Conversión (%) en producto - % de área de pico de cebador N frente a pico de producto N + 1(pi) a una longitud de onda de 258 nm

Ejemplo 20: Optimización de la extensión 3' mediante ligamiento de una sola base para la síntesis de oligonucleótidos con modificación de base de 2'OMe y uniones fosfato

- 5 Se fusionó ligasa mc de tipo natural (SEQ ID NO: 67) en el extremo N-terminal a 6xHis. Se sintetizó el gen, se clonó en pET28a y se produjo proteína que codifica el gen en *E. coli* BL21(DE3) Star usando métodos de clonación, expresión y extracción convencionales. Se purificó la proteína usando Ni-NTA usando métodos convencionales y se usó directamente. Se determinó la concentración de proteína por medio de electroforesis capilar microfluidica.
- 10 Se establecieron las reacciones según la tabla 35, con adición de ligasa en último lugar. Se incubaron las reacciones a 25 °C durante 18 horas. Entonces se extinguieron las reacciones calentando hasta 95 °C durante 15 min, se centrifugaron a 4000 x g durante 15 min y se transfirieron 10 µl de sobrenadante a un vial de HPLC. Se analizaron entonces las reacciones mediante HPLC para detectar la presencia de SEQ ID NO: 85.

15 Tabla 35

	Concentración final en la reacción (mM)	Volumen por reacción (µl)
Cebador: (2'OMe) - SEQ ID NO: 84	0,125	2,5
Monómero: Adenosín-3,5-bisfosfato (2'OMe pAp)	1	2
Adenosín trifosfato trisódico (ATP)	0,25	0,5
Cloruro de magnesio (MgCl2)	10	0,2
Ligasa - SEQ ID NO: 67	0,025	10
Tampón (Tris 20 mM, NaCl 30 mM a pH 8)		4,8
Volumen de reacción final:		20

Tabla 36: Resultados de la reacción:

Nombre del gen	SEQ ID NO	Conversión (%) en producto*
Ligasa de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i> - 'RNA8'	67	66,9

*Conversión (%) en producto - % de área de pico de cebador N frente a pico de producto N + 1(pi) a una longitud de onda de 258 nm

20 **Ejemplo 21: Optimización de la extensión 3' mediante ligamiento de una sola base para la síntesis de oligonucleótidos con modificación de base de 2'MOE y uniones fosfato**

- 25 Se fusionó ligasa mc de tipo natural (SEQ ID NO: 67) en el extremo N-terminal a 6xHis. Se sintetizó el gen, se clonó en pET28a y se produjo proteína que codifica el gen en *E. coli* BL21(DE3) Star usando métodos de clonación, expresión y extracción convencionales. Se purificó la proteína usando Ni-NTA usando métodos convencionales y

se usó directamente. Se determinó la concentración de proteína por medio de electroforesis capilar microfluídica.

- Se establecieron las reacciones según la tabla 37, con adición de ligasa en último lugar. Se incubaron las reacciones a 25 °C durante 12 horas. Entonces se extinguieron las reacciones calentando hasta 95 °C durante 15 min, se centrifugaron a 4000 x g durante 15 min y se transfirieron 10 µl de sobrenadante a un vial de HPLC. Se analizaron entonces las reacciones mediante HPLC para detectar la presencia de SEQ ID NO: 87.

Tabla 37

	Concentración final en la reacción (mM)	Volumen por reacción (µl)
Cebador: (2'MOE) - SEQ ID NO: 86	0,125	2,5
Monómero: Adenosín-3,5-bisfosfato (2'MOE pAp)	1	2
Adenosín trifosfato trisódico (ATP)	0,25	0,5
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	10	0,2
Ligasa - SEQ ID NO: 67	0,025	10
Tampón (Tris 20 mM, NaCl 30 mM a pH 8)		4,8
Volumen de reacción final:		20

10

Tabla 38: Resultados de la reacción:

Nombre del gen	SEQ ID NO	Conversión (%) en producto*
Ligasa de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i> - 'RNA8'	67	26,0
*Conversión (%) en producto - % de área de pico de SEQ ID NO: 86 frente a pico de SEQ ID NO: 87 a una longitud de onda de 258 nm		

- Ejemplo 22: Reacciones que comparan WT con mutantes - extensión 3' mediante ligamiento de una sola base para la síntesis de oligonucleótidos con modificación de base de 2'MOE y uniones fosfato**

Se fusionaron ligasas mc de tipo natural o mutantes (SEQ ID NO: 67 y 88 a 92) cada una en el extremo N-terminal a 6xHis. Se sintetizaron genes, se clonaron en pET28a y se produjo proteína que codifica el gen en *E. coli* BL21(DE3) Star usando métodos de clonación, expresión y extracción convencionales. Se purificaron proteínas usando Ni-NTA usando métodos convencionales y se usaron directamente. Se determinó la concentración de proteína por medio de electroforesis capilar microfluídica.

Se establecieron las reacciones según la tabla 39, con adición de ligasa en último lugar. Se incubaron las reacciones a 25 °C durante 24 horas. Entonces se extinguieron las reacciones calentando hasta 70 °C durante 30 min, se centrifugaron a 4000 x g durante 15 min y se transfirieron 10 µl de sobrenadante a un vial de HPLC. Se analizaron entonces las reacciones mediante HPLC para detectar la presencia de SEQ ID NO: 87.

Tabla 39

	Concentración final en la reacción (mM)	Volumen por reacción (µl)
Cebador: (2'MOE) - SEQ ID NO: 86	0,1	3
Monómero: Adenosín-3,5-bisfosfato (2'MOE pAp)	1	3
Adenosín trifosfato trisódico (ATP)	0,25	0,68
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	10	0,3
Ligasa - SEQ ID NO: 67 o 88 a 92	0,01	7,5
Tampón (Tris 20 mM a pH 8)		15,53
Volumen de reacción final:		30

30

Tabla 40: Resultados de las reacciones:

Nombre del gen	SEQ ID NO	Conversión (%) en producto*
Ligasa de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i> - 'RNA8'	67	18,34

Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i>)	88	74,18
Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i>)	89	72,34
Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i>)	90	75,75
Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i>)	91	73,99
Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i>)	92	55,05
*Conversión (%) en producto - % de área de SEQ ID NO: 86 frente a pico de SEQ ID NO: 87 a una longitud de onda de 258 nm		

Ejemplo 23: Reacciones que comparan WT con mutantes - extensión 3' mediante ligamiento de una sola base para la síntesis de oligonucleótidos con modificación de base de 2'MOE y uniones fosforotioato

5 Se fusionaron ligasas mc de tipo natural o mutantes (SEQ ID NO: 67 y 88 a 92) cada una en el extremo N-terminal a 6xHis. Se sintetizaron genes, se clonaron en pET28a y se produjo proteína que codifica el gen en *E. coli* BL21(DE3) Star usando métodos de clonación, expresión y extracción convencionales. Se purificaron proteínas usando Ni-NTA usando métodos convencionales y se usaron directamente. Se determinó la concentración de proteína por medio de electroforesis capilar microfluídica.

10 Se establecieron las reacciones según la tabla 41, con adición de ligasa en último lugar. Se incubaron las reacciones a 25 °C durante 24 horas. Entonces se extinguieron las reacciones calentando hasta 70 °C durante 30 min, se centrifugaron a 4000 x g durante 15 min y se transfirieron 10 µl de sobrenadante a un vial de HPLC. Se analizaron entonces las reacciones mediante HPLC para detectar la presencia de SEQ ID NO: 87.

15

Tabla 41

	Concentración final en la reacción (mM)	Volumen por reacción (µl)
Cebador: (2'MOE) - SEQ ID NO: 86	0,1	3
Monómero: Adenosín-3-fosfafo-5-tiofosfato (2'OMe psAp)	1	3
Adenosín trifosfato trisódico (ATP)	0,25	0,68
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	10	0,3
Ligasa - SEQ ID NO: 67 o 88 a 92	0,01	7,5
Tampón (Tris 20 mM a pH 8)		15,53
Volumen de reacción final:		30

Tabla 42: Resultados de las reacciones:

20

Nombre del gen	SEQ ID NO	Conversión (%) en producto*
Ligasa de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i> - 'RNA8'	67	0
Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i>)	88	19,81
Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i>)	89	6,05
Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i>)	90	12,56
Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i>)	91	12,44
Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i>)	92	0
*Conversión (%) en producto - % de área de SEQ ID NO: 86 frente a pico de SEQ ID NO: 87 a una longitud de onda de 258 nm		

Ejemplo 24: Extensión 3' mediante ligamiento de una sola base para la síntesis de oligonucleótidos con modificación de base de 2'MOE y uniones fosforotioato - adenosina

25 Se fusionó ligasa mc mutante (SEQ ID NO: 88) en el extremo N-terminal a 6xHis. Se sintetizó el gen, se clonó en

pET28a y se produjo proteína que codifica el gen en *E. coli* BL21(DE3) Star usando métodos de clonación, expresión y extracción convencionales. Se purificaron proteínas usando Ni-NTA usando métodos convencionales y se usaron directamente. Se determinó la concentración de proteína por medio de electroforesis capilar microfluidica.

5

Se establecieron las reacciones según la tabla 43, con adición de ligasa en último lugar. Se incubaron las reacciones a 25 °C durante 24 horas. Entonces se extinguieron las reacciones calentando hasta 70 °C durante 30 min, se centrifugaron a 4000 x g durante 15 min y se transfirieron 10 µl de sobrenadante a un vial de HPLC. Se analizaron entonces las reacciones mediante HPLC y CLEM para detectar la presencia de SEQ ID NO: 87.

10

Tabla 43

	Concentración final en la reacción (mM)	Volumen por reacción (µl)
Cebador: (2'MOE) - SEQ ID NO: 86	0,05	10
Monómero: Adenosín-3-fosfo-5-tiofosfato (2'OMe psAp)	0,5	10
Adenosín trifosfato trisódico (ATP)	2	40
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	10	2
Ligasa - SEQ ID NO: 88	0,01	21,7
Tampón (Tris 20 mM a pH 8)		116,3
Volumen de reacción final:		200

Tabla 44: Resultados de la reacción:

15

Nombre del gen	SEQ ID NO	Conversión (%) en producto*
Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i>)	88	94,39
*Conversión (%) en producto - % de área de pico de SEQ ID NO: 86 frente a pico de SEQ ID NO: 87 a una longitud de onda de 258 nm		

Ejemplo 25: Extensión 3' mediante ligamiento de una sola base para la síntesis de oligonucleótidos con modificación de base de 2'MOE y uniones fosforotioato - 5-metilcitidina

20 Se fusionó ligasa mc mutante (SEQ ID NO: 88) en el extremo N-terminal a 6xHis. Se sintetizó el gen, se clonó en pET28a y se produjo proteína que codifica el gen en *E. coli* BL21(DE3) Star usando métodos de clonación, expresión y extracción convencionales. Se purificó la proteína usando Ni-NTA usando métodos convencionales y se usó directamente. Se determinó la concentración de proteína por medio de electroforesis capilar microfluidica.

25 Se establecieron las reacciones según la tabla 45, con adición de ligasa en último lugar. Se incubaron las reacciones a 25 °C durante 24 horas. Entonces se extinguieron las reacciones calentando hasta 70 °C durante 30 min, se centrifugaron a 4000 x g durante 15 min y se transfirieron 10 µl de sobrenadante a un vial de HPLC. Se analizaron entonces las reacciones mediante HPLC y CLEM para detectar la presencia de SEQ ID NO: 93.

30

Tabla 45

	Concentración final en la reacción (mM)	Volumen por reacción (µl)
Cebador: (2'MOE) - SEQ ID NO: 86	0,05	10
Monómero: 5-Metilcitidin-3-fosfo-5-tiofosfato (2'OMe psCp)	0,5	10
Adenosín trifosfato trisódico (ATP)	2	40
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	10	2
Ligasa - SEQ ID NO: 88	0,01	21,7
Tampón (Tris 20 mM a pH 8)		116,3
Volumen de reacción final:		200

Tabla 46: Resultados de la reacción:

Nombre del gen	SEQ ID NO	Conversión (%) en producto*
Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i>)	88	69,27
*Conversión (%) en producto - % de área de pico de SEQ ID NO: 86 frente a pico de SEQ ID NO: 93 a una longitud de onda de 258 nm		

Ejemplo 26: Extensión 3' mediante ligamiento de una sola base para la síntesis de oligonucleótidos con modificación de base de 2'MOE y uniones fosforotioato - timidina

- 5 Se fusionó ligasa mc mutante (SEQ ID NO: 88) en el extremo N-terminal a 6xHis. Se sintetizó el gen, se clonó en pET28a y se produjo proteína que codifica el gen en *E. coli* BL21(DE3) Star usando métodos de clonación, expresión y extracción convencionales. Se purificó la proteína usando Ni-NTA usando métodos convencionales y se usó directamente. Se determinó la concentración de proteína por medio de electroforesis capilar microfluídica.
- 10 Se establecieron las reacciones según la tabla 47, con adición de ligasa en último lugar. Se incubaron las reacciones a 25 °C durante 24 horas. Entonces se extinguieron las reacciones calentando hasta 70 °C durante 30 min, se centrifugaron a 4000 x g durante 15 min y se transfirieron 10 µl de sobrenadante a un vial de HPLC. Se analizaron entonces las reacciones mediante HPLC y CLEM para detectar la presencia de SEQ ID NO: 94.

15 Tabla 47

	Concentración final en la reacción (mM)	Volumen por reacción (µl)
Cebador: (2'MOE) - SEQ ID NO: 86	0,05	10
Monómero: Timidin-3-fosfato-5-tiofosfato (2'OMe psCp)	0,5	10
Adenosín trifosfato trisódico (ATP)	2	40
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	10	2
Ligasa - SEQ ID NO: 88	0,01	21,7
Tampón (Tris 20 mM a pH 8)		116,3
Volumen de reacción final:		200

Tabla 48: Resultados de la reacción:

Nombre del gen	SEQ ID NO	Conversión (%) en producto*
Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i>)	88	94,38
*Conversión (%) en producto - % de área de pico de SEQ ID NO: 86 frente a pico de SEQ ID NO: 94 a una longitud de onda de 258 nm		

20 **Ejemplo 27: Extensión 3' mediante ligamiento de una sola base para la síntesis de oligonucleótidos con modificación de base de 2'MOE y uniones fosforotioato, seguido por defosforilación en 3' y un segundo ligamiento de una sola base y segunda defosforilación - secuencia de reacción.**

- 25 Se fusionaron ligasa mc mutante (SEQ ID NO: 88) y fosfatasa de tipo natural (SEQ ID NO: 95) en el extremo N-terminal a 6xHis. Se sintetizaron genes, se clonaron en pET28a y se produjo proteína que codifica el gen en *E. coli* BL21(DE3) Star usando métodos de clonación, expresión y extracción convencionales. Se purificaron proteínas usando Ni-NTA usando métodos convencionales y se usaron directamente. Se determinó la concentración de proteína por medio de electroforesis capilar microfluídica.

- 30 Se estableció la primera reacción de ligamiento según la tabla 49, con adición de ligasa en último lugar. Se incubaron las reacciones a 25 °C durante 24 horas. Entonces se extinguieron las reacciones calentando hasta 70 °C durante 30 min, se centrifugaron a 4000 x g durante 15 min y se transfirieron 10 µl de sobrenadante a un vial de HPLC. Se analizaron entonces las reacciones mediante HPLC y CLEM para detectar la presencia de SEQ ID NO: 87. El resto de las reacciones se purificaron mediante cromatografía de intercambio iónico, se liofilizaron y se usaron directamente en la primera desprotección (es decir defosforilación).
- 35

Tabla 49

	Concentración final en la reacción (mM)	Volumen por reacción (µl)
Cebador: (2'MOE) - SEQ ID NO: 86	0,05	10
Monómero: Adenosín-3-fosfato-5-tiofosfato (2'MOE psAp)	0,5	10
Adenosín trifosfato trisódico (ATP)	2	40
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	10	2
Ligasa - SEQ ID NO: 88	0,01	21,7
Tampón (Tris 20 mM a pH 8)		116,3
Volumen de reacción final:		200

Tabla 50: Resultados de la primera reacción de ligamiento:

Nombre del gen	SEQ ID NO	Conversión (%) en producto*
Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i>)	88	94,99
*Conversión (%) en producto - % de área de pico de SEQ ID NO: 86 frente a pico de SEQ ID NO: 87 a una longitud de onda de 258 nm		

- 5 Se estableció la primera reacción de desprotección/desfosforilación según la tabla 51, con adición de fosfatasa en último lugar. Se incubaron las reacciones a 37 °C durante 24 horas. Entonces se extinguieron las reacciones calentando hasta 70 °C durante 30 min, se centrifugaron a 4000 x g durante 15 min y se transfirieron 10 µl de sobrenadante a un vial de HPLC. Se analizaron entonces las reacciones mediante HPLC y CLEM para detectar la presencia de SEQ ID NO: 96. El resto de las reacciones se purificaron mediante cromatografía de intercambio iónico, se liofilizaron y se usaron directamente en la segunda reacción de ligamiento.
- 10

Tabla 51

	Concentración final en la reacción (mM)	Volumen por reacción (µl)
Primer producto de ligamiento: (2'MOE) - SEQ ID NO: 84	0,05	10
Fosfatasa - SEQ ID NO 95	0,00036	20
Tampón (Tris 20 mM a pH 8)		170
Volumen de reacción final:		200

- 15 Tabla 52: Resultados de la primera reacción de desfosforilación:

Nombre del gen	SEQ ID NO	Conversión (%) en producto*
Secuencia de proteína de fosfatasa de tipo natural (<i>Pandalus borealis</i>) - 'SAP'	95	96,44
*Conversión (%) en producto - % de área de pico de SEQ ID NO: 85 frente a pico de SEQ ID NO: 96 a una longitud de onda de 258 nm		

- 20 Se estableció la segunda reacción de ligamiento según la tabla 53, con adición de ligasa en último lugar. Se incubaron las reacciones a 25 °C durante 24 horas. Entonces se extinguieron las reacciones calentando hasta 70 °C durante 30 min, se centrifugaron a 4000 x g durante 15 min y se transfirieron 10 µl de sobrenadante a un vial de HPLC. Se analizaron entonces las reacciones mediante HPLC y CLEM para detectar la presencia de SEQ ID NO: 96. El resto de las reacciones se purificaron mediante cromatografía de intercambio iónico, se liofilizaron y se usaron directamente en la segunda reacción de desprotección/desfosforilación.

25

Tabla 53

	Concentración final en la reacción (mM)	Volumen por reacción (µl)
Primer producto de desprotección: (2'MOE) - SEQ ID NO: 96	0,05	10
Monómero: Adenosín-3-fosfato-5-tiofosfato (2'MOE psAp)	0,5	10
Adenosín trifosfato trisódico (ATP)	2	40

Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	10	2
Ligasa - SEQ ID NO: 88	0,01	21,7
Tampón (Tris 20 mM a pH 8)		116,3
Volumen de reacción final:		200

Tabla 54: Resultados de la segunda reacción de ligamiento:

Nombre del gen	SEQ ID NO	Conversión (%) en producto*
Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i>)	88	91,15
*Conversión (%) en producto - % de área de pico de SEQ ID NO: 97 frente a pico de SEQ ID NO: 96 a una longitud de onda de 258 nm		

5 Se estableció la segunda reacción de desprotección/desfosforilación según la tabla 55, con adición de fosfatasa en último lugar. Se incubaron las reacciones a 37 °C durante 24 horas. Entonces se extinguieron las reacciones calentando hasta 70 °C durante 30 min, se centrifugaron a 4000 x g durante 15 min y se transfirieron 10 µl de sobrenadante a un vial de HPLC. Se analizaron entonces las reacciones mediante HPLC y CLEM para detectar la presencia de SEQ ID NO: 98.

10

Tabla 55

	Concentración final en la reacción (mM)	Volumen por reacción (µl)
Segundo producto de ligamiento: (2'MOE) - SEQ ID NO: 97	0,05	10
Fosfatasa - SEQ ID NO: 94	0,00036	20
Tampón (Tris 20 mM a pH 8)		170
Volumen de reacción final:		200

Tabla 56: Resultados de la segunda reacción de desfosforilación:

15

Nombre del gen	SEQ ID NO	Conversión (%) en producto*
Secuencia de proteína de fosfatasa de tipo natural (<i>Pandalus borealis</i>) - 'SAP'	95	92,63
*Conversión (%) en producto - % de área de pico de SEQ ID NO: 97 frente a pico de SEQ ID NO: 98 a una longitud de onda de 258 nm		

Ejemplo 28: Escisión específica de la cadena mediante endonucleasa para la liberación de la secuencia de oligonucleótido de segmento o de producto que tiene modificaciones de base de 2'MOE y uniones fosforotioato

20

Se fusionó endonucleasa de tipo natural (SEQ ID NO: 100) en el extremo N-terminal a CBD. Se sintetizaron genes, se clonaron en pET28a y se produjo proteína que codifica el gen en *E. coli* BL21(DE3) A1 usando métodos de clonación, expresión y extracción convencionales. Se purificaron las proteínas mediante unión a celulosa en perlas seguido por escisión con proteasa TEV usando métodos convencionales y se usaron directamente.

25

Se estableció la reacción según la tabla 58, con adición de endonucleasa en último lugar. Se incubó la reacción a 65 °C durante 16 horas. Entonces se extinguió la reacción calentando hasta 95 °C durante 5 min, se centrifugó a 4000 x g durante 15 min y se transfirieron 10 µl de sobrenadante a un vial de HPLC. Se analizó entonces la reacción mediante HPLC y CLEM para detectar la presencia de SEQ ID NO: 101 y ACTIA (modificaciones específicas establecidas en la tabla 57).

30

Tabla 57

SEQ ID NO	Secuencia
99	ACT/ideoxil/A*G*A*5mC(MOE)*5mC(MOE)*A(MOE)*5mC(MOE)*G(MOE)
101	/5phos/G*A*5mC(MOE)*5mC(MOE)*A(MOE)*5mC(MOE)*G(MOE)
N/A	ACTIA

Tabla 58

	Concentración final en la reacción (mM)	Volumen por reacción (µl)
Oligonucleótido: (2'MOE, PS) - SEQ ID NO: 99	20	2
Endonucleasa - SEQ ID NO: 100		88
Tampón (cloruro de sodio 50 mM, Tris-HCl 10 mM, cloruro de magnesio 10 mM, BSA 100 µg/ml a pH 7,9)		10
Volumen de reacción final:		100

Tabla 59: Resultados de la reacción:

5

Nombre del gen	SEQ ID NO	Conversión (%) en producto*
Endonucleasa V de <i>Archaeoglobus fulgidus</i> de tipo natural	100	47,69
*Conversión (%) en producto - % de área de pico de SEQ ID NO: 100 frente a pico de SEQ ID NO: 101 y ACTIA a una longitud de onda de 258 nm		

Conclusiones globales

10 Los inventores han demostrado que es posible sintetizar oligonucleótidos en disolución, incluyendo oligonucleótidos con una gama de modificaciones químicas terapéuticamente relevantes, partiendo de derivados de nucleósidos simples estables al agua y aire, en primer lugar mediante el uso de una enzima ARN ligasa para producir segmentos de oligonucleótidos cortos y en segundo lugar ensamblando los segmentos cortos sobre un molde complementario. Entonces, los segmentos pueden ligarse entre sí para producir un oligonucleótido de producto que puede separarse tanto de las impurezas como de su molde complementario en un proceso eficiente que es escalable y adecuado para la fabricación de oligonucleótidos terapéuticos a gran escala.

20 Al sintetizar oligonucleótidos en disolución, los inventores han evitado las restricciones del aumento de escala impuestas por los métodos en fase sólida. Al usar las propiedades inherentes del ADN para reconocer secuencias complementarias específicamente y unirse a secuencias complementarias con una afinidad que refleja tanto la fidelidad de la secuencia complementaria como la longitud de la secuencia complementaria, los inventores han sido capaces de producir oligonucleótidos de alta pureza sin necesidad de cromatografía, lo que mejora tanto la eficiencia del proceso de producción como la escalabilidad del proceso. Al recuperar el molde en un estado sin cambios durante el proceso de separación, los inventores son capaces de reutilizar el molde para rondas adicionales de síntesis y así han evitado las consecuencias económicas de tener que preparar un equivalente de molde por cada equivalente de oligonucleótido de producto formado.

30 Finalmente, aunque se sabe que las ligasas de tipo natural ligan ADN y ARN normales de manera eficaz, se ha demostrado que modificaciones en el ADN o el ARN dan como resultado una disminución de la eficiencia de ligamiento y que múltiples modificaciones en el ADN o el ARN tienen un efecto aditivo en la disminución de la eficiencia de ligamiento que puede hacer, en algunos casos, que la ADN o ARN ligasa sea completamente ineficaz. Se ha demostrado que, mediante la mutación y evolución apropiadas de ADN y ARN ligasas, puede restaurarse la eficiencia de ligamiento y que ADN y ARN ligasas modificadas apropiadamente son catalizadores eficaces para sintetizar oligonucleótidos que contienen múltiples modificaciones.

35 LISTA DE SECUENCIAS

SEQ ID NO	Identificador de secuencia
1	Secuencia de oligonucleótido de producto deseado del ejemplo 1 ("diana")
2	Secuencia de oligonucleótido molde de los ejemplos 1-4, 6, 10 y 11
3	Secuencia de proteína de ADN ligasa de T4 de tipo natural
4	Secuencia de proteína de ADN ligasa de T4 de tipo natural (cuando está fusionada a CBD)
5	Secuencia diana del ejemplo 2
6	Secuencia de proteína de ADN ligasa de fago CC31 de enterobacterias de tipo natural
7	Secuencia de proteína de ADN ligasa de fago CC31 de enterobacterias de tipo natural (cuando está fusionada a CBD)
8	Secuencia de proteína de ADN ligasa de fago Shf125875 de <i>Shigella</i> de tipo natural
9	Secuencia de proteína de ADN ligasa de fago Shf125875 de <i>Shigella</i> de tipo natural (cuando está fusionada a CBD)

ES 2 914 591 T3

10	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de T4)
11	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de T4)
12	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de T4)
13	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de T4)
14	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de T4)
15	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de T4)
16	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de T4)
17	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de T4)
18	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de T4)
19	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de T4)
20	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de T4)
21	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de T4)
22	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de T4)
23	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago CC31 de enterobacterias - clon A4)
24	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago CC31 de enterobacterias)
25	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago CC31 de enterobacterias)
26	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago CC31 de enterobacterias)
27	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago CC31 de enterobacterias)
28	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago Shf125875 de <i>Shigella</i>)
29	Secuencia de proteína de ligasa de <i>Chlorella</i> de tipo natural
30	Secuencia de oligonucleótido molde de los ejemplos 5, 8 y 9
31	Secuencia de oligonucleótido molde del ejemplo 5
32	Secuencia de oligonucleótido molde del ejemplo 5
33	Secuencia de oligonucleótido molde del ejemplo 5
34	Secuencia de oligonucleótido molde del ejemplo 5
35	Secuencia de oligonucleótido molde del ejemplo 5
36	Secuencia de oligonucleótido molde del ejemplo 5
37	Secuencia de oligonucleótido molde del ejemplo 5
38	Secuencia de oligonucleótido molde del ejemplo 5
39	Secuencia de oligonucleótido molde del ejemplo 5
40	Secuencia de oligonucleótido molde del ejemplo 5
41	Secuencia de oligonucleótido molde del ejemplo 5
42	Secuencia de oligonucleótido molde del ejemplo 5
43	Secuencia de oligonucleótido molde del ejemplo 5
44	Secuencia de oligonucleótido molde del ejemplo 5
45	Secuencia de oligonucleótido molde del ejemplo 5
46	Secuencia de oligonucleótido de "20 meros" del ejemplo 14
47	Secuencia de oligonucleótido molde del ejemplo 7
48	Ligasa de virus de <i>Chlorella</i> de <i>Paramecium bursaria</i> NE-JV-4
49	Ligasa de virus de <i>Chlorella</i> de <i>Paramecium bursaria</i> NYs1
50	Ligasa de virus de <i>Chlorella</i> de <i>Paramecium bursaria</i> NE-JV-1
51	Ligasa de virus de <i>Chlorella</i> de <i>Acanthocystis turfacea</i> Canal-1
52	Ligasa de virus de <i>Chlorella</i> de <i>Acanthocystis turfacea</i> Br0604L
53	Ligasa de virus de <i>Chlorella</i> de <i>Acanthocystis turfacea</i> NE-JV-2
54	Ligasa de virus de <i>Chlorella</i> de <i>Acanthocystis turfacea</i> TN603.4.2
55	Ligasa de virus de <i>Chlorella</i> de <i>Acanthocystis turfacea</i> GM0701.1

ES 2 914 591 T3

56	Ligasa de fago S-CRM01 de <i>Synechococcus</i>
57	Ligasa de metagenoma de sedimento marino
58	Ligasa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (cepa ATCC 25618/H37Rv)
59	Ligasa de <i>Enterococcus faecalis</i> (cepa ATCC 700802/V583)
60	Ligasa de <i>Haemophilus influenzae</i> (cepa ATCC 51907/DSM 11121/ KW20/Rd)
61	Ligasa de <i>Staphylococcus aureus</i>
62	Ligasa de <i>Streptococcus pneumoniae</i> (cepa P1031)
63	Secuencia de proteína de ARN ligasa 1 de fago T4 de enterobacterias de tipo natural - 'Rnl1'
64	Secuencia de proteína de ARN ligasa 2 de fago T4 de enterobacterias de tipo natural - 'Rnl2'
65	Secuencia de proteína de ligasa de virus Aeh1 de <i>Aeromonas</i> de tipo natural - 'RNA3'
66	Secuencia de proteína de ligasa de fago JD18 de <i>Klebsiella</i> de tipo natural - 'RNA6'
67	Secuencia de proteína de ligasa de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i> de tipo natural - 'RNA8'
68	Secuencia de proteína de ligasa de fago JSE de <i>Escherichia</i> de tipo natural - 'RNA9'
69	Secuencia de proteína de ligasa de fago Acj61 de <i>Acinetobacter</i> de tipo natural - 'RNA16'
70	Secuencia de proteína de ligasa de fago VH7D de <i>Vibrio</i> de tipo natural - 'RNA20'
71	Secuencia de proteína de ligasa de fago JS98 de <i>Escherichia</i> de tipo natural - 'RNA22'
72	Secuencia de proteína de ligasa de fago vB_EcoM_112 de <i>Escherichia</i> de tipo natural - 'RNA23'
73	Secuencia de proteína de ligasa de fago CC2 de <i>Aeromonas</i> de tipo natural - 'RNA28'
74	Secuencia de proteína de ligasa de fago RB69 de enterobacterias de tipo natural - 'RNA29'
75	Secuencia de proteína de ligasa de fago Ac42 de <i>Acinetobacter</i> de tipo natural - 'RNA31'
76	Secuencia de proteína de ligasa de fago CBB de <i>Pectobacterium</i> de tipo natural - 'RNA33'
77	Secuencia de proteína de ligasa de fago phiAS5 de <i>Aeromonas</i> de tipo natural - 'RNA35'
78	Secuencia de proteína de ligasa de fago vB_SenMS16 de <i>Salmonella</i> de tipo natural - 'RNA36'
79	Secuencia de proteína de ligasa de fago KVP40 de <i>Vibrio</i> de tipo natural - 'RNA39'
80	Secuencia de proteína de ligasa de virus CP220 de <i>Campilobacter</i> de tipo natural - 'RNA49'
81	Secuencia de proteína de ligasa de fago phiPMW de <i>Pseudomonas</i> de tipo natural - 'RNA59'
82	Secuencia de proteína de ligasa de fago vB_PaeM_C2-10_Ab1 de <i>Pseudomonas</i> de tipo natural - 'RNA61'
83	Secuencia de proteína de ligasa de <i>Butyrivibrio proteoclasticus</i> de tipo natural - 'RNA82'
84	Secuencia de oligonucleótido cebador de los ejemplos 15 y 16
85	Secuencia de oligonucleótido de producto de los ejemplos 15 y 16
86	Secuencia de oligonucleótido cebador del ejemplo 17
87	Secuencia de oligonucleótido de producto del ejemplo 17
88	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i>)
89	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i>)
90	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i>)
91	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i>)
92	Secuencia de proteína de ligasa mutante (estructura principal de fago IME13 de <i>Stenotrophomonas</i>)
93	Secuencia de oligonucleótido de producto del ejemplo 26
94	Secuencia de oligonucleótido de producto del ejemplo 26
95	Secuencia de proteína de fosfatasa de tipo natural (<i>Pandalus borealis</i>) - 'SAP'
96	Secuencia de oligonucleótido de producto del ejemplo 27
97	Secuencia de oligonucleótido de producto del ejemplo 27
98	Secuencia de oligonucleótido de producto del ejemplo 27
99	Secuencia de oligonucleótido de producto del ejemplo 28

ES 2 914 591 T3

100	Endonucleasa V de <i>Archaeoglobus fulgidus</i> de tipo natural
101	Secuencia de oligonucleótido de producto del ejemplo 28

SEQ ID NO: 1

GGCCAAACCTCGGCTTACCT

5

SEQ ID NO: 2

TTTAGGTAAGCCGAGGTTTGGCC

10 SEQ ID NO: 3

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGLTLTDMLDIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQLASSYDEKGINKNIK
 PAFAPQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGDLLEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKE
 PEGLDLFLDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIDVLDKIVGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

15 SEQ ID NO: 4

GSILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGLTLTDMLDIEFTL
 ATRKLTGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQLASSYDEKGINKNIK
 FPAPQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGDLLEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKK
 EPEGLDFLDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYD
 RFSKLEQMTSGYDKVILIQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIDVLDKIVGIY
 YPHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
 VKLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO: 5

20 GGC CAA ACC UCG GCU UAC CU

SEQ ID NO: 6

25

MILDIINEIASIGSTKEKEAIIRRHKDNELLKRVFRMTYDGKLQYYIKKWDTRPKGDIHLTLEDMLYLLEEKLAKRV
 VTGNAAKEKLEIALSQTSDADADEVKVKVLLRDLRCGASRSIANKVWKNLIPEQPQLASSYDEKGIEKNIKFPAPA
 QLKADGARAFAEVRGDELDDVKILSRAGNEYLGDLLEKQQLIEMTKEARERHPGGVMIDGELVYHASTLPAGPLD
 DIFGDLPELSKAKEFKEESRTMSNGLANKSLKGTISAKEAAGMKFQVWDYVPLDVVYSEGKQSGFAYDVRFRAL
 LMVQGYSQMILIHVHNLDEAKVIYRKYVDEGLEIILKNIGAFWENTRSKNLYKFKEVITIDLRIVDIYEHKQ
 PGKAGGFYLESECGLIKVKAGSGLKDKPGKDAHELDRTRIWENKNDYIGGVLESECNGLAAEGRTDYVKLFLPI
 AIKMRRDKDVANTFADIWGFHEVTGL

SEQ ID NO: 7

GSILDIINEIASIGSTKEKEAIIRRHKDNELLKRVRMTYDGKLYYIKKWDTRPKGDIHLTLEDMLYLLEEKLAKR
VVTGNAAKEKLEIALSQTSDADADEVKVKLLRDLRCGASRSIANKVWKNLIPEQPQMLASSYDEKGIEKNIKFPAP
AQLKADGARAFAEVRGDELDDVKILSRAGNEYLGLDLLKQQLIEMTKEARERHPGGVMIDGELVYHASTLPAGPL
DDIFGDLPELSKAKEFKEESRTMSNGLANKSLKGTISAKEAAGMKFQVWDYVPLDVVYSEGKQSGFAYDVRFRA
LELMVQGYSQMILIHVHNLDEAKVIYRKYVDEGLEGIILKNIGAFWENTRSKNLYKFKEVITIDLRIVDIYEHS
KQPGKAGGFYLESEGLIKVKAGSGLKDKPGKDAHELDRTRIWENKNDYIGGVLESECNGWLAEGRTDYVKLF
LPPIAKMRRDKDVANTFADIWGFHEVTGL

SEQ ID NO: 8

MILDILNQIAAIGSTKTKQEILKKNKDNKLLERVYRLTYARGIQYYIKKWPGPERSQAYGELLEDDMLDFIEFTLA
TRKLTGNAAIKELMGYIADGKPDDEVLRVMMRDLEVGASVSIANKVWPGLIQLQPQMLASAYDEKLITKNIK
WPAFAQLKADGARCFAEVRDDGVQFFSRAGNEYHGLTLLADELMENTKEARERHPNGVLIDGELVYHSFDIKKA
VSSGNDLSFLFGDNEESEEVQVADRSTSNGLANKSLQGTISPKEAEGMVLQAWDYVPLDEVYSDGKIKGQKYDV
RFAALENMAEGFKRIEPIENQLVHNLDEAKVYKYVDQGLEGIILKNRDSYWENKRSKNLIKFEVIDIALEVVG
YYEHSKDPNKLGGVELVSRCRITTDGSGFKDTHKTVDGVKVLIPDERHDLDRERLMAEAREGKLGRIADC
ECNGWVHSHKREGTVGIFLPIIKGFRFDKTEADSFEDVFGPWSQTGL

5

SEQ ID NO: 9

GSILDILNQIAAIGSTKTKQEILKKNKDNKLLERVYRLTYARGIQYYIKKWPGPERSQAYGELLEDDMLDFIEFTL
ATRKLTGNAAIKELMGYIADGKPDDEVLRVMMRDLEVGASVSIANKVWPGLIQLQPQMLASAYDEKLITKNIK
WPAFAQLKADGARCFAEVRDDGVQFFSRAGNEYHGLTLLADELMENTKEARERHPNGVLIDGELVYHSFDIKKA
VSSGNDLSFLFGDNEESEEVQVADRSTSNGLANKSLQGTISPKEAEGMVLQAWDYVPLDEVYSDGKIKGQKYDV
RFAALENMAEGFKRIEPIENQLVHNLDEAKVYKYVDQGLEGIILKNRDSYWENKRSKNLIKFEVIDIALEVVG
YYEHSKDPNKLGGVELVSRCRITTDGSGFKDTHKTVDGVKVLIPDERHDLDRERLMAEAREGKLGRIADC
ECNGWVHSHKREGTVGIFLPIIKGFRFDKTEADSFEDVFGPWSQTGL

10

SEQ ID NO: 10

MILKILNEIASIGSTKQKQAIKKNKDNELLKRVRMTYDGLQYYIKKWPKPGIATQSFGLTLDMLDFIEFTLA
TRKLTGNAAIEELTGYYITDGKDDDEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIK
PAPAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLDGELVYHEQVKKE
PEGLDFLFDAYPENSKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
FSKLEQMTSGYDKVILIQVNNLDEAKVIYKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKRVIDVDLKVIGY
PHRKDPTKAGGFIESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRTDYV
KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

15

SEQ ID NO: 11

MILKILNEIASIGSTKQKQAIKKNKDNELLKRVRMTYDGLQYYIKKWPKPGIATQSFGLTLDMLDFIEFTLA
TRKLTGNAAIEELTGYYITDGKDDDEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIK
PAPAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLDGELVYHEQVKKE
PEGLDFLFDAYPENSKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
FSKLEQMTSGYDKVILIQVNNLDEAKVIYKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKGVIDVDLKVIGY
PHRKDPTKAGGFIESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRTDYV
KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO: 12

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKPGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
TRKLTGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQLASSYDEKGINKNIKF
PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
PEGLDFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
FSKLEQMTSGYDKVILIENQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFVKVIDVLDKIVGIY
PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

5 SEQ ID NO: 13

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKPGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
TRKLTGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQLASSYDEKGINKNIKF
PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
PEGLDFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
FSKLEQMTSGYDKVILIENQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVILVDLKIVGIY
PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO: 14

10

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKPGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
TRKLTGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQLASSYDEKGINKNIKF
PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
PEGLDFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
FSKLEQMTSGYDKVILIENQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIKVDLKIVGIY
PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO: 15

15

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKPGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
TRKLTGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQLASSYDEKGINKNIKF
PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
PEGLDFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
FSKLEQMTSGYDKVILIENQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIQVDLKIVGIY
PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO: 16

20

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKPGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
TRKLTGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQLASSYDEKGINKNIKF
PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGDLLEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
PEGLDFLFDAYPENSKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
FSKLEQMTSGYDKVILIENQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIVDLKIVGIY
PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO: 17

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKPGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
TRKLTGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQLASSYDEKGINKNIKF
PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGDLLEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
PEGLDFLFDAYPENSKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
FSKLEQMTSGYDKVILIENQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIRVLDKIVGIY
PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

5

SEQ ID NO: 18

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKPGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
TRKLTGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQLASSYDEKGINKNIKF
PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGDLLEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
PEGLDFLFDAYPENSKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
FSKLEQMTSGYDKVILIENQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEAIDVLDKIVGIY
PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

10

SEQ ID NO: 19

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKPGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
TRKLTGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQLASSYDEKGINKNIKF
PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGDLLEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
PEGLDFLFDAYPENSKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
FSKLEQMTSGYDKVILIENQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEIDVLDKIVGIY
PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

15

SEQ ID NO: 20

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKPGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
TRKLTGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQLASSYDEKGINKNIKF
PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGDLLEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
PEGLDFLFDAYPENSKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
FSKLEQMTSGYDKVILIENQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIVDLKIVGIY
PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO: 21

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKPGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
TRKLTGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQLASSYDEKGINKNIKF
PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
PEGLDFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
FSKLEQMTSGYDKVILIQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKKVIKIDLVKIVGIY
PHRKDPTKAGGFIESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYYV
KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO: 22

5

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKPGIATQSFGLTLTDMDFIEFTLA
TRKLTGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQLASSYDEKGINKNIKF
PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
PEGLDFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
FSKLEQMTSGYDKVILIQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKKVIKIDLVKIVGIY
PHRKDPTKAGGFIESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYYV
KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO: 23

10

MILDIINEIASIGSTKEKEAIIRRHKDNELLKRVFRMTYDGKLQYYIKKWDTRPKGDIHLTLEDMLYLLEEKLAKRV
VTGNAAKEKLEIALSQTSDADADEVKVLRLDLRCGASRSIANKVWKNLIPEQPQLASSYDEKGIEKNIKFPAPA
QLKADGARAFAEVRGDELDDVKILSRAGNEYLGLDLLKQQLIEMTKEARERHPGGVMIDGELVYHASTLPAGPLD
DIFGDLPELSKAKEFKEESRTMSNGLANKSLKGTISAKEAAGMKFQVWDYVPLDVVYSEGKQSGFAYDVRFRAL
LMVQGYSQMILIHVHNLDEAKVIYRKYVDEGLEGIILKNIGAFWENTRSKNLYKFKRVIVIDLIVDIYEHKQ
PGKAGGFYLESECGLIKVKAGSGLKDKPGKDAHELDRTRIWENKNDYIGGVLESECNGWLAEGRTDYVKLFLPI
AIKMRRDKDVANTFADIWGFHEVTGL

SEQ ID NO: 24

15

MILDIINEIASIGSTKEKEAIIRRHKDNELLKRVFRMTYDGKLQYYIKKWDTRPKGDIHLTLEDMLYLLEEKLAKRV
VTGNAAKEKLEIALSQTSDADADEVKVLRLDLRCGASRSIANKVWKNLIPEQPQLASSYDEKGIEKNIKFPAPA
QLKADGARAFAEVRGDELDDVKILSRAGNEYLGLDLLKQQLIEMTKEARERHPGGVMIDGELVYHASTLPAGPLD
DIFGDLPELSKAKEFKEESRTMSNGLANKSLKGTISAKEAAGMKFQVWDYVPLDVVYSEGKQSGFAYDVRFRAL
LMVQGYSQMILIHVHNLDEAKVIYRKYVDEGLEGIILKNIGAFWENTRSKNLYKFKKVIKIDLVKIVDIYEHKQ
PGKAGGFYLESECGLIKVKAGSGLKDKPGKDAHELDRTRIWENKNDYIGGVLESECNGWLAEGRTDYVKLFLPI
AIKMRRDKDVANTFADIWGFHEVTGL

SEQ ID NO: 25

20

MILDIINEIASIGSTKEKEAIIRRHKDNELLKRVFRMTYDGKLQYYIKKWDTRPKGDIHLTLEDMLYLLEEKLAKRV
VTGNAAKEKLEIALSQTSDADADEVKVLRLDLRCGASRSIANKVWKNLIPEQPQLASSYDEKGIEKNIKFPAPA
QLKADGARAFAEVRGDELDDVKILSRAGNEYLGLDLLKQQLIEMTKEARERHPGGVMIDGELVYHASTLPAGPLD
DIFGDLPELSKAKEFKEESRTMSNGLANKSLKGTISAKEAAGMKFQVWDYVPLDVVYSEGKQSGFAYDVRFRAL
LMVQGYSQMILIHVHNLDEAKVIYRKYVDEGLEGIILKNIGAFWENTRSKNLYKFKKVIKIDLVKIVDIYEHKQ
PGKAGGFYLESECGLIKVKAGSGLKDKPGKDAHELDRTRIWENKNDYIGGVLESECNGWLAEGRTDYVKLFLPI
AIKMRRDKDVANTFADIWGFHEVTGL

SEQ ID NO: 26

MILDIINEIASIGSTKEKEAIIRRHKDNELLKRVRMTYDGKLQYYIKKWDTRPKGDIHLTLEDMLYLLEEKLAKRV
VTGNAAKEKLEIALSQTSDADADEVKVKLLRDLRCGASRSIANKVWKNLIPEQPQMLASSYDEKGIEKNIKFPFAFA
QLKADGARAFAEVRGDELDDVKILSRAGNEYLGLDLLKQQLIEMTKEARERHPGGVMIDGELVYHASTLPAGPLD
DIFGDLPELSKAKEFKEESRTMSNGLANKSLKGTISAKEAAGMKFQVWDYVPLDVVYSEGKQSGFAYDVRFRALE
LMVQGYSQMILIENHIVHNLDEAKVIYRKYVDEGLEGIILKNIGAFWENTRSKNLYKFKGVILIDLRIVDIYEHSKQ
PGKAGGFYLESECGLIKVKAGSGLKDKPGKDAHELDRTRIWENKNDYIGGVLESECNGWLAEGRTDYVKLFLPI
AIKMRRDKDVANTFADIWGFHEVTGL

5

SEQ ID NO: 27

MILDIINEIASIGSTKEKEAIIRRHKDNELLKRVRMTYDGKLQYYIKKWDTRPKGDIHLTLEDMLYLLEEKLAKRV
VTGNAAKEKLEIALSQTSDADADEVKVKLLRDLRCGASRSIANKVWKNLIPEQPQMLASSYDEKGIEKNIKFPFAFA
QLKADGARAFAEVRGDELDDVKILSRAGNEYLGLDLLKQQLIEMTKEARERHPGGVMIDGELVYHASTLPAGPLD
DIFGDLPELSKAKEFKEESRTMSNGLANKSLKGTISAKEAAGMKFQVWDYVPLDVVYSEGKQSGFAYDVRFRALE
LMVQGYSQMILIENHIVHNLDEAKVIYRKYVDEGLEGIILKNIGAFWENTRSKNLYKFKRVIFIDLRIVDIYEHSKQ
PGKAGGFYLESECGLIKVKAGSGLKDKPGKDAHELDRTRIWENKNDYIGGVLESECNGWLAEGRTDYVKLFLPI
AIKMRRDKDVANTFADIWGFHEVTGL

10 SEQ ID NO: 28

MILDILNQIAAIGSTKTQEIILKKNKDNKLLERVYRLTYARGIQYYIKKWPGPERSQAYLLELDDMLDFIEFTLA
TRKLTGNAAIKELMGYIADGKPDDEVLRVMMRDLEV GASVSIANK/WPGLIQLQPQLASAYDEKLITKNIK
WPAFAQLKADGARCFAEVRDDGVQFFSRAGNEYHGLTLLADEL MEMTKEARERHPNGVLIDGELVYHSFDIKKA
VSSGNDLSFLFGDNEESEEVQVADRSTSNGLANKSLQGTISPKEAEGMVLQAWDYVPLDEVYSDGKIKGQKYDV
RFAALENMAEGFKRIEPIENQLVHNLDEAKVYKYVDQGLEGIILKNRDSYWENKRSKNLIKFKRVIVIALEVVG
YYEHSKDPNKLGGVELVSRCRITTDGSGFKDTHKTVDGVKVLIPLDERHDLDRERLMAEAREGLIGRIADC
ECNGVWHSHKGREGTVGIFLPIIKGFRFDKTEADSFEDVFGPWSQTGL

15 SEQ ID NO: 29

MAITKPLLAATLENIEDVQFPCLATPKIDGIRSVKQTQMLSRTFKPIRNSVMNRLLTELLPEGS DGEISIEGATFQD
TTSAVMTGHKMYNAKFSYYWFDYVTD DPLKKYIDRVEDMKNYITVHPHILEHAQVKIIPLIPVEINNITELLQYER
DVLSKGFEGVMIRKPDGKYKFRSTLKEGILLKMKQFKDAEATIISMTALFKNTNTKTDFNGYSKRSTHKS GKV
EEDVMGSIEVDYDGVVFSIGTGFADQRRDFWQNKESYIGKMKVFKFYFEMGSKDCPRFPVFIGIRHEEDR

SEQ ID NO: 30

20 TTTGGTGCGAAGCAGACTGAGGC

SEQ ID NO: 31

25 TTTGGTGCGAAGCAGAGTGAGGC

SEQ ID NO: 32

TTTGGTGCGAAGCAGATTGAGGC

30 SEQ ID NO: 33

TTTGGTGCGAAGCAGAATGAGGC

SEQ ID NO: 34
TTTGGTGCGAAGCAGTCTGAGGC
5

SEQ ID NO: 35
TTTGGTGCGAAGCAGTGTGAGGC
10

SEQ ID NO: 36
TTTGGTGCGAAGCAGTTTGAGGC
15

SEQ ID NO: 37
TTTGGTGCGAAGCAGTATGAGGC
20

SEQ ID NO: 38
TTTGGTGCGAAGCAGCCTGAGGC
25

SEQ ID NO: 39
TTTGGTGCGAAGCAGCGTGAGGC
30

SEQ ID NO: 40
TTTGGTGCGAAGCAGCTTGAGGC
35

SEQ ID NO: 41
TTTGGTGCGAAGCAGCATGAGGC
40

SEQ ID NO: 42
TTTGGTGCGAAGCAGGCTGAGGC
45

SEQ ID NO: 43
TTTGGTGCGAAGCAGGGTGAGGC
50

SEQ ID NO: 44
TTTGGTGCGAAGCAGGTTGAGGC
55

SEQ ID NO: 45
TTTGGTGCGAAGCAGGATGAGGC
60

SEQ ID NO: 46
GCCUCAGTCTGCTTCGCACC

SEQ ID NO: 47
TTTGGTGCGAAGCAGAAGGTAAGCCGAGGTTTGCC

SEQ ID NO: 48
MAITKPLLAATLENIEDVQFPCLATPKIDGIRSVKQTQMLSRTFKPIRNSVMNRLLTELLPEGSDGEISIEGATFQD
TTSAVMTGHKMYNAKFSYWFYVTDPLKYSRVEDMKNYITAHPHILDHEQVKIIPVEINNITELLQYE
RDVLSKGFEGVMIRKPDGKYKFRSTLKEGILLKMKQFKDAEATIISMTALFKNTNTKTKDNFGYSKRSTHKNK
VEEDVMGSIEVDYDGVVFSIGTFDADQRRDFWQNKESYIGKMKVFKYFEMGSKDCPRFPVFIGIRHEEDH

SEQ ID NO: 49

MTIAKPLLAATLENLDDVKFPCLVTPKIDGIRSLKQQHMLSRTFKPIRNSVMNKLLSELLPEGADGEICIEDSTFQA
TTSAVMTGHKVYDEKFSYYWFDYVDDPLKSYTDRVNDMKKYVDDHPHILEHEQVKIPLIPVEINNIDELSQYE
RDVLAKGFEGVMIRRPDGKYKFRSTLKEGILLKMKQFKDAEATIISMSPRLKNTNAKSKDNLGYSKRSTHKS
VEEETMGSIEVDYDGVVFSIGTGFDDQQRKHFENKDSYIGKLLKFKYFEMGSKDAPRFPVFIGIRHEEDC

5 SEQ ID NO: 50

MTAIQKPLLAASFKCLTVADV KYPVFATPKLDGIRALKIDGAFVSRTFKPIRNRAIADALQDLLPNGSDGEILSGST
FQDASSAVMTAKAGIGANTIFYWFDYVDDPNKPYLDRMTDMENYLKERPEILNDDRIKIVPLIPKKIETKDELD
TFEKICLDQGFEGVMIRSGAGKYKFRSTEKEGILIKIKQFEDDEAVVIGFTPMQNTNTDKSMNELGDMKRSSH
DGKVNLDTLGALEVDWNGITFSIGTGFHDHALRDKLWSEKDKLIGKIVKFKYFAQGVKTAPRFPVFIGFRDPDDM

SEQ ID NO: 51

10

MAIQKPLLAASLKKMSVGLTFPVFATPKLDGIRALKVGGTIVSRTFKPVRNSAISEVLASILPDGSDGEILSGKTF
QESTSTVMTADAGLGSMTFFWFDYVDDPNKGYLDRIADMKSFTDRHPEILKDKRVTIVPLFPKKIDTTEELHE
FEKWCLDQGFEGVMVRNAGGKYKFRSTEKEQILVKIKQFEDDEAVVIGVSALQNTNTDKKLNQLGEMRRTSH
QDGKVELEMLGALDWDWNGIRFSIGTGFDRDTRVDLWKRREGVIGKIVKFKYFSQGIKTAPRFPVFLGFRDKDD
M

SEQ ID NO: 52

15

MAIQKPLLAASLKKLSVDDLTFPVYATPKLDGIRALKIDGTLVSRTFKPIRNTTISKVLTSLLPDGS DGEILSGKTFQ
DSTSTVMSADAGIGSGTFFWFDYVDDPNKGYLDRIADIKKFIDCRPEILKDSRVIVPLFPKKIDTAEELNVFEK
WCLDQGFEGVMVRNAGGKYKFRSTEKEQILVKIKQFEDDEAVVIGVSALQNTNTDKKVNELGEMRRTSHQDG
KVDLDMGLALDWDWNGIRFGIGTGFDKDTREDLWKRDSIIGKIVKFKYFSQGVKTAPRFPVFLGFRDKNDM

SEQ ID NO: 53

20

MAIQKPLLAASLKKLSVDDLTFPVYATPKLDGIRALKIDGTLVSRTFKPIRNTTISNVLSLLPDGS DGEILSGKTF
QDSTSTVMSADAGIGSGTFFWFDYVDDPNKGYLDRIADMKKFVDSHPEILKDRRVTVPLIPKKIDTVEELNV
FEQWCLDQGFEGVMVRNAGGKYKFRSTEKEQILVKIKQFEDDEAVVIGVSALQNTNVNDKKNELGDMRRTSH
KDGKIDLEMLGALDVEWNGIRFGIGTGFDKDTREDLWKRDSIIGKVVKFKYFSQGIKTAPRFPVFLGFRDEND
M

SEQ ID NO: 54

MAIQKPLLAASLKKMSVDNLTFPVYATPKLDGIRALKIDGTLVSRTFKPIRNTTISKVLASLLPDGS DGEILSGKTF
QDSTSTVMTDAGIGSDTFFWFDYVDDPNKGYLDRIADMKTVDQHPHILEHEQVKIPLIPVEINNIDELSQYE
FEKWCLDQGFEGVMVRTAGGKYKFRSTEKEQILVKIKQFEDDEAVVIGVSALQNTNTDKKLNQLGEMRRTSH
QDGKVDLDMGLALDWDWNGIRFSIGTGFDKDTREDLWKRDSIVGKVVKFKYFSQGIKTAPRFPVFLGFRDEN
DM

25

SEQ ID NO: 55

MAIQKPLLAASLKKMSVDDLTFPVYTPKLDGIRALKIDGTLVSRFTKPVNSAISEVLASLLPDGSDGEILSGKTF
QDSTSTVMTTDAGIGSDTTFFWFDYVKDDPNKGYLDRIADMKTFIDQHPEMLKDNHV/TIVPLIPKIDTVEELNI
FEKWCLDQGFEGVMVRNAGGKYKFRSTEKEQILVKIKQFEDDEAVVIGVSALQNTNTDKKLNQLGEMRRTSH
QDGKIDLEMLGALDVDWNGIRFSIGTGFDRDTRVDLWKRRDGIVGRTIKFKYFGQGIKTAPRFPVFLGFRDKDD
M

SEQ ID NO: 56

MLAGNFDPKKAKFPYC ATPKIDGIRFLMVNGRALSRTFKPIRNEYIQKLLSKHLPDGIDGELTCGDTFQSSTS AIM
RIAGEPDKAWIFDYVDPDSTILPFIERFDQISDIYNGPIPFKHQVLGQSILYNIDDLNRYEEACLNEGVEGVM L
RDPYGYTKFRSSTNEGILLKVKRFEDAEATVIRIDEKMSNQNIAEKDNFGRTRKRSSCLDGMVPMETT GALFVRN
SDGLEFSIGSGLNDEMREIWKNKSSYIGKLVKYKYPQGVKDLPRHPVFLGFRDPDDM

5

SEQ ID NO: 57

MDAHELMKLN EY AERQNKQKQITKPLAASLKDITQLDYSKGYLATQKLDGIRALMIDGKLVSRFTKPIRNN
HIREMLEVDLPDGADGEIVCPGAFQATSSGVMSANGEPEFIYMFYVVKDDITKEYWRRTQDMVQWLNQGP T
RTPGLSKLKL VPTLIKNDHLKTYETECIDKGFEGVILRTPDSPYKGRSTAKQEWLLKLRKFADDEAVVIGFTEK
MHNDNEATKDKFGHTVRSSHENKRPAGTLGSLIVRDIKTEIEFEIGTGFDEL RQKIWDARPEWDGLCVKYKH
FAISGVKEKPRFSPFIGVRDVEDM

10

SEQ ID NO: 58

MSSPDADQTAPEVLRQWQALAEVREHQFRYYVRDAPIIISDAEFDELLRRLEALEEQHP ELRTPDSPTQLVGG A
GFATDFEPVDHLERMLSLDNAFTADELA AWAGRIHAEVGDAAHYLC ELKIDGVALSLVYREGRLTRASTRGDGR
TGEDVTLNARTIADVPERLTPGDDYPVPEVLEVRGEVFFRLDDFQALNASLVEEGKAPFANPRNSAAGSLRQKDP
AVTARRRLRMICHGLGHVEGFRPATLHQAYLALRAWGLPVSEHTLATDLAGVRERIDYWG EHRHEVDHEIDG
VVVKVDEVALQRRLGSTSRAPRWAIAYKYPPEEAQTKLLDIRVNVGRTGRITPFAMTPVKVAGSTVQATLHN
ASEIKRKGVLIGD TVIRKAGDVIPEVLGPVVELRDGSEREFIMPTTCPECGSPLAPEKEGDADIRCPNARGCPGQ
LRERVFHVASRNGLDIEVLGYEAGVALLQAKVIADEGELFALTERDLLRTDLFR TKAGELSANGKRLLVNLDKAKA
APLWRV LVALSIRHVGPTAARALATEFGSLDAIAAAS TDQLAAVEGVGPTIAAAVTEWFAVDWHREIVDKWR AA
GVRMVDERDESVPRTLGLTIVVTGSLTGFSRDDAKEAIVARGGKAAGSVSKKTNYV VAGDSPGSKYDKAVELG
VPILDEDGFRRLLADGPASRT

15

SEQ ID NO: 59

MEQQPLTLTAATTRAQELRKQLNQYSHEYVVKDQPSVEDYVYDRLYKELVDIETEFPLITPDSPTQRVGGK VLS
GFEKAPHDIPMYSLNDGFSKEDIFAFDERVRKAIGKPVAYCC ELKIDGLAISLRYENG VVRGATRGDGT VGENIT
ENLRTVRSVPMRLTEPISVEVRGECYMPKQSFVALNEEREENGQDIFANPRNAAAGSLRQLD TKIVAKRNLNTFL
YTVADFGPMKAKTQFEALEELSAIGFRTNPERQLCQSIDEVWAYIEEYHEKRSTLPYEIDGIVIKVNEFALQDELG
FTVKAPRWAIAYKFPPEEAETVVEDIEWTIGRTGVVTP TAVMAPVRVAGTTVSRASLHNADFIQMKDIRLNDHVI
IYKAGDIIPEVAQVLVEKRAADSQPYEMPTHCPICHSELVHLDEEVALRCINPKCPAQIKEGLNHFVSRNAMNIDG
LGPRVLAQM YDKGLVKDVADLYFLTEEQLMTLDKIKEKSANNIYTAIQGSKENSVERLIFGLGIRHV GAKAAKILA
EHFGDLPTLSRATAEEIVALDSIGETIADSVVTFYFENEVHELMAELEKAQVNLTYKGLRTEQLAEVESPFKDKTV
VLTGKLAQY TREEAKEKIENLGGKVTGVS SKKTDIVVAGEDAGSKLTKAESLGVTWVWNEQEMVDALDASHF

20

SEQ ID NO: 60

MTNIQTQLDNLRKTLRQY EYEHVLDNPSVPDSEYDRLFHQKALELEHPEFLTSDSPTQRVGAKPLSGFSQIRH
EIPMLSLDNAFSDAEFNAFVKRIEDRILLPKPLTFCCPKLDGLAVSILYVNGELTQAATRGGDTTGEDITANIRT
IRNVPLQLLTDNPPARLEVRGEVFMHAGFERLNKYALEHNEKTFANPRNAAAGSLRQLDPNITSKRPLVLNAYGI
GIAEGVDLPTTHYARLQWLKSIGIPVNP EIRLCNGADEVLGFYRDIQNKRSSLG YDIDGTVLKINDIALQNELGFI
SKAPRWAIAYKFP AQEELLLNDVEFQVGRGTGAI TPVAKLEPVFVAGVTVSNATLHNGDEIERLNIAIGD TVWIRR
AGDVIPQIIGVLHERRPDNAKPIIFPTNCPVCDSQIIRIEGEAVARCTGGLFCAAQRKEALKHFVSRKAMDIDGVG
GKLIQVLDRELIHTPADLFLKDLTTLRLERMGAKSAENALNSLENAKSTTLARFIFALGIREVGEATALNLANHF
KTLDALKDANLEELQQVDPDVEVVANRIFIFWREAHNVAVVEDLIAQGVHWETVEVKEASENLFKDKTVLWTGT
LTQMGRNEAKALLQQLGAKVSGSVSSKTD FVIAGDAAGSKLAKAQELNITVL TEEEF LAQITR

SEQ ID NO: 61

MADLSSRVNELHDLLNQSYEYYVEDNPSVPDSEYDKLLHELIKIEEEHPEYKTVDSPTVRVGGEAQASFNKVNH
DTPMLSLGNAFNEDDLRKFQRIREQIGNVEYMC ELKIDGLAVSLKYVDGYFVQGLTRGDGTTGEDITENLKI TH
AIPKMKKEPLNVEVRGEAYMPRRSFLRLNEEKEKNDEQLFANPRNAAAGSLRQLD SKLTAKRKL SVFIYSVNDFT
DFNARSQSEALDELKLGFTTNKNR ARVNNIDGVLEIEKWT SQRESLPYDIDGIVIKVNDLDQ QDEMGTQKS
PRWAIAYKFP AEVVTKLLDIELSIGRTGVVPTAILEPVKVAGTTVSRASLHNEDLIHDRDIRIGDSVVVKKAGDI
IPEVRSIPERRPEDAVTYHMPHPCSCGHELVRIEGEVALRCINPKCQAQLVEGLIHFVSRQAMNIDGLGTKI IQ
QLYQSELIKDVADIFYLTEEDLLPLDRMGQKVDNLLAAIQQAKDNSLENLLFGLGIRHLGVKASQVLAEKYETID
RLLTVTEAELVEIHDIGDKVAQSVVTYLENEDIRALIQLKDKHVNMIYKGIKTS DIEGHPEFSGKTIVLTGK LHQ
MTRNEASKWLASQGAKVTSSVTKN TDVVIAGEDAGSKLTKAQSLGIEIWTEQQFVDKQNELNS

5

SEQ ID NO: 62

MNKR MNELVALLNRYATEY YTSNPSVSDSEYDRLYRELVELETAYPEQVLADSPTHR VGGKVL DGFKEYSHQY
PLYSLQDAFSREELDAFDARVRKEVAHPTYICELKIDGLSISLTYEKILVAGVTRGDG SIGENITENLKR VKDIPL
TLPEELDITVRGECYMPRASFDQVNQARQENGEPEFANPRNAAAGTLRQLD TAVVAKRNLATFLYQEASPSTRD
SQEKGLKYLEQLGFVNP KRILAENIDEIWNFIQEVGQERENLPYDIDGWIKVNDLASQEELGFTVKAPKWA VA
YKFPAAEEKAQLLSVDWTVGRGTGVVPTANLTPVQLAGTTVSRATLHNVDYIAEKDIRKDDTVIVYKAGDIIPAV
LRVVESKRVSEEKLDIPTNCPSCNSDLLHFEDEVALRCINPRCPAQIMEGLIHFASRDAMNITGLGPSIVEK LFAAN
LVKDVADIYRLQEEDFLLEGVKEKSAKLYQAIQASKENSAEKLLFGLGIRHVGSKASQLLLQYFH SIENLYQADS
EEVASIESLGGVIAKSLQTYFATEGSEILLRELKETGVNLDYKGTQTVVADAALSGL TWL TGKLERLKRSEAKS KLE
SLGAKVTGVS SKTDLVVVGADAGSKLQKAQELGIQVRDEAWLES L

10

SEQ ID NO: 63

MQELFNNLMELCKDSQRKFFYSDDVSASGR TYRIFSYNYASYSDWLLPDALECRGIMFEMDGEKPVRIASR PME
KFFNLNENPFTMNIDLNDVDYILT KEDGSLVSTYLDGDEILFKSKGSIKSEQALMANGILMNINHRLRDR LKELA
EDGFTANFEFVAPTNRIVLAYQEMKIILLN VRENETGEYISYDDIYKDATLRP YLVERYEIDSPKWIEEAKNAENIE
GYVAVMKDGS HFKIKSDWYVSLHSTKSSLDNPEKLFKTIIDGASDDLKAMYADDEYSYRKIEAFETTYLKYLDRA
LFLVLDCHNKHCGKDRKTYAMEAQGVAKGAGMDHLFGIIMSLYQGYDSQEKVMCEIEQNFLKNYK KFIPEGY

15

SEQ ID NO: 64

MFKKYSSLENHYNSKFIEKLYSLGLTGGEWVAREKIHGTNFSLIIERDKVTCARTRGPILPAEDFFGYEILKNYAD
SIKAVQDIMETSAVVSQVFGFAGPGIQKNVDYCDKDFYVFDIIVTTESGDVTVVDDYMMESFCNTFKFKMAPL
LGRGKFEELIKLPNDLDSVVQDYNFTVDHAGLVDANKCVWNAEAKGEVFTAEGYVLKPCYPSWLRNGNRVAIKC
KNSKFSEKKKSDKPIKAKVELSEADNKLVLGILACYVTLNRVNNVISKIGEIGPKDFGKVMGLTVQDILEETSREGIT
LTQADNP SLIKKELVKMVQDVLPAWIELVS

SEQ ID NO: 65

5 MQSIKELYQNLINLCVDDNTKFYFAETVTSLGTKVRIFDYHVAGYNDWIRPDAMASRGIMFEMNGEIPVRIMSR
PMDKFFNYSEVIGWEKLETAGNMKMPDLNKIAYVIDKRDGSLISTYLDISGEIKNLLLKSKASIRSNDASVW
LYQEDHKDLLEFCTAYAENGFTVNMEWTAPHNQIVLCYNEHQRLILNIRHNETGEYVDFGELQKDPFTVKYAAD
FFEVPDGGKAWIDEVYQMTGIEGFVVMEDYQMFCLKTDWYVALHHTKDSINNSERLIYACAENCTDDL RQMF
RDDENSLQKIEIFDNHFRDVM DAMKKL TEAYEKYRGMERRDYAINMNNDFKNERHWFNIAMQMFQRPDFS
MTDEIVAVIKKPKTFIPKGY

SEQ ID NO: 66

10 MLELYKNLMLNLCESSEVAKFFYKDFTPMDGKFRVFSYHYASYSEWLKPDALCECRGIMFEMDGDTPIRIASRPM
EKFFNLNENPMTMGIDISDVEYIMDKADGSLVSSYVDDGYLYLKS KTSLYSDQARQASALLNSEEYSSLHQVILEL
ALDGYTVNMEFVSPNNRVLAYQEPQLFVLNVRNNTTGEYIKYDDL ANAKIRPYLINAYGISDPTTWVEGVRAL
EGVEGYIAVLNTGQRFVKTEWYSALHHTKDSITSNERLFASVVSANSDDL RSLFAGDEYAIKKISAFEQAYLDYL
GKSLELCQSFYDEYRGRARKDYAIAAQKATVNQRHLFGVIMNMYEGTVDVDKLLKDLERVFLKYWAGYVPKEYE
KEIEISEE

SEQ ID NO: 67

15 MSRTIELFNNLMSVVEKSEKGNFYFKDVITSMGTKARIFSYFIASYTDWLQDDALECRGIMFELNDKNEPVRIMA
RPMQKFFNLKENPMTIGLDLTKMIGLMEKADGSLISSYHDQGYVYLKSKAAIFSDQANKAMALLNSPAYEKL RDA
IVRAGSDFTFNMEYVGPSNRVLPYEEEEELVNLVRHNETGQYVEFSTLLDDPLIRHRMIGVYPCPDWSKVTP EE
WEAATRAETDIEGVIGIMPDGQLFKLKT DWYSSLHRTKDSINNNKALFQSIKERASDDL RGMFSDDNAALAKIE
AFESAYIDTVAKYHKICA EVFLRFARFLIVEVFAIEAQARMKDCRYLFSIVMQYGRDWDGELAVEKIEEHIIKEYA
TVVPMAYR

SEQ ID NO: 68

20 MEHKLCQQKKTTKVLALFKNLMALCDGSDTFYKDEITAMQTRMRIFSYLYLSKPEMWNKPDALCECRGIMFEI
DDKDRPVRIASRPM EKFFNLGENDRARFKPEDVEMVMDKMDGSLVSTYIDNGYVQLKSKAALYSSQAERANGLL
YSEKYADLRAKIADIGSDYTFNFEYTAPSNRIVEYSEPSLTLNVRHNVTGEYVPHQMLFADAILRPHLVNALQV
DSARFSNILDEVRTAEGIEGIVARTKDGQMFVKSEWYIGVHNIKNTSMFPNNLIYYVVESETDDLRAAYEGEPE
ALERIELFEEAFRSILRNAFTTATEFYNAHAGEDRKYASNATIESRKHGDAQSYIFMCLMIAFDGLDYDRILASM
KTYYL RNYKKLIPADKIDW

SEQ ID NO: 69

MKELFDNLMALQDPNDISKFFYKDVVTQPGTKCRIFSINYAAYS DWLLPGALESRGIMFELDADNQPVRVMARP
MEKFFNLEENPFTMDLDSQLEYAMTKADGSLISTYVDQGYLYTKSKGSISSSQAIESKQLLLDINYKPLAERALE
LAKDGFTCNFEYVAPNNRIVLNYAKKDLILLNVRHNETGEYVPM AELQKDPVLRNYLIDVYPPREDIDT NEMIKEI
REMV DIEGFVFQHASGLKFKLKT EWYSNLHRVKDTLNNSEALFMVVVAGGSDDMKSLFTDDL SRTKIESFETAFL
DYLKKT SNFVFDLQRQLIGSDRKTYAIECQTILRNTDQLELFGVMMELYKGADQEQT IKNINVVFMKNYKKYVPA
GFETLKNEY

SEQ ID NO: 70

MNVQELYKNLMSLADDAEGKFFFADHLSPLGEKFRVFSYHIASYS DWLLPGALEAR GIMFQLDDNDEMIRIVSRP
MEKFFNLNENPFTMELDLTTTVQLMDKADGSLISTYLSGENFALKSKTSIFSEQAVANRYIKK PENRDLWEFCD
DCTQAGLTVNMEWCAPNNRIVLEYPEAKLVILNIRDNETGDYVSFDDIPQSALMRVKQWLVDEYDPATAHEPDF
VEKLRDTKGIEGMILRLANGQSVKIKTQWYVDLH SQKDSVNVPKKLVTTILNGNHDDLYALFADDKPTIERE
5 DSHVTKTLTNSFNVRQFYARNRHLARKDYA IAGQVKLKPWEFGVAMIAYQKQTV EGVYESLVTAYLKRPELAIP
EKYLN

SEQ ID NO: 71

MIELYDNLMTLVKNSTKSKFFFKDFQSALGVNYRIFSYNYASYS DWL EDGALECRGIMFEMDENG PVRIAARPM
QKFFNLNENPLTIGLDLSQENIDLVMKEDGSLISTFMDRQYLSVSKSGSIHSSMVHDSL RFLRLPENEAFAARLE
EITKAGYTCNLEYVSPTNRIVLAYQETNILLNVRNNETGEYIPYAE LFKD GALRKH LVKSYELSEGDFVDNIRKQE
GIEGFIVLKDGTFFKLTAWYSALHHTKDSINNNERLFEVVAGGTDDL RGLFSTDSFAIEKINAFERIHLDYLE
10 QSLALLEAAYSQ LKGRDRKDYAVTGQILKDFPGLFSILMQAYVDGINYD TVMDQINSVFLKNHKAQIPEKYLKEI
VVE

SEQ ID NO: 72

MVLYSKHHRGYTMQELFNNLMELCKDSQRKFFYSDDVSASGR TYRIFSYNYASYS DWLLPDALECRGIMFEMDG
EKPVRIASRPMEKFFNLNENPFTMNIDLNDVDYILTKEDGSLVSTYLDGDEILFKSKGSIKSEQALMANGILMNIN
HHQLRDRLKELAEDGFTANFEFVAPTNRIVLAYQEMKILLNVRNETGEYISYDDIYKDAILRPYLVERYEIDSPK
WVEEAKNAENIEGYVAVMKDGS HFKIKSDWYVSLHSTKSSLDNPEKLFKTTIIDGASDDL KAMYADDEYSYRKIEA
FETTYLKYLDRALFLVLDCHNKHCGKDRKTYAMEAQVAKGAGMDHLFGIIMSLYQGYDSQEKVMCEIEQNFLK
15 NYKKFIPEGY

SEQ ID NO: 73

MKELYNNLLKLTTEEHGDCFFFRDHWSSIGNHFRVFSYHIAGLTQWMLPDALECRGIMFELINGEPYRIASRPMEK
FFNLAERQAWNLTNSGVVGLDKLELDYSNIDRYEDKADGSLMSSYHFIDPEDDNRINYM LKSKTSINS DQANDA
NRWLVNHTDLLDFIIDCEEAGYTVNLEWCSPKNQIVIMYPEESL KILNVRHRDTGEYYSNNSLIRSPVFRKYAVD
QMFEEGTDVNTAISNMYNETGIEGYILVMRDGSRVKIKTTSYVARHKLKDSITNNKDLVIAVAQGVSDDLRQLF
LDDSLSLTKIQEFEDHVSVAGSTYTKIREAHKACAGMERREYAISMQNTFKQDRMFFNIVMKMFQAPDLEVMP
20 EIMSVIIKYPDEFVPTKWK

SEQ ID NO: 74

MEKLYYNLLSLCKSSSDRKFYSDDVSPIGKKYRIFSYNFASYSDWLLPDALECRGIMFEMDGETPLRIASRPMEK
FFNLNENPFTLSIDLNDVKYLMTKEDGSLVSTYLDGNMVRFKSKGSIKSDQAASATSILLDINHKLADRLLELCN
DGFTANFEYVAPSNKIVLTYPEKRLILLNIRDNNTGKYIEYDDIYLDPVFRKYLVDREFAPEGDWVPGVKSSTNIE
GYVAVMKDGSFKLKTOWYVALHTTRDSISSPEKFLAIMNGASDDLKAMYADDEFSEFKKVELFEKAYLDFLDRS
FYICLDAVDKHKGKDRKTYAIEAQAIKGAQSPWLFGIIMNLYQGGSKQMMTALESVFIKNHKNFIPEGY

SEQ ID NO: 75

MNELYNLMTLIEPGKMSRFFLRDAVTPFGTRVRMFGYNYASYTDWLLPDALEARGIMFEMDENDQPIRVMAR
PMEKFFNLGENPFTIDLSTIEYFMDKSDGSLISSYVDNDTLFMKSKMSIGSVQAVARQVIQDYVHRDLHDRV
LELAKDGFTCNFEYVAPDNRVVILYPERALVLLNVRNNETGEYVHIEELKRDVLRRLVNNYVIDPENFDQDTFV
NDIYQMV DIEGYVFRMTGQHVKIKTEWYKMLHYAKDTINNNEALFAITVAAQLDDVRSYSDDYALGKINKFE
EVFLGFLDTRLPIILLNLHKELNGSSRKDYAIKSQTYFKQANELYLFGIFMQMFEGVPPREQLVEKLSEAFMKNYKL
FVPPEYDKVVEYDN

5

SEQ ID NO: 76

MRTKQIFDDLMLNTAKNDAFMWKDFVSPAGGLFRIFSYRLASYSDFLEPNALECRGSMFKVDDEGNFVGIASRT
PMKFFNAYENPFTMYDKDLSSEIAVVMKLDGSIISTFMDVDFVVRTKSHASLHSDHAYNSTAMLIADKELYNE
VHYAESMGYTVNMEYTSPEYRIVLPYQEDNLTVLNLRHRETGELLIGERLKEFSKILYERSVFAKHGEIDATFPMK
ETLKESIDAVRGMADIEGYVLILKDGRCMKIKTDWYCALHFTKDSINVDSRLYDAITGASDDLKQMFSTDLAM
KKIEKMEQLIFSCYNKLVHDVESFYEENKHLERKEYALKVQSTLPNELGMPGLAFSLYASKPVDYKQMLKYMKD
VLVNFV

10

SEQ ID NO: 77

MQSIKELYQNLVNLVDDNTKFFFSETVSLGTVRIFDYHVAGYNDWIRPDAMACRGIMFEMNGEIPVRIMSR
PMDKFFNYSEVIGWEKLETHGNMMPDLSKIKFVIDKRDGSLISTFMDVDNLLKSKGSIKSNQANDASVWLYQ
DDQADLLEFCRAYAKEGFTVNMEWTAPHNQIVLCYTDHQLRILNIRHNETGEYVDFELQKDSVFRKYAADFYE
VPQDGAEWIKNVYGMTGIEGYVVVMEDYQMFKLKTOWYVALHHTKDSINDSKRLISACAENATDDLQMFDRD
DPNSLAKIEVFAKFRDVSAMQALTNAYSKYKALERREYAISMTNEFKNERHWFNIAMQMFSTRPDFSLADEI
VAVIKKYPEKFPQGY

15

SEQ ID NO: 78

MKELFDNLMNLCNDTDESRRFFYRDDISPGLKYRIFSYNYASYSDWLLPDALECRGIMFEMIDGVPVRIASRPME
KFFNLNETPFTMNLDSLNAVHMMKKEDGSLVSSYLDGNILRFKSKSSLKSEQAYLSSAMLTSTIHEALLWRLELA
RDGFTANFEYVSPENRIVLAYQKDLILLNIRENDTAYVYNEIAKDPVLRQYLVESEIPEGDFVSDIKAMEGIE
GYVFMNDNGLRFKLTOWYVALHHTKDSITKNDRLEFVIVNNASDDLKGLFSNDAYSLKINKFEEVYLDYLRSS
LSFISTSYQKLRGLDRKTYAGEAKRLADAERLPFLFTILMLMFNDSMDYDTTIKKVNELFMKNYKTFIPKEYE

SEQ ID NO: 79

MTTQELYNHMLTLTEDAEGKFFFADHISPLGEKLRVFSYHIASYSWLLPDALEARGIMFQLDEQDKMVRIVSRP
MEKFFNLNENPFTMDLDTTQVQMDKADGSLISTYLTGENFALKSKTSIFSEQAVANRYIKLPENRDLWEFCD
DLTQAGCTVNMEWCAPNNRIVLEYPEAKLVILNIRDNETGDYVSFDDIPLPALMRVKKWLVDEYDPETAHVDDF
VEKLRATKIEGMILRLANGQSVKIKTQWYVDLHSHQKDSVNVPKLVTTILNNNHDDLYALFADDKPTIDRIREF
DSHVSKTVSASFHAVSQFYVKNRHMSRKDYAIAQKALKPWFEFGVAMIAYQKKTVEGVYALVGAYLKRPELLIP
EKYLNEA

20

SEQ ID NO: 80

MNYLELKNMAENLKDSNYRSTKLNNFKYTYIFSDYKNFKENNTFFIRGLMIDSKSILNKDTLAPGISIPMPKFFNI
NENEDWLLPDSTNLEDFTIVTKYDGSLMIPYEYDGIFRTKMSIDNDQTKLANKYIKNNPDILDLIKNNPDTQYF
FELISPLNRIVVDYNTKTELKLAELDLRTEFKIHETNEFNFKDLNIKTLKDLKDYINTISNYEGVILQHVKTKVYKL
KTQEYLDLHNTMTNLDLKVYKMLEETIDVLPKLSPEAVAYIDSVSNSVKVLEILDSIDSNYIKTKDLETPAL
YIKDLNIDPIAKDCLFKLCKNKNLDDVLNQVKSMLKYNKLRDIKVKWIH

5 SEQ ID NO: 81

MKVIEFLKNAPSITDGLASLHLELGIKAKIYEDEGLIVLNYSQIDSPKTHPIVQECRGLIIDNDLTVVARPFDRFFNY
GEALNVMPEIDWENASIFEKVDGSLIKIYFHKGRWEVATRGTAFASECEMGGHGITFKELVFNALKVHDDDGQY
LMNNAYLFRDTTYLFELTCVENRVVRHYHGYNLHFLAARDNVSGNYSEECRDWLRSPDCILYGVKHPKRYALG
SADEALQAAKELKNLDEGFVYQNAVPIAKIKSPAYVAVHHIRGEGLNPKRIMELVLSGEHDEYLSYFPEDRPIQP
YVDSLDMNLNIIAVTYPRLNQATTPKAFAAAIKHAGIDKQKASVYFMARRDNKDPVQVFHGMKTTFKMDMLRK
WMMV

10 SEQ ID NO: 82

MPNCRIEIRSRMEGNLNIAMYKDLIANKLVTVKHFNMGMSIIKYARKVfyENLWNEHPLLEARGHVFDQHSGD
CIVRPFEKVFNLGENGAGSFLHPKFRVRLIEKVNFGMFSVTKHNGSLIFSTTGSLTSDYVALGQKYVSNPDDYIA
GFTYNFEICSPDDPHIVVEEEGAYLIGIRDIFTGGQLSEYILDSHALGVDHSSVKILRPEHIECSWEHAKLLSSC
EKEGYMVQTLGLTVKCKSTHYLGKKFIMRMGSKKVNMSYQDPAGFKQTLDEEFYPLVDFLVNEVEEVRFTMT
DAQRRLLIETYFDMARI

SEQ ID NO: 83

MKSRILEFIKNNPDTWEEKLNEKFIRTNHNGDLVCFKYATEADFSPLVCEARGIIDVAQLVVCWPFDKFFNV
QEYAADIDWNSARVLEKIDGSMIKLFWYKGAWRFATSSTCDAAIPGYNELTYADIARAENVNEIPFEELN
KDYTYIFELVSPLSQIVVRYEMTELFFLTARNLNGEELDTLLQFRRPRSFALKSMNECLDAALLNKGDEIEDE
GFVVDEKHNRVKIKSPAYVAMHRLSTNKVFTVKRMAEFFCNGEDLSKLAKDFPANAHIKYYDWQFAEMKHA
15 EDMMLYSRRLYEEYDHRKAVAMTIKDSPIYAWAGFRAIGNDKDITDIMAFLAPANVEKLIVEYPEISN

SEQ ID NO: 84

ACUCCUCGGU

20 SEQ ID NO: 85

ACUCCUCGGUA

25 SEQ ID NO: 86

ACTCATCGAT

30 SEQ ID NO: 87

ACTCATCGATA

SEQ ID NO: 88

MSRTIELFNNLMSVVEKSEKGNFYFKDVITSMGTKARIFSHKIASYTDWLQDDALECRGIMFELNDKNEPVRIMA
RPMQKFFNLKENPMTIGLDLTKMIGLMEKADGSLISSYHDQGYVYLKSKTSIFSDQANKAMALLNSPAYEKL RDA
IVRAGSDFTFNMEYVGPSNRVVLPEEEEELIVLNVRHNETGQYVEFSTLLDDPLIRHRMIGVYPCPDWSKVTPEE
WEAATRAETDIEGVIGIMPDGQLFKLKT DWYSSLGR TKFSINNNKALHQSIKERASVALRGMFSDDNAALAKIEA
FESAYIDTVAKYHKICAEVFLRFARFLIVEVFAIEAQARMKDCRYLFSIVMQQYGRDWDGELAVEKIEEHIIKEYAT
YVPMAYR

SEQ ID NO: 89

MSRTIELFNNLMSVVEKSEKGNFYFKDVITSMGTKARIFSHQIASYTDWLQDDALECRGIMFELNDKNEPVRIMA
RPMQKFFNLKENPMTIGLDLTKMIGLMEKADGSLISSYHDQGYVYLKSKTSIFSDQANKAMALLNSPAYEKL RDA
IVRAGSDFTFNMEYVGPSNRVVLPEEEEELIVLNVRHNETGQYVEFSTLLDDPLIRHRMIGVYPCPDWSKVTPEE
WEAATRAETDIEGVIGIMPDGQLFKLKT DWYSSLGR TKFSINNNKALHQSIKERASGALRGMFSDDNAALAKIEA
FESAYIDTVAKYHKICAEVFLRFARFLIVEVFAIEAQARMKDCRYLFSIVMQQYGRDWDGELAVEKIEEHIIKEYAT
YVPMAYR

5

SEQ ID NO: 90

MSRTIELFNNLMSVVEKSEKGNFYFKDVITSMGTKARIFSYFIASYTDWLQDDALECRGIMFELNDKNEPVRIMA
RPMQKFFNLKENPMTIGLDLTKMIGLMEKADGSLISSYHDQGYVYLKSKTSIFSDQANKAMALLNSPAYEKL RDA
IVRAGSDFTFNMEYVGPSNRVVLPEEEEELIVLNVRHNETGQYVEFSTLLDDPLIRHRMIGVYPCPDWSKVTPEE
WEAATRAETDIEGVIGIMPDGQLFKLKT DWYSSLGR TKYSINNNKALNQS IKERASVALRGMFSDDNAALAKIEA
FESAYIDTVAKYHKICAEVFLRFARFLIVEVFAIEAQARMKDCRYLFSIVMQQYGRDWDGELAVEKIEEHIIKEYAT
YVPMAYR

10

SEQ ID NO: 91

MSRTIELFNNLMSVVEKSEKGNFYFKDVITSMGTKARIFSHN IASYTDWLQDDALECRGIMFELNDKNEPVRIMA
RPMQKFFNLKENPMTIGLDLTKMIGLMEKADGSLISSYHDQGYVYLKSKTTIFSDQANKAMALLNSPAYEKL RDA
IVRAGSDFTFNMEYVGPSNRVVLPEEEEELIVLNVRHNETGQYVEFSTLLDDPLIRHRMIGVYPCPDWSKVTPEE
WEAATRAETDIEGVIGIMPDGQLFKLKT DWYSSLGR TKYSINNNKALHQSIKERASVDLRGMFSDDNAALAKIE
AFESAYIDTVAKYHKICAEVFLRFARFLIVEVFAIEAQARMKDCRYLFSIVMQQYGRDWDGELAVEKIEEHIIKEYA
TYVPMAYR

15

SEQ ID NO: 92

MSRTIELFNNLMSVVEKSEKGNFYFKDVITSMGTKARIFSHKIASYTDWLQDDALECRGIMFELNDKNEPVRIMA
RPMQKFFNLKENPMTIGLDLTKMIGLMEKADGSLISSYHDQGYVYLKSKAAIFSDQANKAMALLNSPAYEKL RDA
IVRAGSDFTFNMEYVGPSNRVVLPEEEEELIVLNVRHNETGQYVEFSTLLDDPLIRHRMIGVYPCPDWSKVTPEE
WEAATRAETDIEGVIGIMPDGQLFKLKT DWYSSLHRTKDSINNNKALFQSIKERASDDL RGMFSDDNAALAKIE
AFESAYIDTVAKYHKICAEVFLRFARFLIVEVFAIEAQARMKDCRYLFSIVMQQYGRDWDGELAVEKIEEHIIKEYA
TYVPMAYR

20

SEQ ID NO: 93

ACTCATCGATC

25

SEQ ID NO: 94

ACTCATCGATT

ES 2 914 591 T3

SEQ ID NO: 95

MEEDKAYWNKDAQDALDKQLGIKREKQAKNVIFFLGDGMSLSTVTAARIYKGGLTGKFEREKISWEEFDFAAL
SKTYNTDKQVTDASAATAYLTGVKTNQGVIGLDANTVRTNCSYQLDESLFTYSIAHWFQEAGRSTGVVTSTRV
THATPAGTYAHVADRDWENDSDVVDHREDPEICDDIAEQLVFREPKNFKVIMGGRRGFFPEEALDIEDGIPG
EREDGKHLITDWLDDKASQGATASYVWNRDLDLAVDIRNTDYLMGLFSYTHLDTVLTRDAEMDPTLPMTKVA
IEMLTKDENGFFLLVEGGRIDHMHANQIRQSLAETLDMEEAVSMALSMTDPEETIILVTADHGHTLTITGYADR
NTDILDFAGISDLDDRRYTILDYGSGPGYHITEDGKRYEPTTEEDLKDINFYASAAPKHSATHDGTVDGIWVNGP
FAHLFTGVYEENYIPHALAYAACVGTGRTFCD

5 SEQ ID NO: 96

ACTCATCGATA

10 SEQ ID NO: 97

ACTCATCGATAA

SEQ ID NO: 98

15 ACTCATCGATAA

SEQ ID NO: 99

ACTIAGACCACG

20

SEQ ID NO: 100

MLQMNLEELRRIQEEMSRVLEDLIPLEELEYVVGVDQAFISDEVVSCAVKLTFFPELEVVDKAVRVEKVTFPYIPT
FLMFREGEPAVNAVKGLVDDRAAIMVDGSGIAHPRRCGLATYIALKLRKPTVGITKKRLFEMVEVEDGLWRLLD
GSETIGYALKSCRCKPIFISPGSYISPD SALELTRKCLKGYKLEPIRIADKLTKEVKRELTPTSKLLK

25 SEQ ID NO: 101

GACCACG

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir un producto de oligonucleótido terapéutico monocatenario que tiene al menos un residuo de nucleótido modificado, en el que la modificación se selecciona del grupo que consiste en modificación en la posición 2' del resto de azúcar, modificación de la nucleobase y modificación de la estructura principal, y en el que el producto tiene 20-30 nucleótidos de longitud, que comprende:
 - a) proporcionar un conjunto de oligonucleótidos (I) que comprende segmentos de la secuencia del producto, en el que al menos un segmento de la secuencia del producto contiene al menos un residuo de nucleótido modificado, en el que la modificación se selecciona del grupo que consiste en modificación en la posición 2' del resto de azúcar, modificación de la nucleobase y modificación de la estructura principal, y en el que cada segmento se ha producido mediante síntesis enzimática;
 - b) proporcionar un oligonucleótido molde (II) complementario a la secuencia del producto de oligonucleótido monocatenario, teniendo dicho molde una propiedad que permite que se separe del producto y se recicle para su uso en futuras reacciones;
 - c) poner en contacto (I) y (II) en condiciones para permitir el apareamiento de los oligonucleótidos de segmento con el oligonucleótido molde;
 - d) unir los oligonucleótidos de segmento usando una ligasa para formar el producto;
 - e) cambiar las condiciones para desnaturalizar el molde apareado y cualquier hebra de oligonucleótido de impureza, y separar las impurezas;
 - f) cambiar las condiciones para desnaturalizar el molde apareado y las hebras de oligonucleótidos de producto, y separar el producto de oligonucleótido monocatenario; y
 - g) reciclar el oligonucleótido molde para su uso en futuras reacciones.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que uno o más o todos los oligonucleótidos de segmento se producen usando una ligasa monocatenaria (ligasa mc), opcionalmente una ARN ligasa.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el procedimiento para producir un oligonucleótido de segmento usando una ligasa mc comprende:
 - (i) añadir un nucleótido, un dinucleótido, un trinucleótido o un tetranucleótido; que tiene un resto o bien fosfato, tiofosfato o bien ditiofosfato en el extremo 3'; y un resto o bien fosfato, tiofosfato o bien ditiofosfato en el extremo 5'; al 3'-OH de un cebador de oligonucleótido monocatenario usando una ligasa mc;
 - (ii) eliminar el 3'-fosfato, 3'-tiofosfato o ditiofosfato usando una fosfatasa;
 - (iii) repetir las etapas (i) y (ii) para extender el oligonucleótido para producir la secuencia de segmento; y
 - (iv) liberar el oligonucleótido de segmento del cebador de oligonucleótido usando una endonucleasa específica de secuencia.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que se añade un 3',5'-nucleótido-bisfosfato, que tiene uno o más de cualquiera de los oxígenos del fosfato sustituidos por azufre, al 3'-OH de un cebador de oligonucleótido monocatenario usando una ligasa mc en la etapa (i).
5. Procedimiento según la reivindicación 3 o 4, en el que se añade un 3',5'-bistiofosfato, un 3'-fosfato-5'-tiofosfato, un 3'-tiofosfato-5'-fosfato, un 3',5' bisditiofosfato, un 3'-fosfato-5'-ditiofosfato o un 3'-ditiofosfato-5'-fosfato al 3'-OH de un cebador de oligonucleótido monocatenario usando una ligasa mc en la etapa (i).
6. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que uno o más o todos los oligonucleótidos de segmento se producen usando una transferasa.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el procedimiento para producir un oligonucleótido de segmento usando una transferasa comprende:
 - (i) añadir un nucleótido-5'-trifosfato, alfa-tiotrifosfato o alfaditiotrifosfato, que tiene un grupo protector en su 3'-OH, al 3'-OH de un cebador de oligonucleótido monocatenario, usando una transferasa;
 - (ii) desproteger la posición 3' para regenerar el 3'-OH;

- (iii) repetir las etapas (i) y (ii) para extender el oligonucleótido para producir la secuencia de segmento;
- (iv) liberar el oligonucleótido de segmento del cebador de oligonucleótido usando una endonucleasa específica de secuencia.
- 5 8. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que el procedimiento es semicontinuo o continuo.
- 10 9. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que el producto se produce a una escala de gramos o kilogramos y/o el procedimiento se lleva a cabo en un reactor de al menos 1 l.
- 15 10. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, mediante el cual la desnaturalización resulta de un aumento de temperatura, un cambio en el pH o un cambio en la concentración de sal en una disolución tamponante.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el procedimiento incluye dos etapas de aumento de la temperatura: i) para desnaturalizar los dúplex de molde:impureza y ii) para desnaturalizar los dúplex de molde:producto.
- 20 12. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que los segmentos tienen de 3 a 15 nucleótidos de longitud.
13. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que la longitud del producto es de 20 a 25 nucleótidos de longitud.
- 25 14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que dicho producto tiene 20 nucleótidos de longitud y comprende tres oligonucleótidos de segmento que comprenden:
- 30 (i) un segmento 5' que tiene 7 nucleótidos de longitud, un segmento central que tiene 6 nucleótidos de longitud y un segmento 3' que tiene 7 nucleótidos de longitud;
- (ii) un segmento 5' que tiene 6 nucleótidos de longitud, un segmento central que tiene 8 nucleótidos de longitud y un segmento 3' que tiene 6 nucleótidos de longitud;
- 35 (iii) un segmento 5' que tiene 5 nucleótidos de longitud, un segmento central que tiene 10 nucleótidos de longitud y un segmento 3' que tiene 5 nucleótidos de longitud;
- (iv) un segmento 5' que tiene 4 nucleótidos de longitud, un segmento central que tiene 12 nucleótidos de longitud y un segmento 3' que tiene 4 nucleótidos de longitud; o
- 40 (v) un segmento 5' que tiene 3 nucleótidos de longitud, un segmento central que tiene 14 nucleótidos de longitud y un segmento 3' que tiene 3 nucleótidos de longitud.
- 45 15. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que el molde está unido a un material de soporte.
- 50 16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que el material de soporte es un material de soporte soluble, opcionalmente en el que el material de soporte se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, un polímero orgánico soluble, ADN, una proteína, un dendrímero, un polisacárido, un oligosacárido y un hidrato de carbono.
- 55 17. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que el material de soporte es un material de soporte insoluble, opcionalmente en el que el material de soporte insoluble se selecciona del grupo que consiste en: una perla de vidrio, una perla polimérica, un soporte fibroso, una membrana, una perla recubierta con estreptavidina y celulosa, o forma parte del propio recipiente de reacción, por ejemplo una pared de reacción.
- 60 18. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que se unen múltiples copias repetidas del molde de manera continua por medio de un solo punto de unión al material de soporte.
19. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que el molde se une al material de soporte en múltiples puntos de unión.
- 65 20. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que la modificación es en la posición 2' del resto de azúcar y se selecciona del grupo que consiste en 2'-F, 2'-OMe, 2'-MOE y 2'-amino, o en el que el oligonucleótido comprende un PMO, un LNA, un PNA, un BNA o un SPIEGELMER.

21. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que la modificación es en la nucleobase y se selecciona del grupo que consiste en una 5-metilpirimidina, una 7-deazaguanosina y un nucleótido abásico.
- 5
22. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que la modificación es en la estructura principal y se selecciona del grupo que consiste en fosforotioato, fosforamidato y fosfordiamidato.
- 10
23. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que el producto de oligonucleótido monocatenario resultante tiene una pureza de al menos el 90 %, opcionalmente en el que el producto de oligonucleótido monocatenario tiene una pureza de al menos el 95 %, opcionalmente en el que el producto de oligonucleótido monocatenario tiene una pureza de al menos el 98 %.
- 15
24. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que el procedimiento produce un gapmero.

FIG. 1A

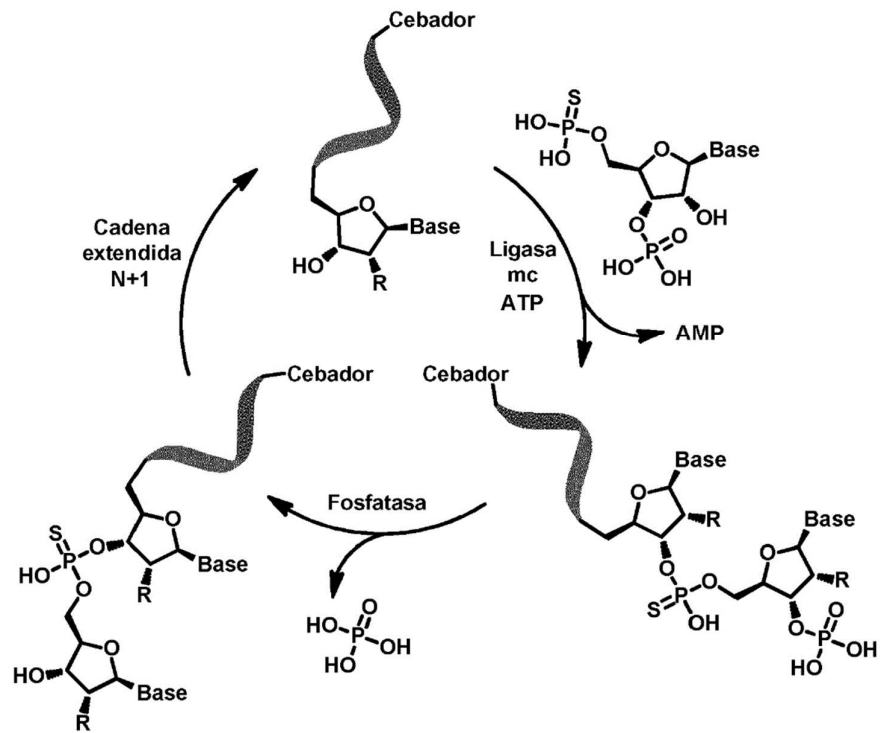
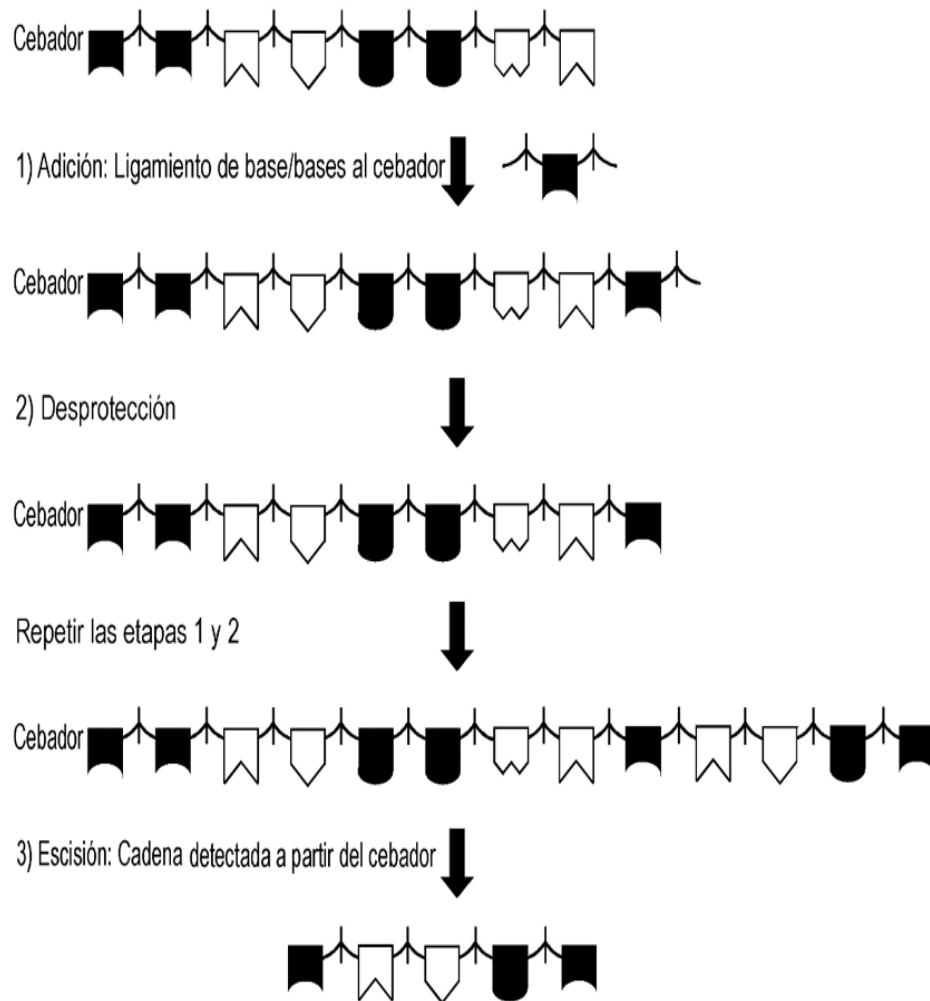
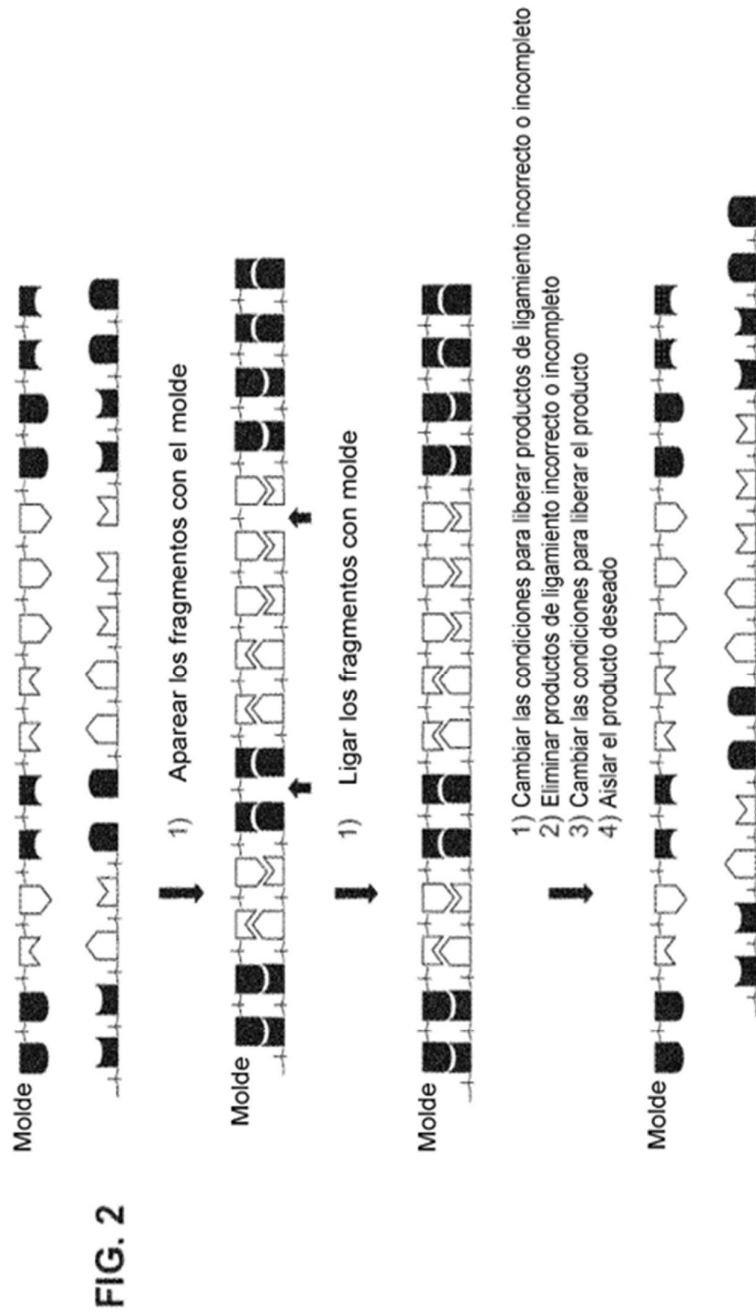


FIG. 1B





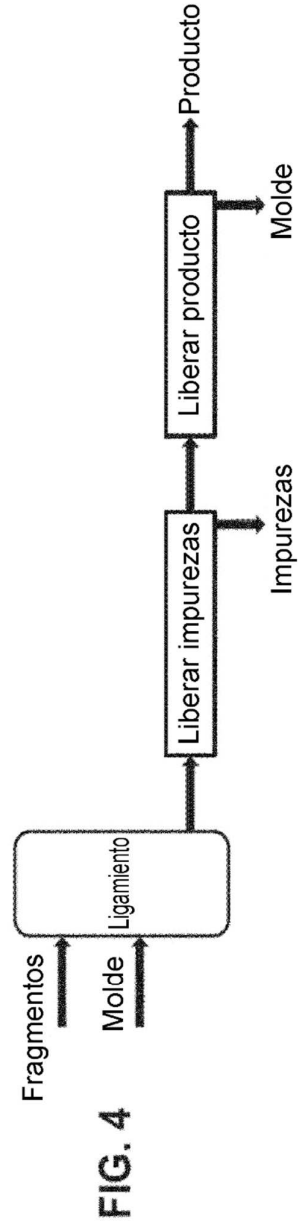
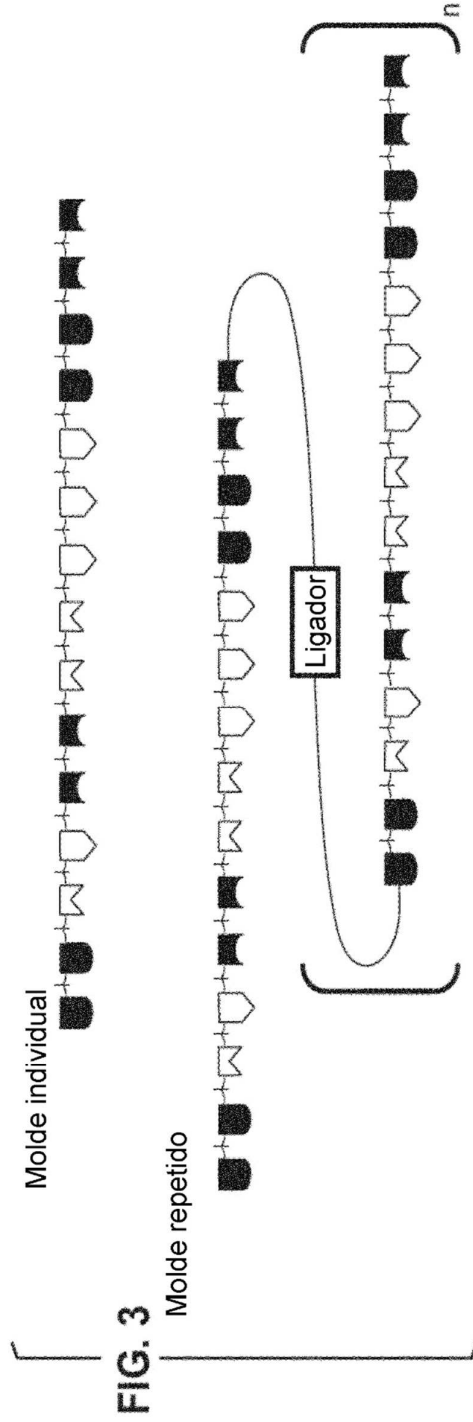


FIG. 5a

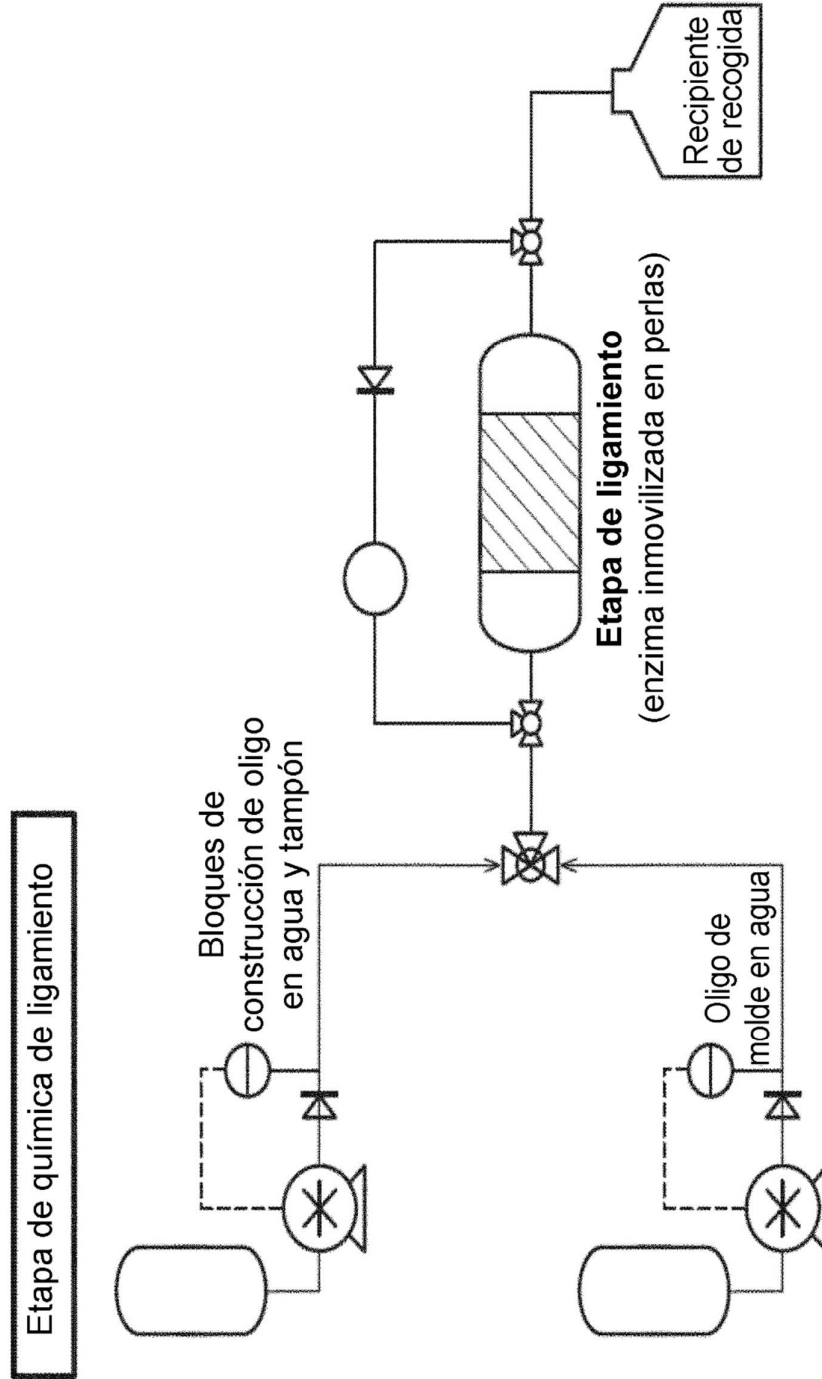


FIG. 5b

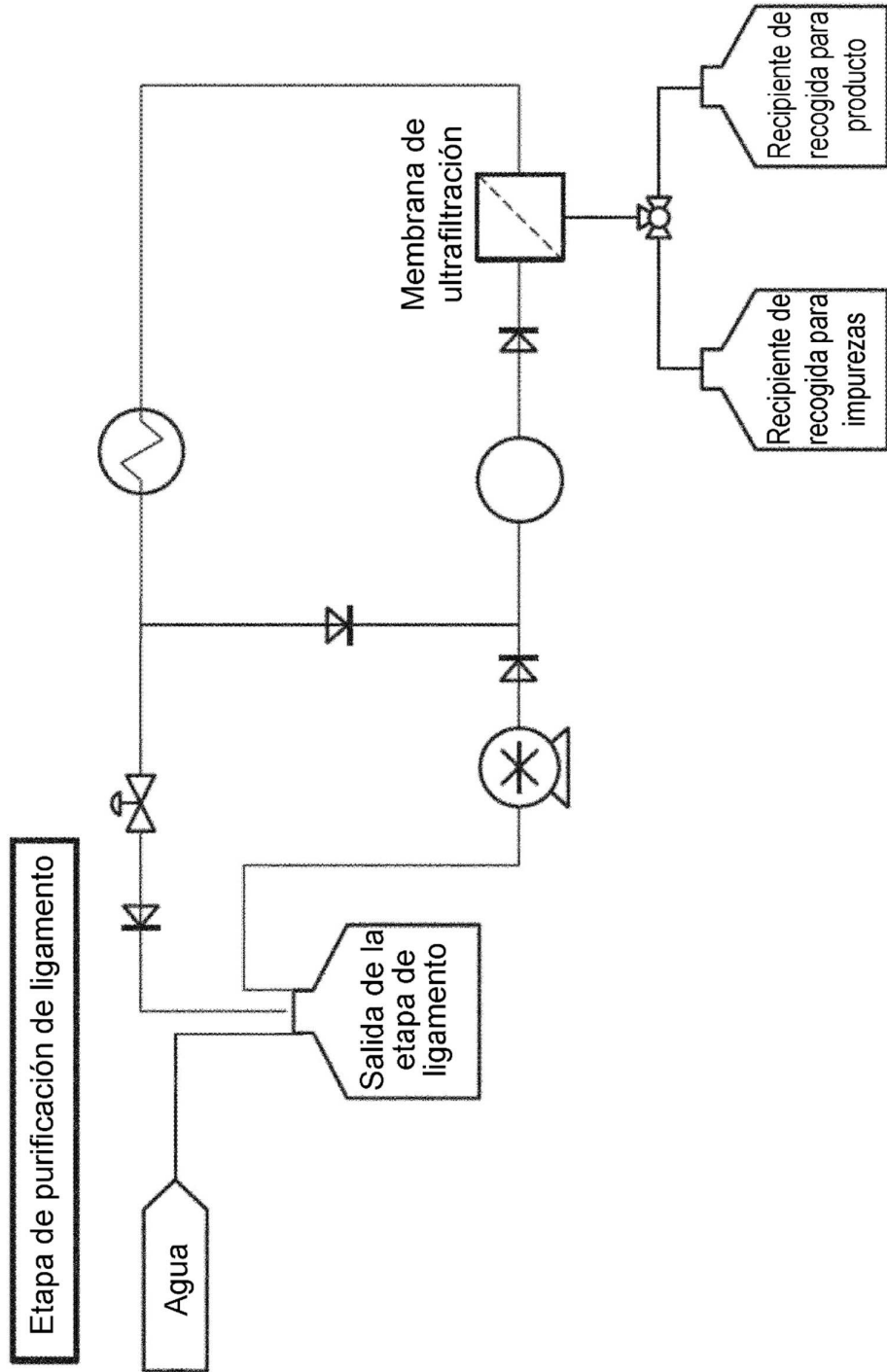


FIG. 5c

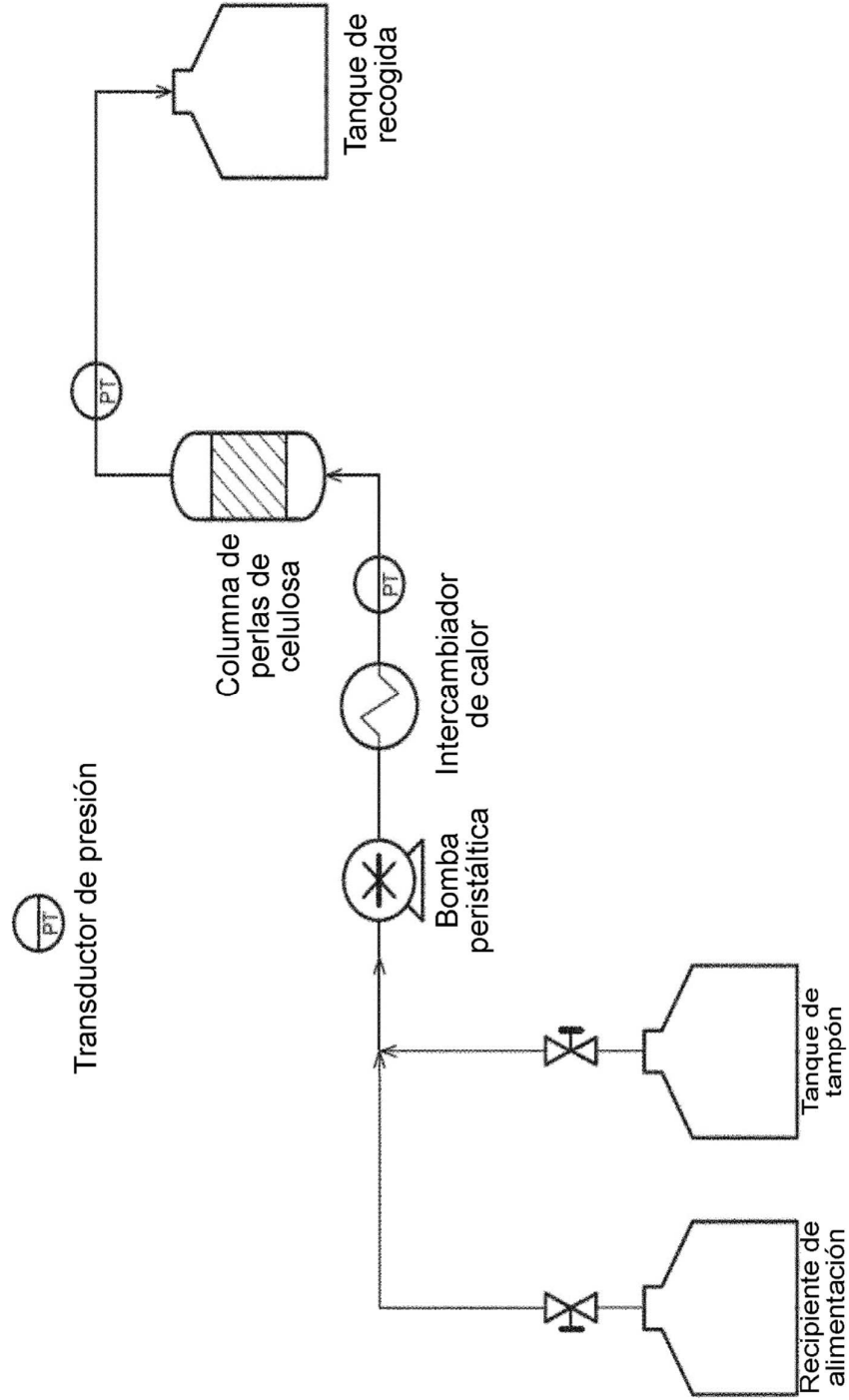
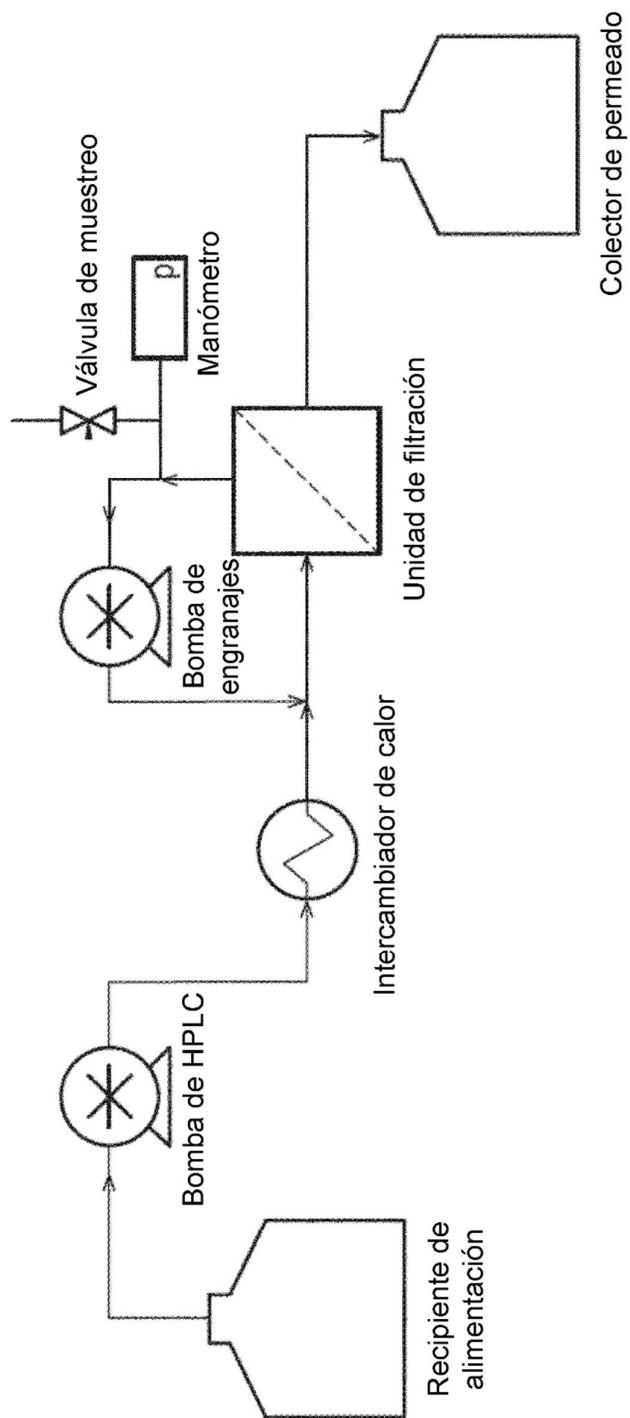


FIG. 5d



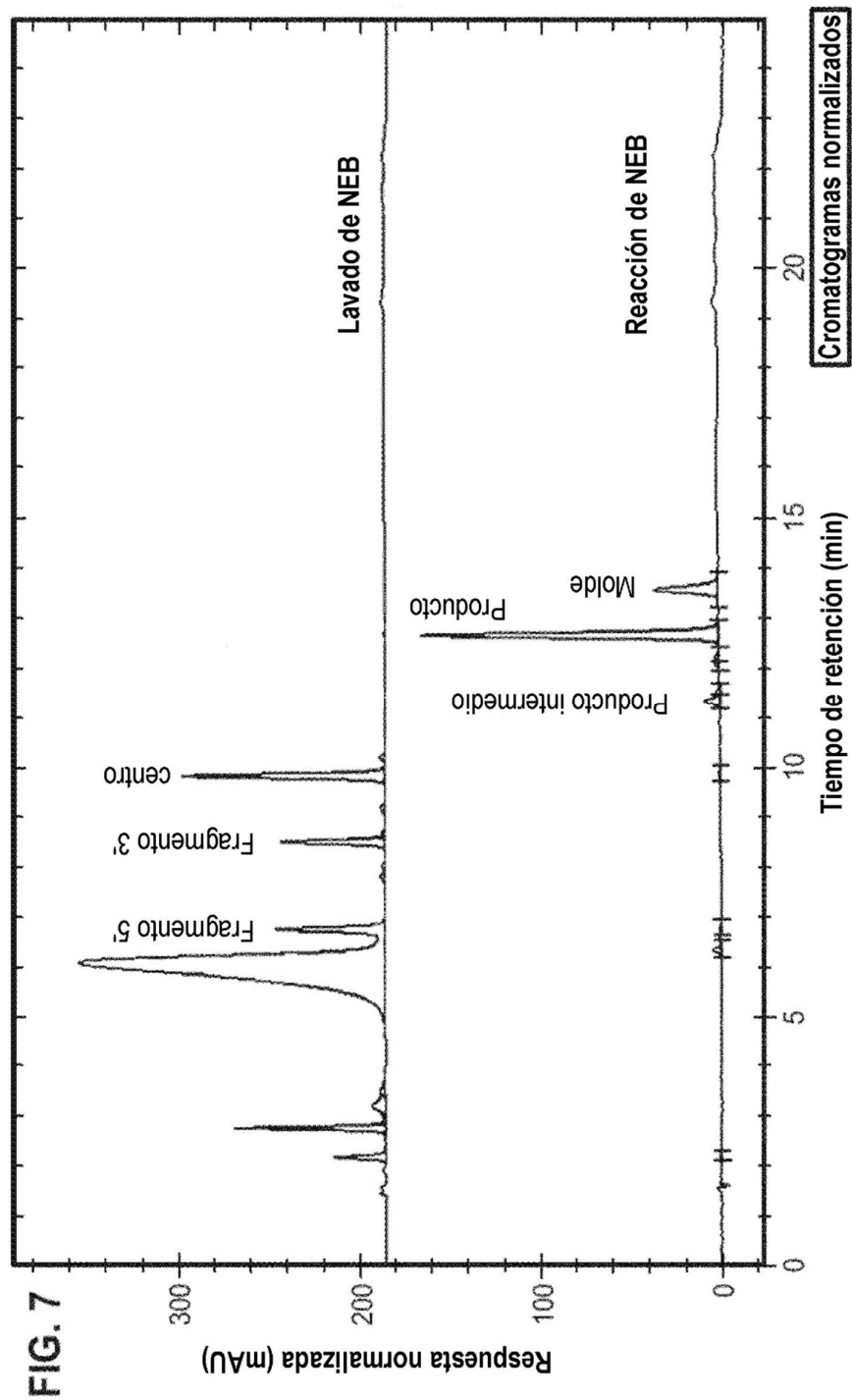


FIG. 7

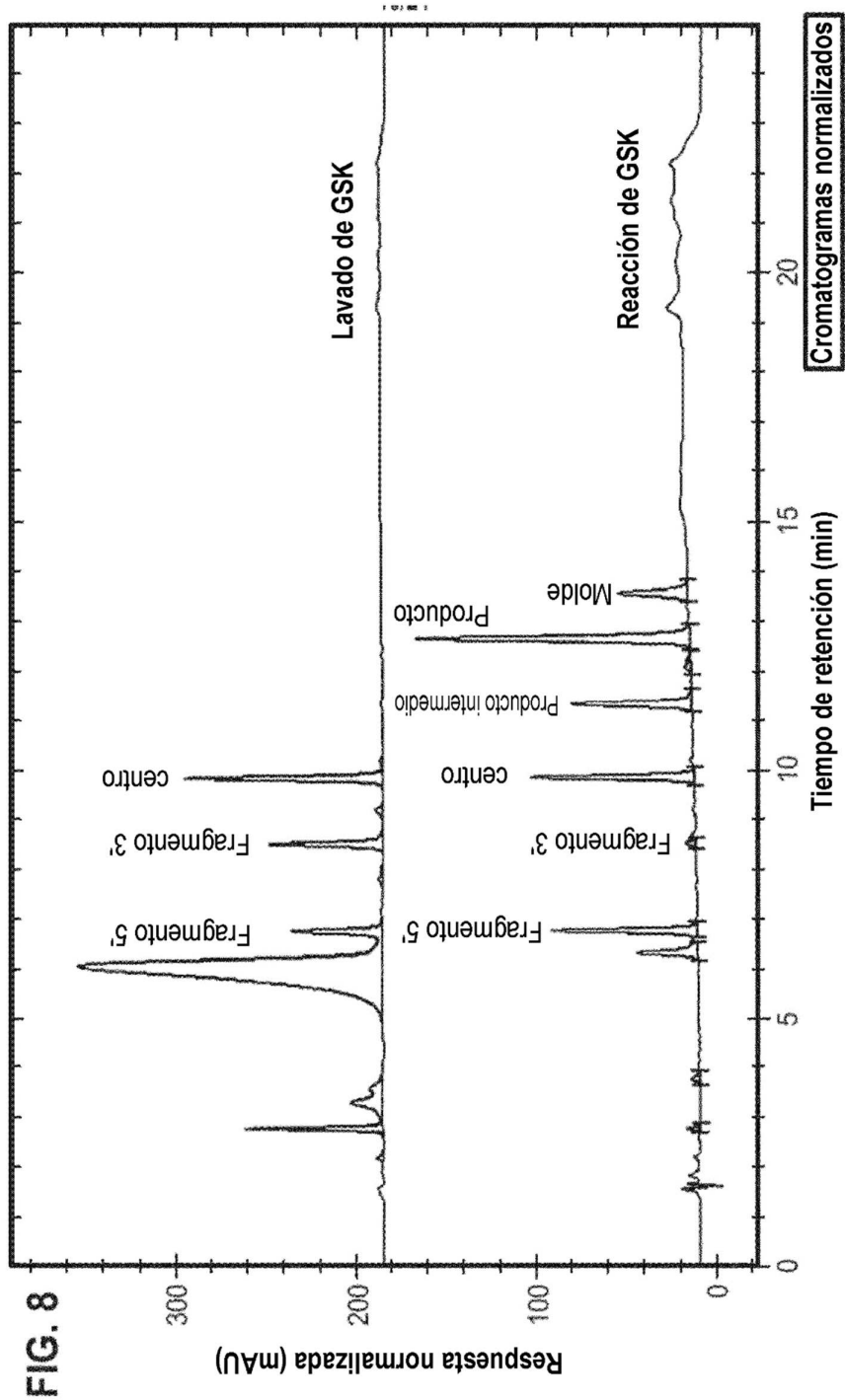


FIG. 8

FIG. 9

Experimento 2: Fragmento 3' sustituido con 2'OME

VWD1 A, Longitud de onda = 258nm (C:\CHEM32\1\DATA\OLIGO\OLIGO_SEQUENCE_TEMPLATE 2015-02-17 11-34-41\E2.D)

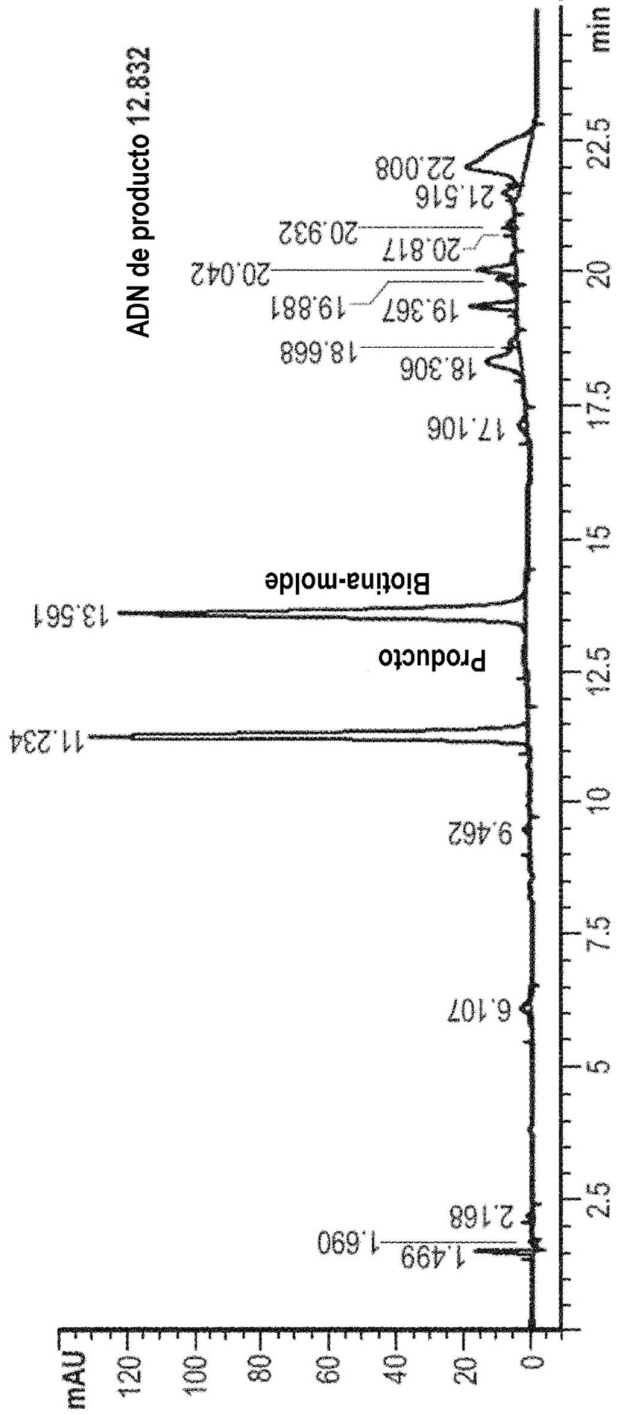


FIG. 9(continuación)

Experimento 3: Fragmento 5' sustituido con 2'OME

VWD1 A_Longitud de onda =258nm (C:\CHEM32\1\DATA\OLIGO\OLIGO_SEQUENCE_TEMPLATE 2015-02-17 11-34-41\E3.D)

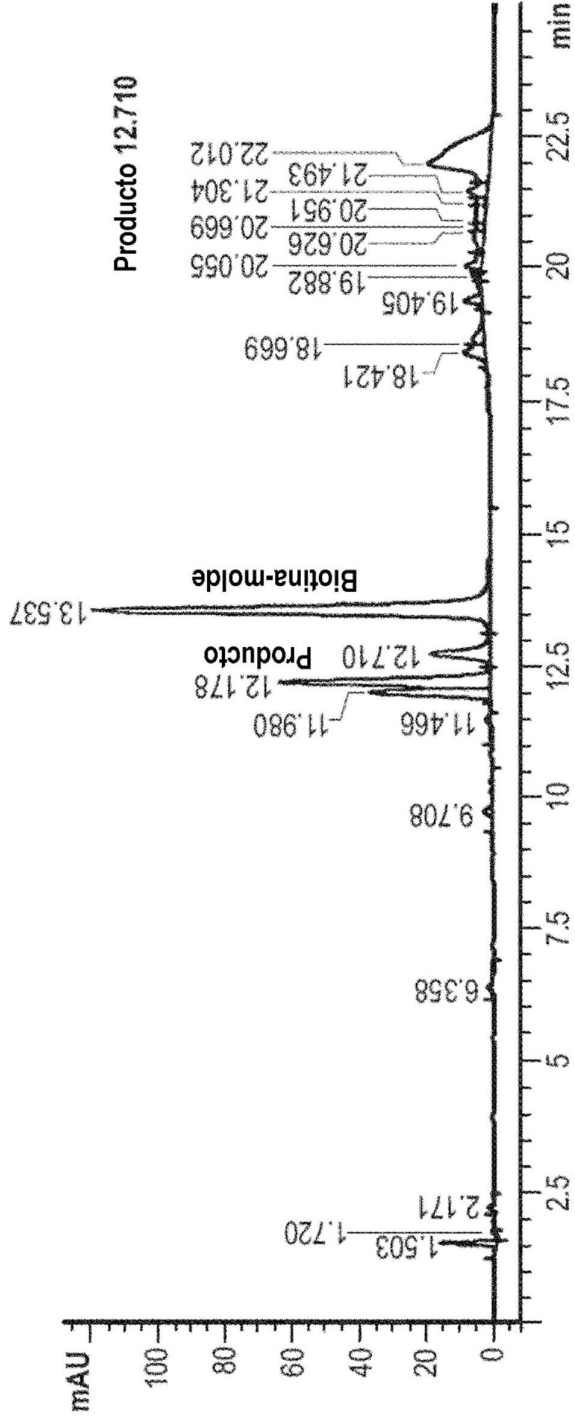
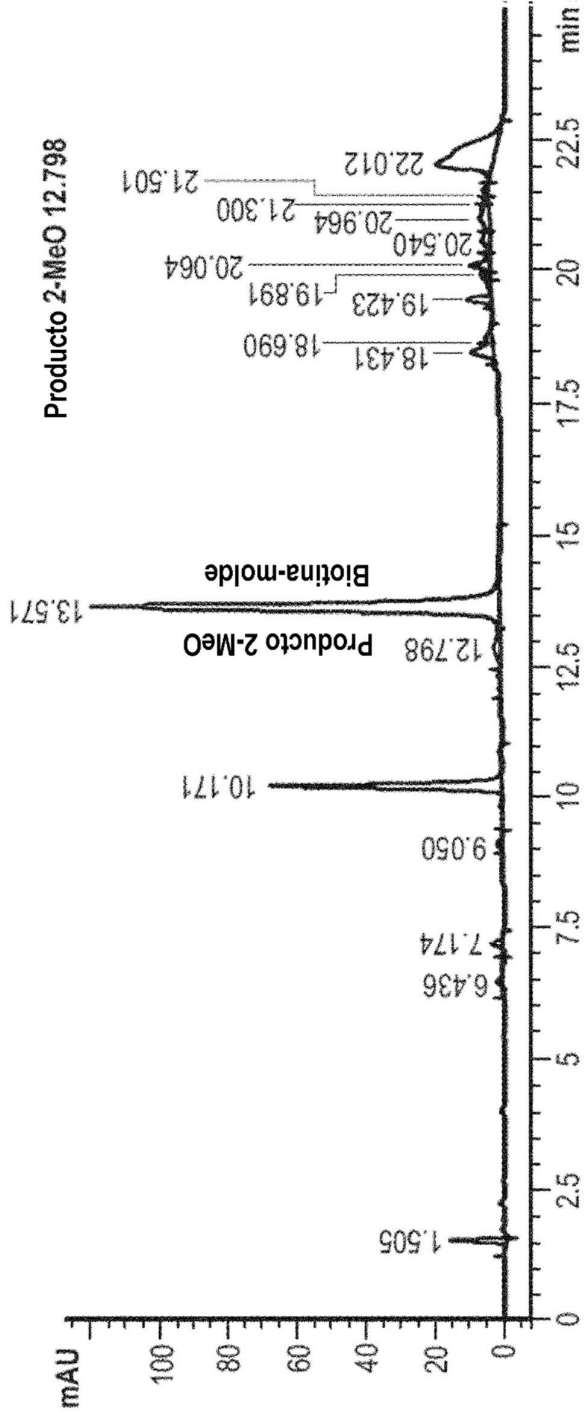


FIG. 9 (continuación)

Experimento 4: Todos los fragmentos sustituidos con 2'OMe

VWD1 A, Longitud de onda=258nm (C:\CHEM32\1\DATA\OLIGO\OLIGO_SEQUENCE_TEMPLATE 2015-02-17 11-34-41\E4.D)



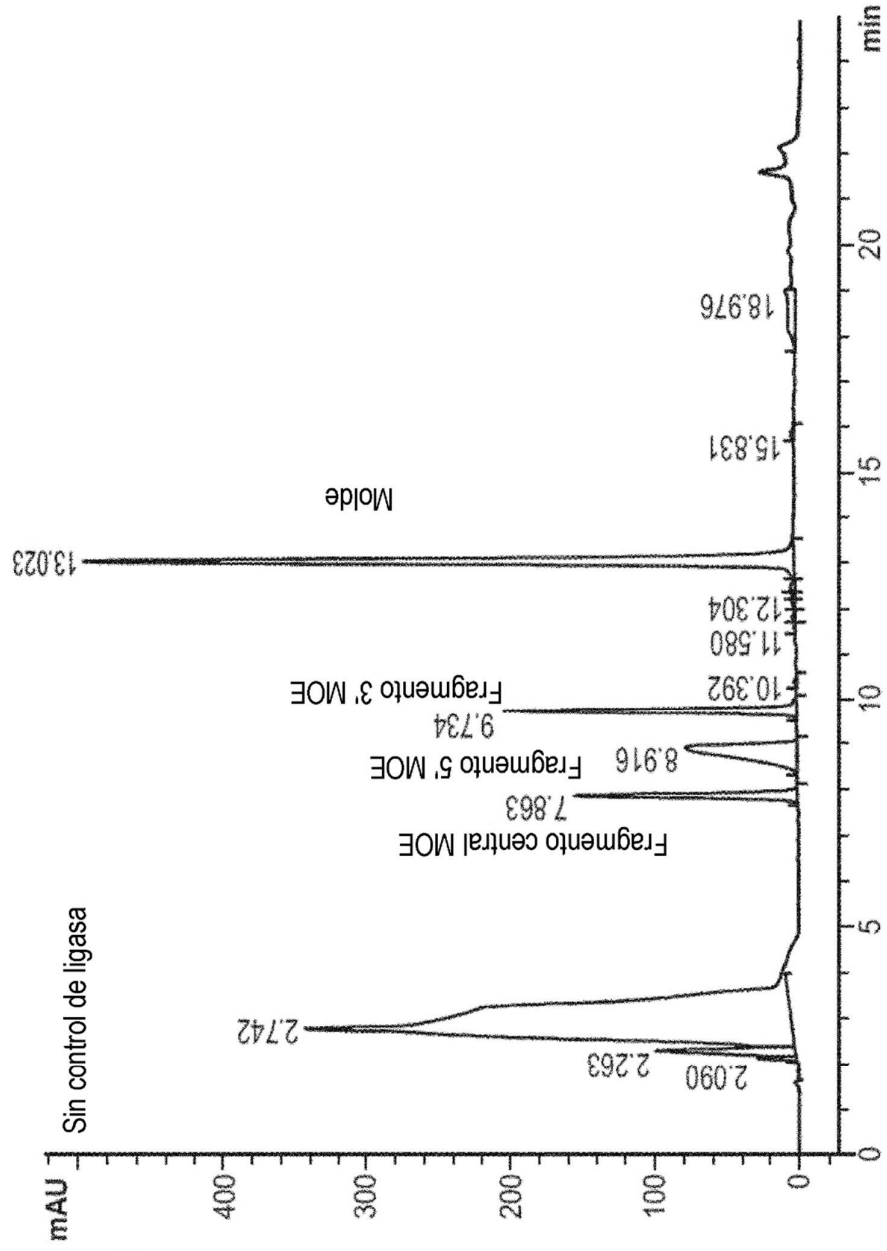


FIG. 10a

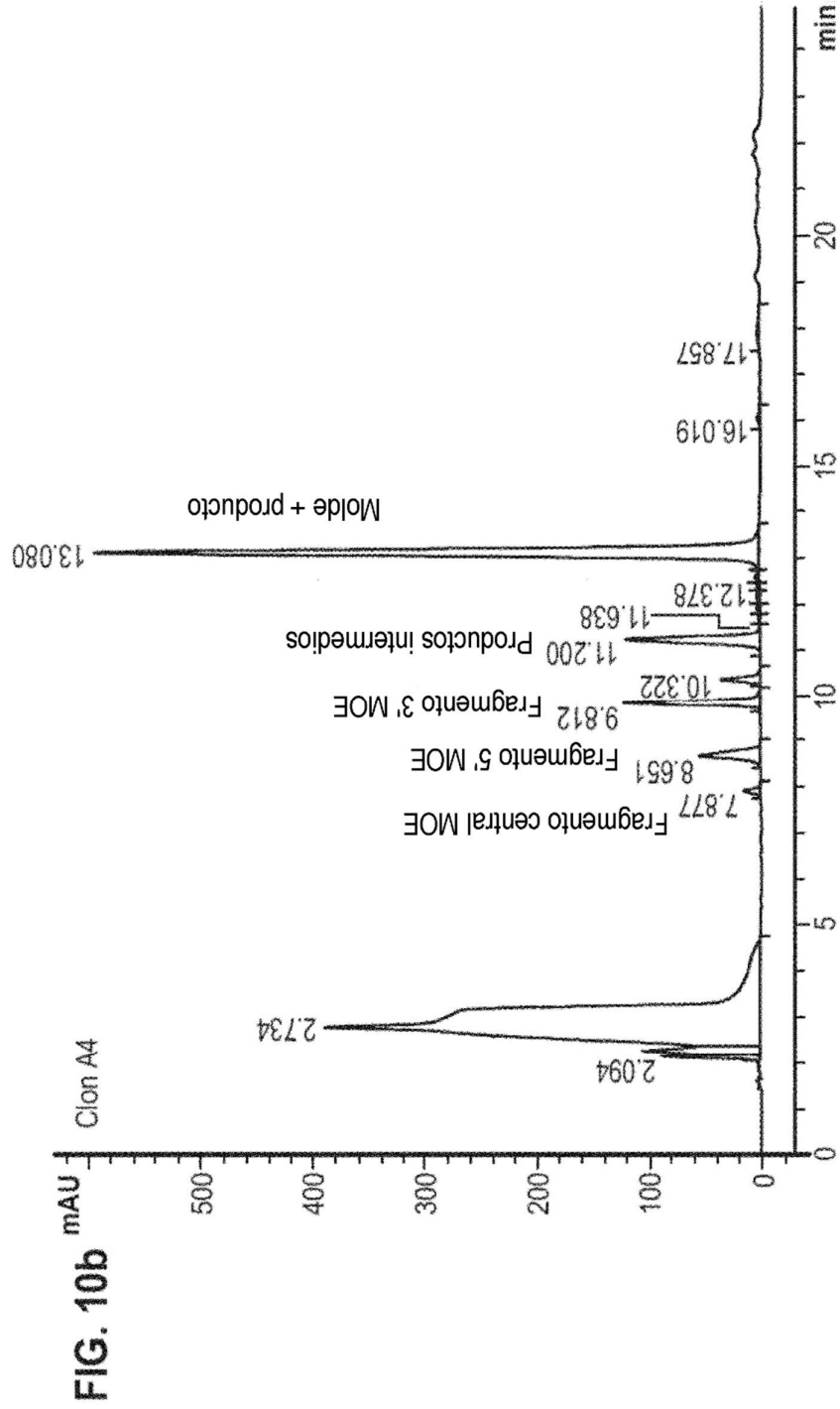


FIG. 11

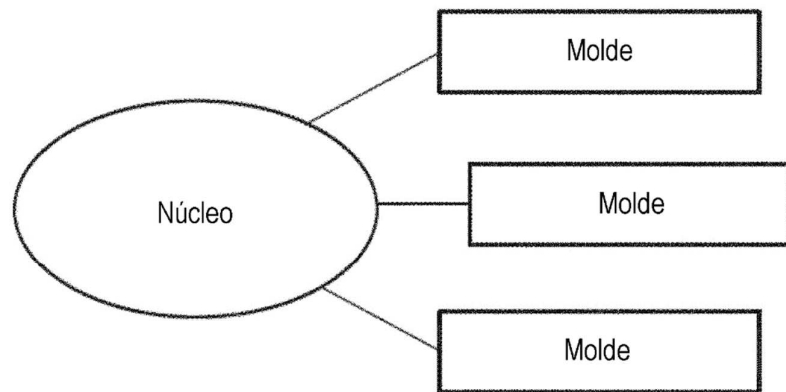
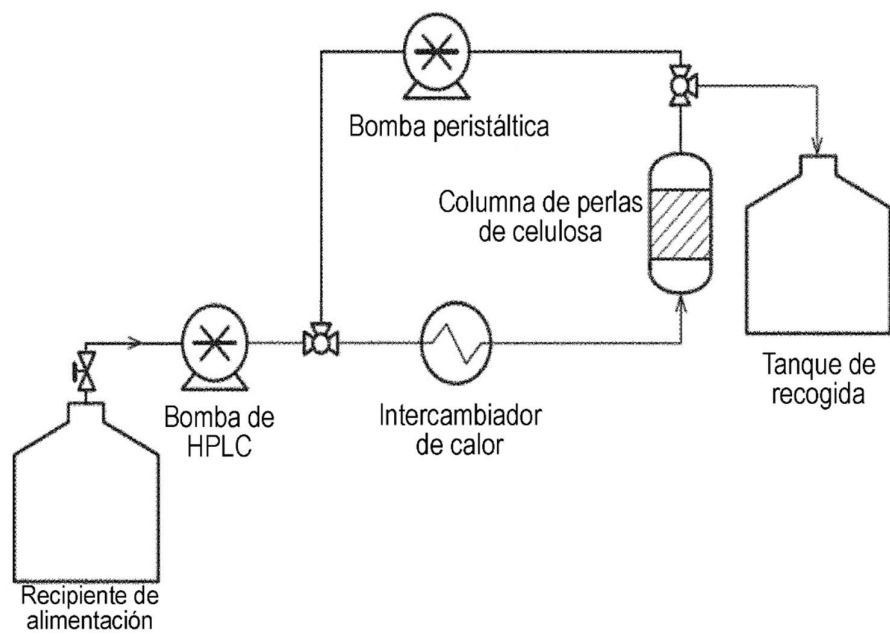


FIG. 12



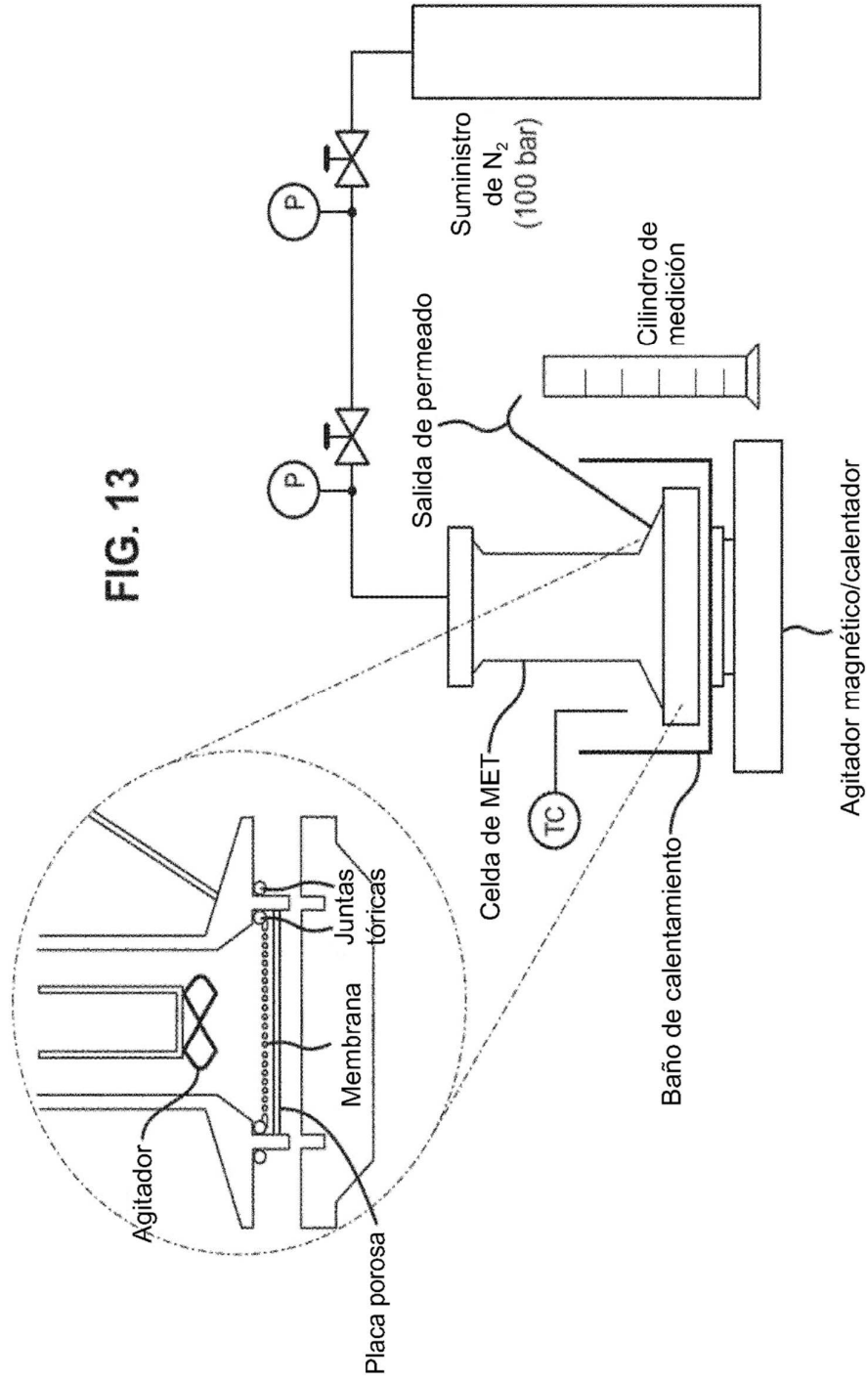
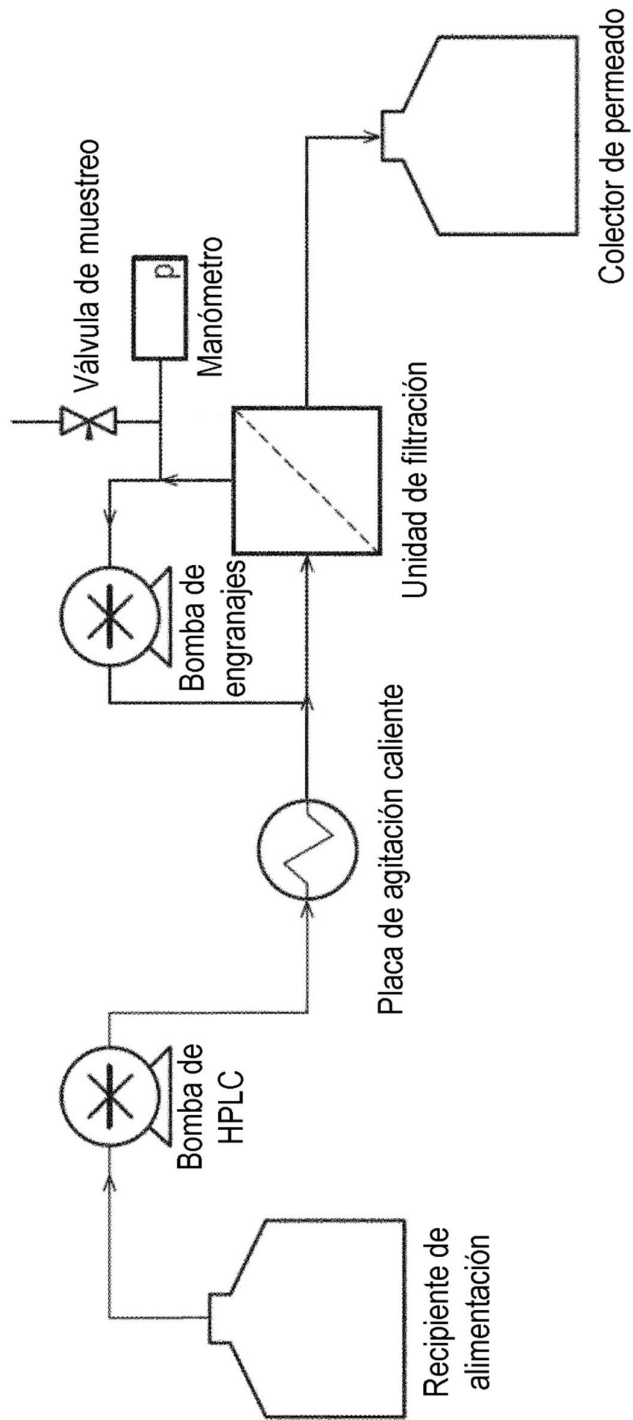


FIG. 14



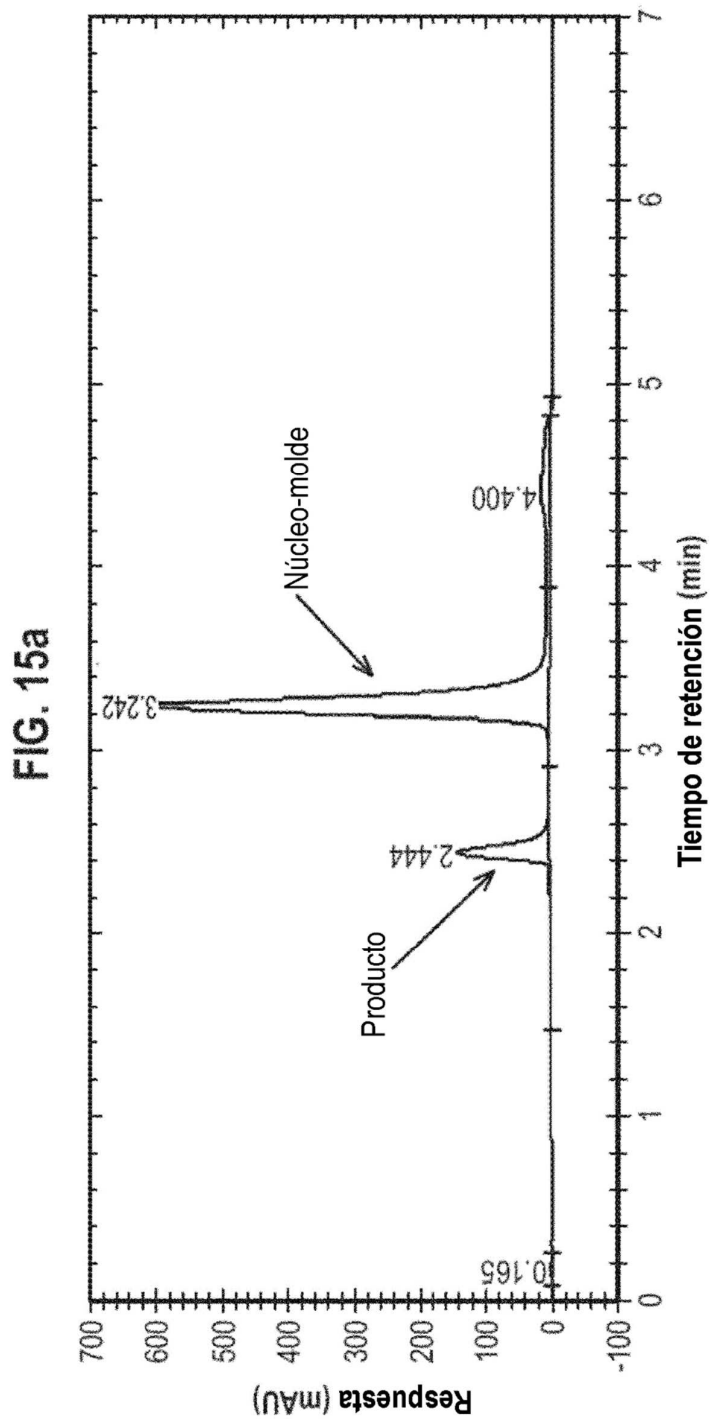


FIG. 15b

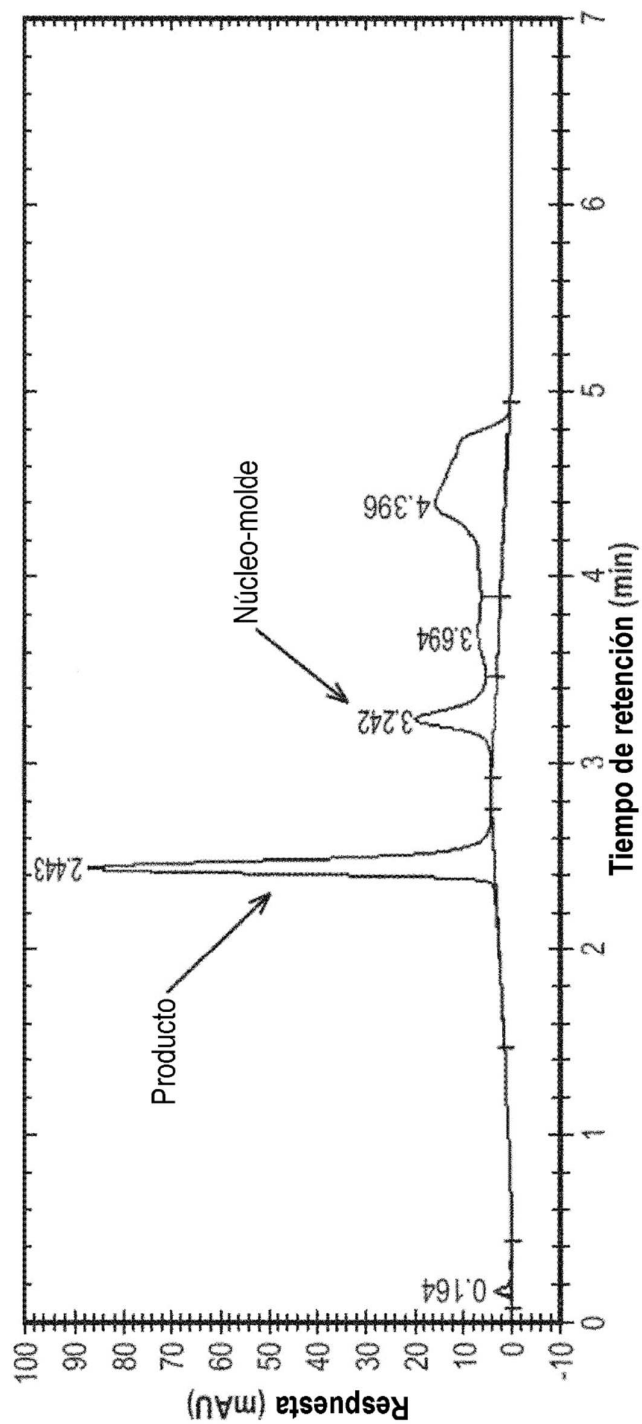


FIG. 16a

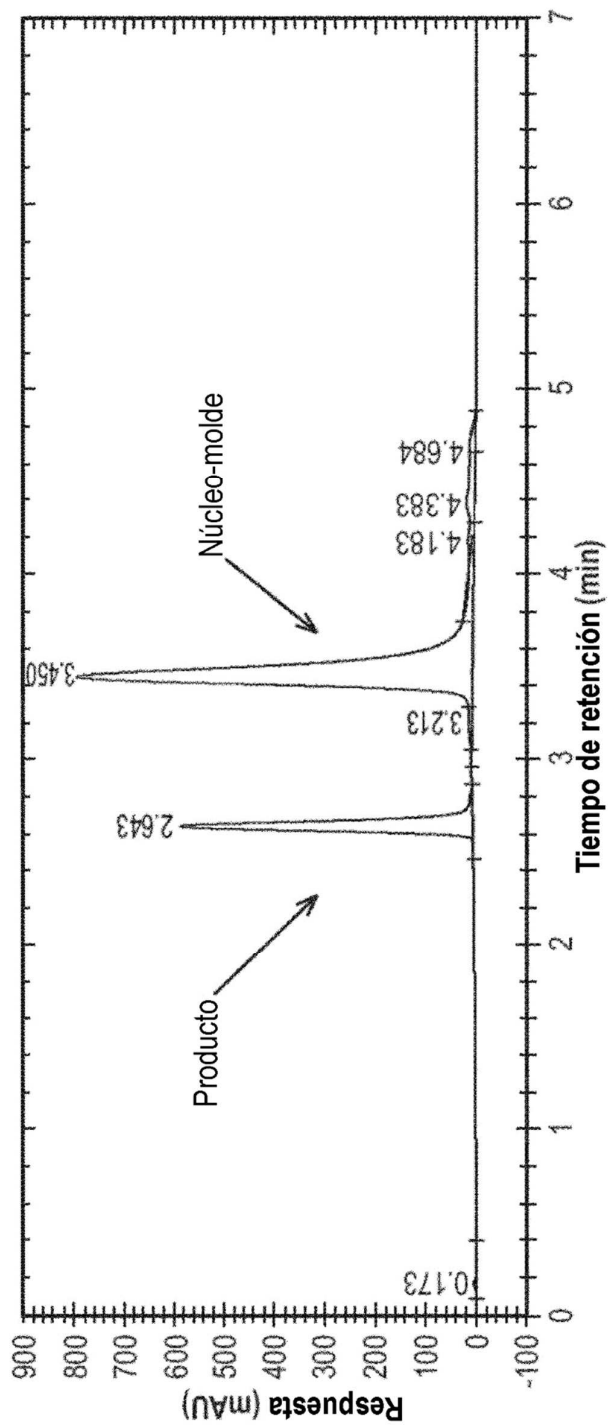


FIG. 16b

