

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 410**

51 Int. Cl.:

C07H 21/00 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C07H 19/16 (2006.01)

C07H 19/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2007 E 13186973 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2735568**

54 Título: **Análogos de oligonucleótidos que tienen enlaces intersubunitarios catiónicos**

30 Prioridad:

10.05.2006 US 432216 10.05.2006 US 432031
10.05.2006 US 432155 10.05.2006 US 431968
11.05.2006 US 433257 11.05.2006 US 799976 P
11.05.2006 US 800145 P 11.05.2006 US 433213
11.05.2006 US 433214 11.05.2006 US 433033
11.05.2006 US 433840 11.05.2006 US 433724
11.05.2006 US 800076 P 11.05.2006 US 800120 P
08.09.2006 US 518058 08.09.2006 US 517757
08.11.2006 US 595161 07.03.2007 US 715572

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2017

73 Titular/es:

SAREPTA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
215 First Street
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

WELLER, DWIGHT D.;
HASSINGER, JED N. y
CAI, BAO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 645 410 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

Análogos de oligonucleótidos que tienen enlaces intersubunitarios catiónicos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a análogos de oligonucleótidos (oligómeros) útiles como compuestos antisentido, y más particularmente a oligómeros que contienen enlaces catiónicos, y el uso de dichos oligómeros en aplicaciones antisentido. Particularmente se prefieren oligómeros morfolino que contienen tanto enlaces sin carga como enlaces catiónicos, donde ambos pueden ser enlaces de forodiamidate, y enlaces catiónicos ejemplares incluyen un enlace de (1-piperazino) fosfinilidenoxi y un enlace (1-(4-(π -guanidino-alcanoil))-piperazino) fosfinilidenoxi.

Referencias

- 15 Arya, D. P. y T. C. Bruice (1999). "Triple-helix formation of DNA oligomers with methylthiourea-linked nucleosides (DNmt): a kinetic and thermodynamic analysis." *Proc Natl Acad Sci USA* 96(8): 4384-9.
- Bailey, C. P., J. M. Dagle *et al.* (1998). "Cationic oligonucleotides can mediate specific inhibition of gene expression in *Xenopus oocytes*." *Nucleic Acids Res* 26(21): 4860-7.
- 20 Barawkar, D. A. y T. C. Bruice (1998). "Synthesis, biophysical properties, and nuclease resistance properties of mixed backbone oligodeoxynucleotides containing cationic internucleoside guanidinium linkages: deoxynucleic guanidine/DNA chimeras." *Proc Natl Acad Sci USA* 95(19): 11047-52.
- Bray, M., K. Davis *et al.* (1998). "A mouse model for evaluation of prophylaxis and therapy of Ébola hemorrhagic fever." *J Infect Dis* 178(3): 651-61.
- 25 Connolly, B. M., K. E. Steele *et al.* (1999). "Pathogenesis of experimental Ébola virus infection in guinea pigs." *J Infect Dis* 179 Suppl 1: S203-17.
- Crooke, S. T. (2001). *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications*. Nueva York, Marcel Dekker.
- Dempcy, R. O., O. Almarsson *et al.* (1994). "Design and synthesis of deoxynucleic guanidine: a polycation analogue of DNA." *Proc Natl Acad Sci USA* 91(17): 7864-8.
- 30 Dempcy, R. O., J. Luo *et al.* (1996). "Design and synthesis of ribonucleic guanidine: a polycationic analog of RNA." *Proc Natl Acad Sci USA* 93(9): 4326-30.
- Egli, M., G. Minasov *et al.* (2005). "Probing the influence of stereoelectronic effects on the biophysical properties of oligonucleotides: comprehensive analysis of the RNA affinity, nuclease resistance, and crystal structure of ten 2'-O-ribonucleic acid modifications." *Biochemistry* 44(25): 9045-57.
- 35 Linkletter, B. A. y Bruice, T.C. (2000). "Solid-phase synthesis of positively charged deoxynucleic guanidine (DNG) modified oligonucleotides containing neutral urea linkages: Effect of charge deletions on binding and fidelity." *Bioorg. Med. Chem.* 8(11): 1893-1901.
- Linkletter, B. A., I. E. Szabo *et al.* (2001). "Solid-phase synthesis of oligopurine deoxynucleic guanidine (DNG) and analysis of binding with DNA oligomers." *Nucleic Acids Res* 29(11): 2370-6.
- 40 Micklefield, J. (2001). "Backbone modification of nucleic acids: synthesis, structure and therapeutic applications." *Curr Med Chem* 8(10): 1157-79.
- Moulton, H. M., M. H. Nelson *et al.* (2004). "Cellular uptake of antisense morpholino oligomers conjugated to argininerich peptides." *Bioconjug Chem* 15(2): 290-9.
- Nelson, M. H., D. A. Stein *et al.* (2005). "Arginine-rich peptide conjugation to morpholino oligomers: effects on antisense activity and specificity." *Bioconjug Chem* 16(4): 959-66.
- 45 Summerton, J.E. y Weller D.E. (1993). US5185444 Summerton, J. and D. Weller (1997). "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7(3): 187-95.
- Warfield, K. L., D. L. Swenson, *et al.* (2006). "Gene-Specific Countermeasures against Ébola Virus Based on Antisense Phosphorodiarridate Morpholino Oligomers." *PLoS Pathog* 2(1): e1.

50 Antecedentes de la Invención

Los requisitos para implementación exitosa de moléculas terapéuticas antisentido, que se diseñan en general para unirse con ADN o ARN de proteínas causantes de enfermedad para prevenir la enfermedad para prevenir la producción de dichas proteínas, incluyen (a) estabilidad *in vivo*, (b) suficiente permeabilidad de membrana y captación celular, y (c) un buen equilibrio de afinidad de unión y especificidad de secuencia. Se han desarrollado muchos análogos de oligonucleótidos en los que los enlaces fosfodiéster de ADN nativo se reemplazan por otros enlaces que son resistentes a degradación por nucleasa (véase por ejemplo Barawkar y Bruice 1998; Linkletter, Szabo *et al.* 2001; Micklefield 2001). También se han preparado oligonucleótidos antisentido que tienen diversas modificaciones de cadena principal distintas del enlace internucleosídico (Crooke 2001; Micklefield 2001). Además, se han modificado oligonucleótidos por conjugación con péptidos para potenciar la captación celular (Moulton, Nelson *et al.* 2004; Nelson, Stein *et al.* 2005).

El rendimiento de dichos análogos de ácido nucleico como fármacos antisentido o antigénicos se ha visto obstaculizado por ciertas características de los diversos análogos. Por ejemplo, los análogos con enlaces con carga negativa, incluyendo análogos unidos por fosforotioato, padecen repulsión electrostática considerable entre las

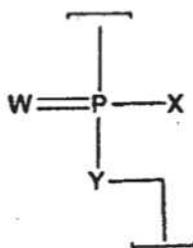
cargas negativas del oligómero y la diana de ADN o ARN. Los fosforotioatos también muestran unión no específica con otros componentes celulares tales como proteínas. Estos atributos limitan la utilidad de oligómeros antisentido comprendidos por ARN nativo, ADN nativo y análogos con carga negativa como agentes terapéuticos (Crooke 2001). Los análogos de oligonucleótidos con enlaces de metilfosfonato no iónicos pueden transportarse a células por difusión pasiva y/o endocitosis de fase fluida pero su uso está obstaculizado por la complejidad estereoisomérica y la escasa solubilidad (Crooke 2001; Micklefield 2001).

Varios grupos han presentado la síntesis de oligonucleótidos con carga positiva (Bailey, Dagle *et al.* 1998; Micklefield 2001; Egli, Minasov *et al.* 2005). Por ejemplo, se ha presentado una clase de nucleósidos con enlaces de guanidinio (designados DNG), formados por reemplazo de los enlaces fosfato en ADN y ARN por grupos de guanidino aquiral (Dempcy, Almarsson *et al.* 1994; Dempcy, Luo *et al.* 1996; Barawkar y Bruice 1998; Linkletter, Szabo *et al.* 2001). También se han presentado oligómeros unidos con enlaces de tiourea metilada con carga positiva (Arya y Bruice 1999). Se ha indicado que el reemplazo de algunos de estos enlaces con enlaces de urea neutros reduce la tendencia de dichos oligómeros con carga positiva hacia la unión no específica de secuencia (Linkletter y Bruice, 2000). Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de análogos de oligonucleótidos con rendimiento antisentido o antigénico mejorado, particularmente en el área de afinidad más fuerte por ADN y ARN, sin comprometer la selectividad de secuencia.

Sumario

La invención proporciona, en un aspecto, un oligómero que comprende una cadena principal que consiste en una secuencia de estructuras de anillo de morfolino unidas por enlaces intersubunitarios, donde cada una de dichas estructuras de anillo soporta un resto formador de par de bases, de modo que dicho oligómero puede unirse de una manera específica de secuencia con un ácido nucleico diana, y donde al menos un enlace intersubunitario entre dos de dichas estructuras anulares consecutivas contiene un grupo catiónico colgante. El grupo colgante porta un átomo de nitrógeno distante que puede portar una carga positiva a pH neutro o casi neutro (por ejemplo fisiológico).

Los enlaces intersubunitarios son preferentemente enlaces que contienen fósforo, que tienen la estructura:



donde

W es S u O, y es preferentemente O,

X = NR¹R² u OR⁶,

Y = O o NR⁷,

y cada uno de dichos enlaces en el oligómero se selecciona de:

(a) enlaces sin carga (a), donde cada uno de R¹, R², R⁶ y R⁷ se selecciona de forma independiente de hidrogeno y alquilo inferior;

(b1) enlace catiónico (b1), donde X = NR¹R² e Y = O, y NR¹R² representa un grupo piperazino opcionalmente sustituido, de modo que R¹R² = -CHRCHR(NR³)(R⁴)CHRCHR-, donde cada R es de forma independiente H o CH₃,

R⁴ es H, CH₃, o un par de electrones, y

R³ se selecciona de H, alquilo inferior, C(=NH)NH₂, Z-L-NHC(=NH)NH₂ y [C(O)CHR'NH]_mH, donde: Z es C(O) o un enlace directo, L es un enlazador opcional de hasta 18 átomos de longitud, preferentemente hasta 12 átomos, y más preferentemente hasta 8 átomos de longitud, que tienen enlaces seleccionados de alquilo, alcoxi y alquilamino, R' es una cadena lateral de un aminoácido de origen natural o un homólogo de uno o dos carbonos del mismo, y m es de 1 a 6, preferentemente de 1 a 4;

(b2) enlace catiónico (b2), donde X = NR¹R² e Y = O, R¹ = H o CH₃, y R² = LNR³R⁴R⁵, donde L, R³ y R⁴ son como se ha definido anteriormente, y R⁵ es H, alquilo inferior o (alcoxi) alquilo inferior; y

(b3) enlace catiónico (b3), donde Y = NR⁷ y X = OR⁶, y R⁷ = LNR³R⁴R⁵, donde L, R³, R⁴ y R⁵ son como se ha definido anteriormente, y R⁶ es H o alquilo inferior;

y al menos uno de dichos enlaces se selecciona de enlaces catiónicos (b1), (b2) y (b3).

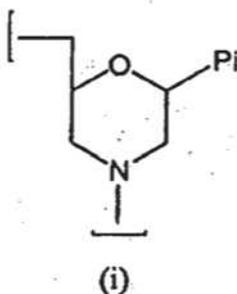
Preferentemente, el oligómero incluye al menos dos enlaces consecutivos de tipo (a) (es decir enlaces sin carga). En realizaciones adicionales, al menos el 5 % de los enlaces en el oligómero son enlaces catiónicos (es decir tipo (b1), (b2) o (b3)); por ejemplo, 10 % a 80 %, 10 % a 50 %, o 10 % a 35 % de los enlaces pueden ser enlaces catiónicos.

- 5 Preferentemente, todos los enlaces catiónicos en el oligómero son del mismo tipo; es decir, todos de tipo (b1), todos de tipo (b2) o todos de tipo (b3).

10 En una realización, al menos un enlace es de tipo (b1), donde, preferentemente, cada R es H, R⁴ es H, CH₃, o un par de electrones, y R³ se selecciona de H, alquilo inferior, por ejemplo CH₃, C(=NH)NH₂, y C(O)-L-NHC(=NH)NH₂. Esas dos últimas realizaciones de R³ proporcionan un resto de guanidino, unido directamente al anillo de piperazina o colgante de un grupo enlazador L, respectivamente. Para facilitar la síntesis, la Variable Z en R³ es preferentemente C(O) (carbonilo), como se muestra.

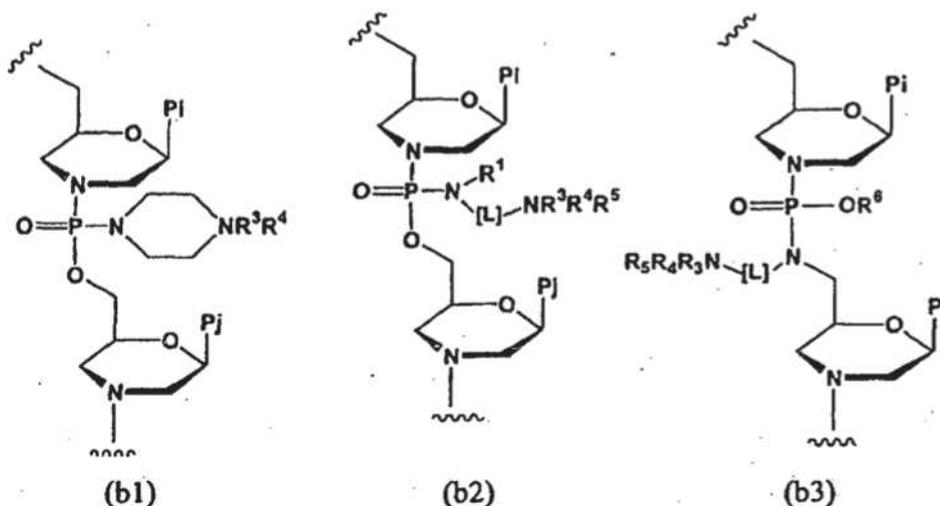
15 El grupo enlazador L, como se ha indicado anteriormente, contiene enlaces en su cadena principal seleccionados de alquilo (por ejemplo -CH₂-CH₂-), alcoxi (-C-O-) y alquilamino (por ejemplo -CH₂-NH-), a condición de que los átomos terminales en L (por ejemplo, los adyacentes a carbonilo o nitrógeno) sean átomos de carbono. Aunque son posibles enlaces ramificados (por ejemplo, -CH₂-CHCH₃-) el enlazador está preferentemente no ramificado. En una realización, el enlazador es un enlazador de hidrocarburo. Dicho enlazador puede tener la estructura -(CH₂)_n-, donde n es 1-12, preferentemente 2-8 y más preferentemente 2-6.

20 Las subunidades de morfolino tienen la estructura:



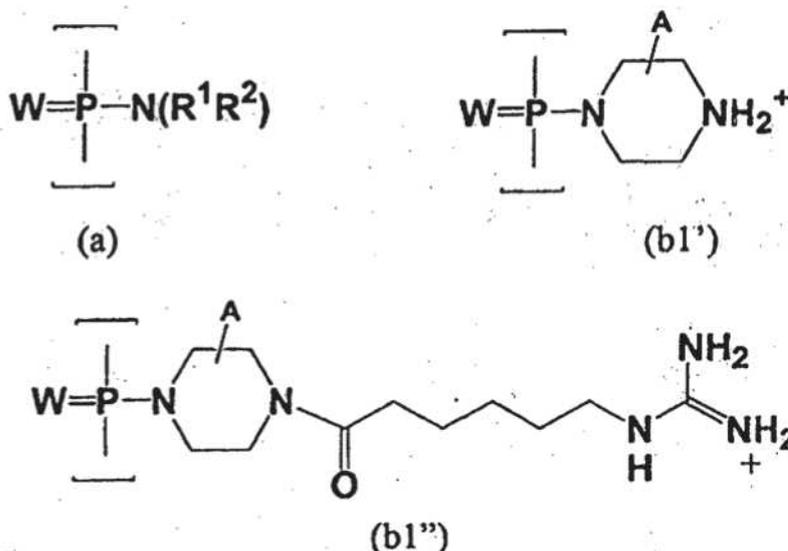
25 donde Pi es un resto formador de pares de bases, y los enlaces representados anteriormente conectan el átomo de nitrógeno de (i) con el carbono 5' de una subunidad adyacente. Los restos formadores de pares de bases Pi pueden ser iguales o diferentes y se diseñan en general para proporcionar una secuencia que se une con un ácido nucleico diana.

30 El uso de realizaciones de los tipos de enlace (b1), (b2) y (b3) anteriores para unir subunidades de morfolino puede ilustrarse gráficamente de la siguiente manera:



35 Preferentemente, al menos el 5 % de los enlaces en un oligómero se seleccionan de enlaces catiónicos (b1), (b2) y (b3); en realizaciones adicionales, del 10 % al 35 % de los enlaces se seleccionan de enlaces catiónicos (b1), (b2) y (b3). Como se ha observado anteriormente, todos los enlaces catiónicos en un oligómero son preferentemente del mismo tipo o estructura.

En realizaciones adicionales, los enlaces catiónicos se seleccionan de enlaces (b1') y (b1'') como se muestra posteriormente, donde (b1') se denomina en el presente documento enlace "Pip" y (b1'') se denomina en el presente documento enlace "GuX":



5

10

15

En las estructuras anteriores, W es S u O, y es preferentemente O; cada uno de R¹ y R² se selecciona de forma independiente de hidrógeno y alquilo inferior y es preferentemente metilo; y A representa hidrógeno o un sustituyente no interferente en uno o más átomos de carbono en (b1') y (b1''). Preferentemente, cada A es hidrógeno; es decir, el heterociclo de nitrógeno está preferentemente no sustituido. En realizaciones adicionales, al menos el 10 % de los enlaces son de tipo (b1') o (b1''); por ejemplo, 20 % a 80 %, 20 % a 50 %, o 20 % a 30 % de los enlaces puede ser de tipo (b1') o (b1'').

20

En otras realizaciones, el oligómero no contiene ningún enlace de tipo (b1'). Como alternativa, el oligómero no contiene ningún enlace de tipo (b1) donde cada R es H, R³ es H o CH₃, y R⁴ es H, CH₃, o un par de electrones.

25

En más realizaciones adicionales, los enlaces catiónicos son del tipo (b2), donde L es un enlazador de hasta 12 átomos de longitud que tiene enlaces seleccionados de alquilo (por ejemplo -CH₂-CH₂-), alcoxi (-CO-) y alquilamino (por ejemplo -CH₂-NH-), a condición de que los átomos terminales en L (por ejemplo, los adyacentes a carbonilo o nitrógeno) sean átomos de carbono.

30

Las subunidades de morfolino también pueden unirse por enlaces intersubunitarios no basados en fósforo, como se describe adicionalmente posteriormente, donde al menos un enlace está modificado con un grupo catiónico colgante como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, podría emplearse un átomo de nitrógeno 5' en un anillo de morfolino en un enlace de sulfamida (véase por ejemplo Fig. 2G) o un enlace de urea (donde se reemplaza fósforo con carbono o azufre, respectivamente) y modificarse de una manera análoga al átomo de nitrógeno 5' en la estructura (b3) anterior.

35

El oligómero objeto también puede conjugarse con un resto de transporte de péptidos que es eficaz para potenciar el transporte del oligómero a células. El resto de transporte se une preferentemente a un extremo del oligómero, como se muestra, por ejemplo, en la Fig. 1D, así como en las Figs. 2P-2Q.

40

Preferentemente, el resto de transporte comprende de 6 a 16 aminoácidos y está compuesto de subsecuencias seleccionadas del grupo que consiste en (X' Y' X'), (X' Y'), (X' Z') y (X' Z' Z'), donde

45

(a) cada subunidad X' representa de forma independiente arginina o un análogo de arginina, siendo dicho análogo un aminoácido α catiónico que comprende una cadena lateral de la estructura R¹N=C(NH₂)R², donde R¹ es H o R; R² es R, NH₂, NHR, o NR₂, donde R es alquilo inferior o alqueno inferior y puede incluir además oxígeno o nitrógeno; R¹ y R² pueden formar juntos un anillo; y la cadena lateral se une a dicho aminoácido mediante R¹ o R²;

(b) cada subunidad Y' representa de forma independiente un aminoácido lineal neutro -C(O)-(CHR)_n-NH-, donde n es de 1 a 7 y cada R es de forma independiente H o metilo; y

(c) cada subunidad Z' representa de forma independiente un aminoácido α que tiene una cadena lateral de alquilo neutra.

En realizaciones seleccionadas, el péptido comprende una secuencia que consiste en al menos dos, o al menos tres, repeticiones de una única subsecuencia seleccionada de (X' Y' X'), (X' Y'), (X' Z') y (X' Z' Z'). Por ejemplo, el péptido puede comprender una secuencia representada por una de (X' Y' X')_p, (X' Y')_m y (X' Z' Z')_p, donde p es de 2 a 5 y m es de 2 a 8.

5 Preferentemente, para cada X', el resto de cadena lateral es guanidilo; cada Y' es -CO-(CH₂)_n-NH-, donde n es de 1 a 7; y cada Z' es fenilalanina. En realizaciones preferidas de Y', n es 2 o 5, de modo que Y' se selecciona de una subunidad de β-alanina y una subunidad de ácido 6-aminohexanoico.

10 Los péptidos preferidos de este tipo incluyen los que comprenden dímeros de arginina que se alternan con subunidades individuales Y', donde Y' es preferentemente Ahx. Los ejemplos incluyen péptidos que tienen la fórmula (RY'R)₄ o la fórmula (RRY')₄, donde Y' es preferentemente Ahx. En una realización, Y' es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico y p es 4. En una realización adicional, cada Z' es fenilalanina, y m es 3 o 4.

15 El péptido conjugado está unido preferentemente a un extremo del oligómero mediante un enlazador Ahx-B, donde Ahx es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico y B es una subunidad de β-alanina, como se muestra, por ejemplo, en la Fig. 1D.

20 En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método para potenciar la actividad antisentido de un oligómero que tiene una secuencia de subunidades morfolino, unidas por enlaces intersubunitarios, que soportan restos de formación de pares de bases, modificando dicho oligómero para contener al menos un enlace intersubunitario catiónico como se desvela en el presente documento. En una realización, dicho enlace o dichos enlaces intersubunitarios catiónicos no incluyen enlaces de tipo (b¹) como se ha representado anteriormente. La potenciación de la actividad antisentido puede demostrarse por:

25 (i) una reducción de la expresión de una proteína codificada, en relación con la proporcionada por un oligómero no modificado correspondiente, cuando la unión del oligómero antisentido con su secuencia diana es eficaz para bloquear un codón de inicio de la traducción para la proteína codificada, o

30 (ii) un aumento de la expresión de la proteína codificada, en relación con la proporcionada por oligómeros no modificados correspondientes, cuando la unión del oligómero antisentido con su secuencia diana sea eficaz para bloquear un sitio de corte y empalme aberrante en un pre-ARNm que codifica dicha proteína cuando se corta y empalma correctamente. Se describen adicionalmente más adelante ensayos adecuados para la medición de estos efectos. En una realización, la modificación proporciona esta actividad en un ensayo de traducción sin células, o un ensayo de traducción de corrección de corte y empalme en cultivo celular, como se describe en el presente documento. Preferentemente, la actividad está potenciada en un factor de al menos dos, más preferentemente en un factor de al menos cinco, más preferentemente en un factor de al menos diez.

40 Los compuestos descritos en el presente documento pueden usarse en métodos para inhibir la producción de la proteína. En consecuencia, un ácido nucleico que codifica dicha proteína se expone a un oligómero antisentido que contiene al menos un enlace intersubunitario catiónico, y preferentemente que contiene del 20 % al 50 % de dichos enlaces catiónicos, como se desvela en el presente documento, donde los restos de formación de pares de bases Pi forman una secuencia eficaz para hibridar con una parte del ácido nucleico en una localización eficaz para inhibir la producción de la proteína. La localización puede ser, por ejemplo, un codón de inicio ATG de un ARNm, un sitio de corte y empalme de un pre-ARNm, o una secuencia diana vírica como se describe posteriormente.

45 Preferentemente, el oligómero tiene una T_m con respecto a la unión con la secuencia diana de más de aproximadamente 50 °C, y es captado activamente por células de mamífero. El oligómero puede conjugarse con un resto de transporte como se describe en el presente documento para facilitar dicha captación.

50 En una realización, el oligómero puede usarse en un método para reducir el riesgo de reestenosis en una región de un vaso coronario de un paciente que se ha tratado por angioplastia coronaria usando un catéter con un balón expandible en extremo distal o que está en un punto de unión formado en una operación de derivación coronaria. El método incluye administrar al paciente, por administración local directamente en el sitio de la lesión vascular, un oligómero como se describe en el presente documento, que contiene al menos un enlace intersubunitario catiónico, y preferentemente que contiene de 20 % a 50 % de dichos enlaces catiónicos, que tienen de 12 a 40 subunidades, incluyendo una secuencia de bases de dirección que es complementaria de otra secuencia diana de al menos 12 bases contiguas dentro de la región del sitio de inicio AUG de ARNm de *c-myc* humano definido por SEQ ID NO: 59, en una cantidad eficaz para reducir el riesgo de reestenosis en el paciente. El compuesto se administra por uno de:

60 (a) contacto de la región del vaso con un depósito que contiene el compuesto antisentido e introducción del compuesto del depósito en el vaso por iontoforesis o electroporación;

(b) inyección del compuesto del catéter directamente en la región del vaso, bajo presión, a través de inyectores contenidos en la superficie del globo de catéter, donde dichos inyectores son capaces de penetrar en la túnica media en el vaso;

65 (c) inyección en o contacto de la región del vaso, de micropartículas que contienen el compuesto antisentido en forma inmovilizada;

(d) contacto de la región del vaso con un recubrimiento de hidrogel contenido en la superficie del globo de catéter, y que contiene el compuesto antisentido en forma difundible;

(e) contacto de la región del vaso con un estent que tiene una capa de superficie externa que contiene el compuesto antisentido en forma difundible; y

5 (f) inyección del compuesto por administración intravascular, que da como resultado suministro sistémico a los tejidos vasculares.

10 El compuesto antisentido puede tener una secuencia de dirección que tiene al menos un 90 % de homología con la secuencia identificada por SEQ ID NO: 43 y, como alternativa, al menos 90 % de homología con una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 60 y 61.

15 En otra realización, el oligómero puede dirigirse contra una secuencia de ARNm que tiene su extremo 5' de 1 a aproximadamente 25 pares de bases cadena abajo de un punto de unión aceptor de corte y empalme normal en un ARNm preprocesado. Dicha dirección es eficaz para inhibir el procesamiento de corte y empalme de ARNm natural y producir ARNm variantes de corte y empalme.

20 Las proteínas diana adecuadas incluyen, por ejemplo, factores de transcripción, particularmente proteínas oncogénicas o protooncogénicas tales como myc, myb, rel, fos, jun, abl, bcl y p53; proteínas de matriz, tales como integrinas y catedrinas; otras proteínas expresadas por tumores, tales como hCG; telomerasas; proteínas receptoras; proteínas víricas, tales como las expresadas a partir del ARNm con corte y empalme subgenómico del VIH, virus del papiloma humano, y parvovirus humano B19; y proteínas inmunomoduladoras tales como, por ejemplo, CTLA-4, B7-2, PD-1, Foxp3, TGFbeta y receptor de TNF.

25 En otra realización, el oligómero puede usarse para inhibir la replicación de un virus de ARN de las familias de picornavirus, calicivirus, togavirus o flavivirus, que tienen un genoma con sentido positivo, monocatenario, de menos de 12 kb, y una primera fase abierta de lectura que codifica una poliproteína que contiene múltiples proteínas funcionales. En consecuencia, el virus, o, típicamente, una célula infectada con el virus, se expone a un oligómero como se desvela en el presente documento, que contiene al menos un enlace intersubunitario catiónico, y preferentemente que contiene 20 % a 50 % de dichos enlaces catiónicos, y que tiene una secuencia de subunidades que soportan una secuencia de bases de dirección que es sustancialmente complementaria de una secuencia diana vírica que abarca la región de inicio de la traducción de la primera fase abierta de lectura.

30 Las secuencias de dirección ejemplares tienen al menos 90 % de homología con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- 35 (i) SEQ ID NO. 62; para un virus de la polio de las cepas Mahoney y Sabin,
 (ii) SEQ ID NO. 63, para un virus de la hepatitis A,
 (iii) SEQ ID NO. 64, para un rinovirus 14,
 (iv) SEQ ID NO. 65, para un rinovirus 16,
 40 (v) SEQ ID NO. 66, para un rinovirus 1B,

Otras secuencias de dirección ejemplares, dirigidas contra un calicivirus, tienen al menos 90 % de homología con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- 45 (i) SEQ ID NO. 67, 68 y 69, para un vesivirus de serotipo Pan-1,
 (ii) SEQ ID NO. 70, para un calicivirus porcino,
 (iii) SEQ ID NO. 71, para un virus de Norwalk, y
 (iv) SEQ ID NO. 72, para un calicivirus felino.

50 Para uso en inhibición del virus de la hepatitis E, la secuencia de dirección tiene al menos 90 % de homología con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 73 y 74. Para uso en la inhibición de un flavivirus de la hepatitis C, la secuencia de dirección es complementaria de una secuencia de al menos 12 bases contiguas de la región del sitio de inicio AUG del VHC identificada por SEQ ID NO: 75. Las secuencias de dirección ejemplares incluyen las que tienen al menos 90 % de homología con SEQ ID NO. 18 y 76.

55 En una realización adicional, los oligómeros pueden usarse en la inhibición de la replicación dentro una célula hospedadora de un virus de ARN que tiene un genoma con sentido positivo, monocatenario, y seleccionado de una de las familias Flaviviridae, Picomoviridae, Caliciviridae, Togaviridae, Arteriviridae, Coronaviridae, Astroviridae o Hepeviridae.

60 El método incluye identificar en primer lugar como una secuencia diana vírica, una región dentro de las 40 bases 5' terminales de la cadena positiva del virus infeccioso cuya secuencia es capaz de formar una estructura secundaria de tallo-bucle interno. Se construye después, por síntesis de fase sólida por etapas, un oligómero que tiene al menos un enlace intersubunitario catiónico como se describe en el presente documento, y que contiene preferentemente del
 65 20 % al 50 % de dichos enlaces catiónicos, y que tiene una secuencia de dirección de al menos 12 subunidades que es complementaria de la región de genoma del virus capaz de formar una estructura bicatenaria interna, donde el

oligómero es capaz de formar con la secuencia diana vírica, una estructura de heterodúplex compuesta de la cadena con sentido positiva del virus y el compuesto oligonucleotídico, y caracterizado por una Tm de disociación al menos 45 °C y rotura de dicha estructura de tallo-bucle.

5 La secuencia diana puede identificarse analizando las secuencias 5' terminales, por ejemplo, las 40 bases 5' terminales, por un programa informático capaz de realizar predicciones de estructura secundaria basándose en una búsqueda del estado de energía libre mínima de la secuencia de ARN de entrada.

10 En un aspecto relacionado, los oligómeros pueden usarse en métodos para inhibir en una célula hospedadora de mamífero, la replicación de un virus de ARN infeccioso que tiene un genoma con sentido positivo, monocatenario, y seleccionado de una de las familias Flaviviridae, Picornaviridae, Caliciviridae, Togaviridae, Arteriviridae, Coronaviridae, Astroviridae o Hepeviridae. El método incluye la administrar a las células hospedadoras infectadas, una cantidad inhibitoria de virus de un oligómero como se describe en el presente documento, que tiene una secuencia de dirección de al menos 12 subunidades que es complementaria de una región dentro de las 40 bases 5' terminales del genoma vírico de cadena positiva que es capaz de formar estructura secundaria de tallo-bucle interna. El compuesto es eficaz, cuando se administra a las células hospedadoras, para formar una estructura de heterodúplex (i) compuesta de la cadena con sentido positiva del virus y el compuesto oligonucleotídico, y (ii) caracterizada por una Tm de disociación de al menos 45 °C y alteración de dicha estructura secundaria de tallo-bucle. El compuesto puede administrarse a un sujeto mamífero infectado con el virus, o en riesgo de infección con el virus.

Para el tratamiento de un *Flavivirus* o *Hepacivirus*, la secuencia de dirección es complementaria de una región asociada con una estructura secundaria de tallo-bucle dentro de una de las siguientes secuencias:

- 25 (i) SEQ ID NO. 77, para virus de la encefalitis de San Luis;
 (ii) SEQ ID NO. 78, para virus de la encefalitis japonesa;
 (iii) SEQ ID NO. 79, para un virus de la encefalitis del Valle de Murray;
 (iv) SEQ ID NO. 80, para un virus de la fiebre del Nilo occidental;
 (v) SEQ ID NO. 81, para un virus de la fiebre amarilla;
 30 (vi) SEQ ID NO. 82, para un virus de dengue de Tipo-2;
 (vii) SEQ ID NO. 83, para un virus de la Hepatitis C;
 (viii) SEQ ID NO. 84, para un virus de la encefalitis transmitida por garrapatas;
 (ix) SEQ ID NO. 85, para un virus de la fiebre hemorrágica de Omsk; y
 (x) SEQ ID NO. 86, para un virus Powassan.

35 Las secuencias de dirección ejemplares para estos virus incluyen las siguientes secuencias, o partes de estas secuencias, que solapan con una o más regiones de estructura secundaria bicatenaria en la secuencia diana asociada:

- 40 (i) SEQ ID NO. 87 y 88, para virus de la encefalitis de San Luis;
 (ii) SEQ In NO. 89 y 90, para virus de la encefalitis japonesa;
 (iii) SEQ ID NO. 91 y 92, para un virus de la encefalitis del Valle de Murray;
 (iv) SEQ ID NO. 93 y 94, para un virus de la fiebre del Nilo occidental;
 (v) SEQ ID NO. 95 y 96, para un virus de la fiebre amarilla;
 45 (vi) SEQ ID NO. 97, 98, para un virus de dengue;
 (vii) SEQ ID NO. 99 y 100, para un virus de la Hepatitis C;
 (viii) SEQ ID NO. 101 y 102, para un virus de la encefalitis transmitida por garrapatas;
 (ix) SEQ ID NO. 103 y 104, para un virus de la fiebre hemorrágica de Omsk; y
 (x) SEQ ID NO. 105 y 106, para un virus Powassan.

50 Para el tratamiento de un *Enterovirus*, *Rhinovirus*, *Hepatovirus* o *Aphthovirus*, la secuencia de dirección es complementaria de una región asociada con una estructura secundaria de tallo-bucle dentro de una de las siguientes secuencias:

- 55 (i) SEQ ID NO. 107, para un virus de la polio de las cepas Mahoney y Sabin;
 (ii) SEQ ID NO. 108, para un enterovirus humano A;
 (iii) SEQ ID NO. 109, para un enterovirus humano B;
 (iv) SEQ ID NO. 110, para un enterovirus humano C;
 (v) SEQ ID NO. 111, para un enterovirus humano D;
 60 (vi) SEQ ID NO. 112, para un enterovirus humano E;
 (vii) SEQ ID NO. 113, para un enterovirus bovino;
 (viii) SEQ ID NO. 114, para rinovirus humano 89;
 (ix) SEQ ID NO. 115, para rinovirus humano B;
 (x) SEQ ID NO. 116, para virus de glosopeda; y
 65 (xi) SEQ ID NO. 117, para un virus de la hepatitis A.

ES 2 645 410 T3

Las secuencias de dirección ejemplares para estos virus incluyen las siguientes secuencias, o parte de estas secuencias que solapan con una o más regiones de la estructura secundaria bicatenaria en la secuencia diana asociada:

- 5 (i) SEQ ID NO. 118 y 119, para un virus de la polio de las cepas Mahoney y Sabin;
- (ii) SEQ ID NO. 120 y 121, para un enterovirus humano A;
- (iii) SEQ ID NO. 122 y 123, para un enterovirus humano B;
- (iv) SEQ ID NO. 124 y 125, para un enterovirus humano C;
- (v) SEQ ID NO., 126 y 127, para un enterovirus humano D;
- 10 (vi) SEQ ID NO. 128 y 129, para un enterovirus humano E;
- (vii) SEQ ID NO. 130 y 131, para un enterovirus bovino;
- (viii) SEQ ID NO. 132 y 133, para rinovirus humano 89;
- (ix) SEQ ID NO. 134 y 135, para rinovirus humano B;
- (x) SEQ ID NO. 136 y 137, para virus de glosopeda; y
- 15 (xi) SEQ ID NO. 138 y 139, para un virus de la hepatitis A.

Para el tratamiento de un calicivirus o *Norovirus*, la secuencia de dirección es complementaria de una región asociada con una estructura secundaria de tallo-bucle dentro de una de las siguientes secuencias:

- 20 (i) SEQ ID NO. 140, para un calicivirus felino;
- (ii) SEQ ID NO. 141, para un calicivirus canino;
- (iii) SEQ ID NO. 142, para un calicivirus entérico porcino;
- (iv) SEQ ID NO. 143, para la cepa de calicivirus NB; y
- 25 (v) SEQ ID NO. 144, para un virus de Norwalk.

Las secuencias de dirección ejemplares para estos virus incluyen las siguientes secuencias, o partes de estas secuencias que se solapan con una o más regiones de la estructura secundaria bicatenaria en la secuencia diana asociada:

- 30 (i) SEQ ID NO. 145 y 146, para un calicivirus felino;
- (ii) SEQ ID NO. 147 y 148, para un calicivirus canino;
- (iii) SEQ ID NO. 149 y 150, para un calicivirus entérico porcino;
- (iv) SEQ ID NO. 151 y 152, para la cepa de calicivirus NB; y
- 35 (v) SEQ ID NO. 153 y 154, para un virus de Norwalk.

Para el tratamiento de *Hepevirus*, virus de la Hepatitis E, la secuencia de dirección es complementaria de una región asociada con una estructura secundaria de tallo-bucle dentro de la secuencia identificada como SEQ ID NO: 155. Las secuencias de dirección ejemplares incluyen SEQ ID NO: 156 y 157, o partes de las mismas que solapan con una o más regiones de estructura secundaria en la secuencia diana asociada.

40 Para el tratamiento de un *Rubivirus* o *Alphavirus*, la secuencia de dirección es complementaria de una región asociada con una estructura secundaria de tallo-bucle dentro de una de las siguientes secuencias:

- 45 (i) SEQ ID NO. 158, para Virus de la Rubeola;
- (ii) SEQ ID NO. 159, para virus de la encefalitis equina oriental;
- (iii) SEQ ID NO. 160, para virus de la encefalitis equina occidental; y
- (iv) SEQ ID NO. 161, para virus de la encefalitis equina Venezolana.

50 Se identifican secuencias de dirección ejemplares para cada uno de estos virus por los siguientes números de ID de secuencia, o partes de estas secuencias que solapan con una o más regiones de la estructura secundaria bicatenaria en la secuencia diana asociada:

- (i) SEQ ID NO. 162 y 163, para virus de la rubeola;
- (ii) SEQ ID NO. 164 y 165, para virus de la encefalitis equina oriental;
- 55 (iii) SEQ ID NO. 166 y 167, para virus de la encefalitis equina occidental; y
- (iv) SEQ ID NO. 168 y 169, para virus de la encefalitis equina venezolana

Para el tratamiento de un *Coronavirus* o *Arterivirus*, la secuencia de dirección es complementaria de una región asociada con una estructura secundaria de tallo-bucle dentro de una de las siguientes secuencias:

- 60 (i) SEQ ID NO. 170, para coronavirus de SARS TOR2;
- (ii) SEQ ID NO. 171, para virus de la diarrea epidérmica porcina;
- (iii) SEQ ID NO. 172, para virus de la gastroenteritis transmisible;
- (iv) SEQ ID NO. 173, para coronavirus bovino;
- 65 (v) SEQ ID NO. 174, para coronavirus humano 229E;
- (vi) SEQ ID NO. 175, para virus de la hepatitis murina; y

(vii) SEQ ID NO. 176, para virus de síndrome reproductor y respiratorio porcino.

Se identifican las secuencias de dirección ejemplares para cada uno de estos virus por los siguientes números de ID de secuencia, o partes de las secuencias que solapan con una o más regiones de la estructura secundaria bicatenaria en la secuencia diana asociada:

- (i) SEQ ID NO. 177 y 178, para coronavirus de SARS TOR2;
- (ii) SEQ ID NO. 179 y 180, para virus de la diarrea epidérmica porcina;
- (iii) SEQ ID NO. 181 y 182, para virus de la gastroenteritis transmisible;
- (iv) SEQ ID NO. 183 y 184, para coronavirus bovino;
- (v) SEQ ID NO. 185 y 186, para coronavirus humano 229E;
- (vi) SEQ ID NO. 187 y 188, para virus de la hepatitis murina; y
- (vii) SEQ ID NO. 189 y 190, para virus de síndrome reproductor y respiratorio porcino.

Para tratamiento de un *Mamastrovirus*, astrovirus humano, la secuencia de dirección es complementaria de una región asociada con una estructura secundaria de tallo-bucle dentro de la secuencia identificada como SEQ ID NO: 191. Son secuencias de dirección ejemplares SEQ ID NO. 193 y 194, o partes de estas secuencias que solapan con una o más regiones de estructura secundaria bicatenaria en la secuencia diana asociada.

Para el tratamiento de un virus de la arteritis Equina, la secuencia de dirección es complementaria de una región asociada con una estructura secundaria de tallo-bucle dentro de la secuencia identificada como SEQ ID NO: 192. Son secuencias de dirección ejemplares SEQ ID NO. 195, 196, o partes de estas secuencias que solapan con una o más regiones de la estructura secundaria bicatenaria en la secuencia diana asociada.

En un método para inhibir selectivamente la replicación del VIH-1 en células hematopoyéticas humanas infectadas por VIH, activadas, por ejemplo, macrófagos o células linfocíticas T, dichas células infectadas por VIH-1, activadas, se exponen a un oligómero antisentido como se describe en el presente documento, que tiene al menos un enlace intersubunitario catiónico como se describe en el presente documento, y preferentemente que contienen de 20 % a 50 % de dichos enlaces catiónicos, y que tiene una secuencia de bases que es sustancialmente complementaria de una secuencia diana vírica compuesta de al menos 12 bases contiguas en una región de ARN de cadena positiva del VIH-1 identificada por una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 197-199, preferentemente.

En una realización, el oligómero es capaz de hibridar con una región de SEQ ID NO: 197, para inhibir la síntesis de la proteína Vif del VIH en las células infectadas. El compuesto en esta realización puede tener al menos 12 bases contiguas de una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 200-203.

En otra realización, el oligómero es capaz de hibridar con una región de SEQ ID NO: 18, para inhibir la transcripción de transcritos de ARNm del VIH. El compuesto en esta realización puede tener al menos 12 bases contiguas de las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 204 y 205.

En otra realización, el oligómero es capaz de hibridar con una región de SEQ ID NO: 19, para inhibir la transcripción inversa de ARN vírico bloqueando la etapa de transferencia de cadena menos. El compuesto en esta realización puede tener al menos 12 bases contiguas de la secuencia identificada como SEQ ID NO: 206.

En otra realización, el oligómero puede usarse en un método para inhibir la replicación de un nidovirus en células humanas, exponiendo las células a un oligómero como se describe en el presente documento, que contienen al menos un enlace intersubunitario catiónico, y que contienen preferentemente del 20 % al 50 % de dichos enlaces catiónicos, en una cantidad suficiente para inhibir la replicación del nidovirus en las células infectadas por virus. El oligómero tiene una secuencia que es complementaria de al menos 8 bases contenidas en una secuencia en una secuencia líder 5' del ARN genómico de cadena positiva del nidovirus del grupo SEQ ID NO: 207-209, cada secuencia de las cuales incluye una secuencia reguladora de la transcripción líder interna; y

El oligómero es capaz de formar con el ARN genómico de cadena positiva de nidovirus una estructura de heterodúplex caracterizada por (1) una Tm de disociación de al menos 45 °C, y (2) una formación de pares de bases alterada entre las secuencias reguladoras de la transcripción en la región líder 5' del genoma vírico de cadena positiva y la región subgenómica 3' de cadena-negativa.

La secuencia del compuesto puede ser complementaria de al menos una parte de la secuencia reguladora de la transcripción contenida dentro de una de las secuencias SEQ ID NO: 207-209. Las secuencias de compuesto ejemplares en esta realización incluyen SEQ ID NO: 210-214.

Para uso en la inhibición de la replicación del virus de SARS, el compuesto puede contener una de las secuencias SEQ ID NO: 213 y 214. Para su uso en la inhibición de la replicación de coronavirus humano-229E o corona virus-humano-OC43, el compuesto puede contener una de las secuencias SEQ ID NO: 210 o 211, para el coronavirus-229E, y la secuencia SEQ ID NO: 212, para el coronavirus-OC43.

Para uso en el tratamiento de una infección por nidovirus en el sujeto humano, el compuesto puede administrarse por vía oral al sujeto, o por suministro pulmonar, para poner en contacto el compuesto con las células infectadas por virus.

5 En otra realización, el oligómero puede usarse en un método para inducir células dendríticas humanas a una condición de capacidad reducida para activación específica de antígenos de células T, y, en células dendríticas maduras, aumento de la producción de IL-10 extracelular. El método incluye exponer una población de células dendríticas humanas a un oligómero como se describe en el presente documento, que contiene al menos un enlace intersubunitario catiónico, y preferentemente que contiene de 20 % a 50 % de dichos enlaces catiónicos, y que
10 contiene una secuencia de bases eficaz para hibridar con una región sensible a la expresión de un transcrito de CD-86 humano preprocesado o procesado identificado, en su forma procesada, por SEQ ID NO: 215, para formar, entre el compuesto y el transcrito, una estructura de heterodúplex que tiene una T_m de al menos 45 °C. La formación de heterodúplex bloquea la expresión de CD86 de longitud completa en las células, que a su vez produce inhibición de la expresión de CD86 de longitud completa en la superficie de células dendríticas, y produce expresión potenciada
15 de IL-10 extracelular por células dendríticas maduras.

Cuando el oligómero antisentido es eficaz para hibridar con una región diana sensible a la expresión adyacente al sitio de inicio del transcrito de CD86 humano procesado, el oligómero puede tener una secuencia de bases que es complementaria de una región diana que contiene al menos 12 bases contiguas en un transcrito CD86 humano procesado identificado por SEQ ID NO: 216, donde el compuesto es eficaz para bloquear la traducción del transcrito procesado. El compuesto antisentido puede tener, por ejemplo, una de las secuencias de bases identificadas por
20 SEQ ID NO: 48-50.

Cuando el oligómero antisentido es eficaz para hibridar con un sitio de corte y empalme de CD86 humano preprocesado, el compuesto puede tener una secuencia de bases que es complementaria de al menos 12 bases contiguas de un sitio de corte y empalme en un transcrito CD86 humano preprocesado, en el que el compuesto es eficaz para bloquear el procesamiento de un transcrito CD86 preprocesado para producir un transcrito CD86 procesado, de longitud completa. El sitio de corte y empalme en el transcrito CD86 preprocesado puede tener una de las secuencias identificadas por SEQ ID NO: 217-220. El compuesto antisentido puede tener, por ejemplo, una de
25 las secuencias de bases identificadas por SEQ ID NO: 51-54.

Para el uso en inhibición del rechazo de trasplantes en un sujeto humano que recibe un tejido u órgano de aloinjerto, el oligómero se administra al sujeto en una cantidad eficaz para inhibir la tasa y el grado de rechazo del trasplante. El compuesto puede administrarse tanto antes como después del trasplante del tejido u órgano de aloinjerto en el
35 sujeto, y puede llevarse a cabo la administración del compuesto durante un periodo seleccionado de 1-3 semanas. El compuesto puede administrarse adicionalmente al sujeto, según sea necesario, para controlar el alcance de rechazo de trasplante en el sujeto.

Para el uso en el tratamiento de una afección autoinmunitaria en un sujeto humano, el oligómero puede administrarse al sujeto, en una cantidad eficaz para reducir la gravedad de la afección autoinmunitaria. El compuesto puede administrarse durante un periodo de tiempo prolongado, según sea necesario, para controlar la gravedad de la afección autoinmunitaria en el sujeto.
40

En otra realización, el oligómero puede usarse en un método para inhibir la replicación dentro de una célula hospedadora de un virus de ARN que tiene un genoma con sentido negativo, monocatenario, y seleccionado de la familia Orthomyxoviridae que incluye los géneros *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* e *Influenzavirus C*. La célula hospedadora se pone en contacto con un oligómero como se describe en el presente documento, que contiene al menos un enlace intersubunitario catiónico, y que contiene preferentemente del 20 % al 50 %, de dichos enlaces catiónicos y que contienen una secuencia de bases eficaz para hibridar con una región diana seleccionada de las siguientes: i) las 25 bases 5' o 3' terminales de un segmento de ARN vírico con sentido negativo de *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* e *Influenzavirus C*, ii) las 30 bases terminales del extremo 3' terminal de un ARNc con sentido positivo de *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* y *Influenzavirus C*, y iii) las 50 bases que rodean el codón de inicio AUG de un ARNm vírico de la gripe.
45
50

55 El oligómero puede administrarse a un sujeto mamífero infectado con el virus de la gripe, o en riesgo de infección con el virus de la gripe.

Para el tratamiento de virus de la gripe A, la secuencia de dirección hibrida con una región asociada con uno de los grupos de secuencias identificados como SEQ ID NO: 221 y 222. Son secuencias de dirección preferidas las complementarias de la diana de cadena menos de SEQ ID NO: 222 o la diana de cadena positiva de SEQ ID NO: 221. Los oligómeros antisentido ejemplares que se dirigen a estas dos regiones se enumeran como SEQ ID NO: 223 y 224, respectivamente.
60

En otra realización, uno o más oligómeros como se describen en el presente documento pueden usarse en un método para inhibir la replicación dentro de una célula hospedadora de un virus del Ébola o virus de Marburg, poniendo en contacto la célula con un oligómero como se describe en el presente documento, que contiene al
65

menos un enlace intersubunitario catiónico, y que contiene preferentemente del 20 % al 50 % de dichos enlaces catiónicos, y que tiene una secuencia de bases de dirección que es complementaria de una secuencia diana compuesta de al menos 12 bases contiguas dentro de una región de sitio de inicio AUG de un ARNm de cadena positiva identificado por una de las secuencias de las secuencias de ARNm de Filovirus seleccionadas del grupo que consiste en SEQ NO: 250-255.

Para el tratamiento de una infección por virus del Ébola, el compuesto puede tener una secuencia de dirección que es complementaria de una secuencia diana compuesta de al menos 12 bases contiguas dentro de la región de sitio de inicio AUG de VP35 identificada por una secuencia diana seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 250. Se identifica una secuencia de dirección ejemplar por SEQ ID NO: 1.

En otra realización para tratar una infección por virus del Ébola, el compuesto puede tener una secuencia de dirección que es complementaria de una secuencia diana compuesta de al menos 12 bases contiguas dentro de las regiones del sitio de inicio AUG de VP24 o AUG de L identificadas por una secuencia diana seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 251 y 252, respectivamente. Las secuencias de dirección ejemplares incluyen SEQ ID NO: 5 y 11, respectivamente.

Para tratar una infección por virus de Marburg, el compuesto puede tener una secuencia de dirección que es complementaria de una secuencia diana compuesta de al menos 12 bases contiguas dentro de la región de sitio de inicio AUG de VP35 identificada por una secuencia diana identificada por SEQ ID NO: 253. Una secuencia de dirección ejemplar se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 256 y 257.

En otra realización para tratar una infección por virus de Marburg, el compuesto puede tener una secuencia de dirección que es complementaria de una secuencia diana compuesta de al menos 12 bases contiguas dentro de las regiones de sitio de inicio AUG de VP24 o AUG de L identificadas por una secuencia diana seleccionada del grupo identificado por SEQ ID NO: 254 y 255, respectivamente. Se identifican secuencias de dirección ejemplares por SEQ ID NO: 258-260.

Los oligómeros desvelados en el presente documento también pueden usarse en un método para tratar una infección por filovirus de Ébola o Marburg en un sujeto, administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligómero que tiene una secuencia de dirección como se ha descrito anteriormente; o en un método para vacunar a un sujeto mamífero contra el virus del Ébola, pretratando el sujeto con un oligómero como se describe en el presente documento y que tiene una secuencia de dirección como se ha descrito anteriormente y que expone el sujeto al virus del Ébola, preferentemente en una forma atenuada.

En otra realización, un oligómero como se describe en el presente documento puede usarse en un método para tratar la pérdida de masa muscular esquelética en un sujeto humano. Las etapas en el método implican

- (a) medir los niveles en sangre o tejido de miostatina en el sujeto,
- (b) administrar al sujeto una cantidad de inhibidor de la expresión de miostatina de un oligómero como se describe en el presente documento, que contiene al menos un enlace intersubunitario catiónico, y preferentemente que contienen 20 % a 50 % de dichos enlaces catiónicos, y que tiene una secuencia de bases eficaz para hibridar con una región sensible a expresión de transcrito de ARN de miostatina humana procesado o preprocesado, identificado, en su forma procesada, por SEQ ID NO: 225;
- (c) mediante esta administración, formar dentro de células musculares diana en el sujeto una estructura de heterodúplex con pares de bases compuesta de transcrito de ARN de miostatina humana y el compuesto antisentido y que tiene una Tm de disociación de al menos 45 °C, inhibiendo de este modo la expresión de miostatina en dichas células;
- (d) en un tiempo seleccionado después de la administración del compuesto antisentido, medir un nivel en sangre o tejido de miostatina en el sujeto; y
- (e) repetir la administración, usando los niveles de miostatina medidos en (d) para ajustar la dosis o el programa de dosificación de la cantidad de compuesto antisentido administrada, si es necesario, para reducir los niveles medidos de miostatina sobre los medidos inicialmente y mantener dichos niveles de miostatina medidos en la etapa (d) dentro de un intervalo determinado para individuos sanos, normales.

Cuando el oligómero antisentido es eficaz para hibridar con un sitio de corte y empalme de transcrito de miostatina humana preprocesado, tiene una secuencia de bases que es complementaria de al menos 12 bases contiguas de un sitio de corte y empalme en un transcrito de miostatina humana preprocesado, y la formación del heterodúplex en la etapa (c) es eficaz para bloquear el procesamiento de un transcrito de miostatina preprocesado para producir un transcrito de miostatina preprocesado de longitud completa. El sitio de corte y empalme en el transcrito de miostatina preprocesado puede tener una de las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 226-229. Son secuencias antisentido ejemplares las identificadas por SEQ ID NO: 230-233.

En otra realización, un oligómero como se describe en el presente documento puede usarse en un método para inhibir la infección vírica en células de mamífero por un *Enterovirus* o *Rhinovirus* en la familia Picornaviridae. El método comprende exponer las células a un oligómero antisentido como se describe en el presente documento, que

contienen al menos un enlace intersubunitario catiónico, y preferentemente que contiene de 20 % a 50 % de dichos enlaces catiónicos, y que tiene una secuencia de dirección de al menos 12 subunidades complementarias de SEQ ID NO: 55 o SEQ ID NO: 56 en la cadena con sentido positivo del virus, para formar de este modo una estructura de heterodúplex compuesta por la cadena con sentido positiva del virus y el oligómero, caracterizado por una Tm de disociación de al menos 45 °C.

El oligómero puede tener una secuencia contenida en SEQ ID NO: 234, tal como una de las secuencias identificadas por SEQ ID NO: 235-237. Como alternativa, el oligómero puede tener una secuencia contenida en SEQ ID NO: 238, tal como una de las secuencias identificadas por SEQ ID NO: 239-245.

Para su uso en el tratamiento de un sujeto mamífero infectado por un *Enterovirus* o *Rhinovirus* en la familia de Picornaviridae, el oligómero se administra al sujeto en una cantidad farmacéuticamente eficaz. La administración del compuesto puede continuarse hasta que se observe una reducción significativa en la infección vírica o los síntomas de la misma. Para su uso en el tratamiento de un sujeto mamífero en riesgo de infección por un *Enterovirus* o *Rhinovirus* en la familia Picornaviridae, el oligómero se administra al sujeto en una cantidad eficaz para inhibir la infección de células hospedadoras del sujeto por el virus.

En otra realización, un oligómero como se describe en el presente documento puede usarse en un método para suprimir una respuesta inmunitaria en un sujeto mamífero, por ejemplo para el tratamiento o la prevención de una afección autoinmunitaria o rechazo de trasplante, administrando al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un oligómero como se describe en el presente documento, que contienen al menos un enlace intersubunitario catiónico, y que contiene preferentemente del 20 % al 50 % de dichos enlaces catiónicos y que tiene una secuencia de dirección de al menos 12 subunidades que es complementaria de al menos 12 subunidades de una secuencia diana identificada por SEQ ID NO: 246, que abarca el punto de unión de corte y empalme entre el intrón 1 y el exón 2 del ARNm de antígeno-4 de células T (CTLA-4) preprocesado del sujeto. El compuesto es capaz de reaccionar con el ARNm de CTLA-4 preprocesado en células de mamífero para formar un heterodúplex (i) caracterizado por una Tm de disociación de al menos 45 °C, y (ii) eficaz para aumentar la relación de ARNm procesado que codifica CTLA-4 independiente del ligando con respecto a ARNm procesado que codifica CTLA-4 de longitud completa en las células.

Para la prevención del rechazo de trasplantes en un sujeto humano que se ha programado que reciba un trasplante de órgano alogénico, la administración del compuesto puede iniciarse al menos una semana antes del trasplante programado. Para el tratamiento de una afección autoinmunitaria, la administración del compuesto puede continuarse hasta que se observe una mejora deseada en la afección autoinmunitaria.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1A ilustra una estructura de enlace sin carga ejemplar, y las Figs. 1B y 1C ilustran estructuras de enlace catiónico ejemplares de la invención, donde cada B es de forma independiente un resto de formación de pares de bases.

La Figura 1D ilustra un oligómero morfolino que contiene enlaces intersubunitarios catiónicos ejemplares y conjugado en un extremo con un resto de transporte de péptido rico en arginina. (Aunque se ilustran múltiples tipos de enlace catiónico en las Figs. 1C y 1D, un oligómero incluirá típicamente un tipo de enlace catiónico).

La Figura 2A muestra subunidades de morfolino representativas 1a-e con reconocimiento protegido, restos Pi de A, C, G, T, e I.

La Figura 2B muestra esquemas sintéticos para la preparación de las subunidades de la Fig. 2A a partir de los ribonucleósidos correspondientes.

La Figura 2C ilustra la preparación de subunidades protegidas, activadas, para la preparación de enlace de tipo (a) (sin carga) y enlace de tipos (b1) y (b2) (con carga) como se designa en el presente documento.

La Figura 2D es un esquema de una ruta sintética que puede usarse para preparar subunidades morfolino que contienen el enlace de (1-piperazino) fosfinilidenoxi ("Pip").

Las Figuras 2E y 2F ilustran la preparación de subunidades protegidas, activadas, para la preparación de enlaces de tipo (b3) (con carga) como se designa en el presente documento.

La Figura 2G ilustra la preparación de subunidades que pueden usarse para preparar enlaces análogos de tipo (b3) (con carga) pero basados en enlaces que no contiene fósforo, especialmente enlaces de sulfonamida.

La Figura 2H ilustra la preparación de un enlace de disulfuro, para su uso en la modificación de una resina de síntesis usada para la preparación por etapas de un oligómero morfolino, que permite la liberación sencilla del oligómero por tratamiento con tiol.

La Figura 2I ilustra la introducción de un resto que contiene trietilenglicol ("Cola") que aumenta la solubilidad acuosa de oligómeros antisentido sintéticos.

La Figura 2J ilustra la preparación de resinas útiles para la síntesis de fase sólida de oligómeros morfolino.

La Figura 2K ilustra la preparación de la subunidad G de morfolino N2, 06-protégida para síntesis de oligómeros a gran escala.

La Figura 2L ilustra la introducción de grupos de guanidinio por guanilación directa de aminas en los oligómeros morfolino.

La Figura 2M ilustra la introducción de grupos de guanidinio en oligómeros morfolino mediante la incorporación de aminoácidos y ácidos de guanidino.

La Figura 2N ilustra la introducción de grupos de guanidinio en oligómeros morfolino por la incorporación de ácidos de guanidino en posiciones tanto de cadena principal como terminales.

La Figura 2O ilustra la introducción de péptidos en los oligómeros morfolino de la cadena principal.

La Figura 2P ilustra la introducción de péptidos de transporte en el extremo 3' de oligómeros morfolino que tienen grupos con carga de enlace de tipo b1 en la cadena principal.

La Figura 2Q ilustra la introducción de péptidos de transporte en el extremo 3' de oligómeros morfolino que tienen enlaces GuX en la cadena principal.

La Figura 2R ilustra la alquilación reductora de aminas de oligómeros morfolino.

La Figura 3 muestra la actividad antisentido aumentada de +PMO con enlaces catiónicos que se dirigen al ARNm de VP24 de EBOV en comparación con PMO sin carga en un ensayo de traducción sin células. Los +PMO usados fueron VP24-8+ (SEQ ID NO: 10) y VP245'trm6+ (SEQ ID NO: 9) con 8 y 6 enlaces catiónicos, respectivamente, en comparación con sus homólogos de PMO sin carga (SEQ ID NO: 5 y 15, respectivamente).

La Figura 4 muestra la actividad antisentido aumentada de +PMO que se dirige al ARNm del gen L de EBOV en un ensayo de traducción sin células.

La Figura 5 muestra la especificidad del +PMO que se dirige al ARNm del gen L de EBOV cuando se usa en un ensayo de traducción sin células programado con ARNm de luciferasa:VP35 de EBOV. El gráfico demuestra que no hay actividad antisentido fuera de la diana hasta concentración de +PMO de 1 mM.

La Figura 6 es una representación de la eficacia del tratamiento, expresada como un porcentaje de los ratones supervivientes durante un periodo de 14 días después de la infección, para tres +PMO diferentes que se dirigen al gen de VP24 de EBOV (VP24-2+, VP24-4a+ y VP24-4b+; SEQ ID NO: 6-8, respectivamente) en comparación con el control de PMO sin carga (VP-24; SEQ ID NO: 5) y un control de tratamiento negativo de solución salina tamponada con fosfato (PBS).

La Figura 7 muestra la actividad antisentido aumentada de +PMO, con diferentes distribuciones de enlaces "Pip" catiónicos (P8-centralizado, P8-dispersado, P6-dispersado, P4-dispersado y P8-polarizado; en relación con PMO sin carga ("705"; SEQ ID NO: 286) en un ensayo de traducción de corrección de corte y empalme en cultivo celular, descrito en Materiales y Métodos.

La Figura 8 muestra la actividad antisentido aumentada de +PMO-GuX, con diferentes distribuciones de enlaces "GuX" catiónicos (G8-centralizado, G8-dispersado, G6-dispersado, G4-dispersado y G8-polarizado; SEQ ID NO: 48-52) en relación con PMO sin carga (SEQ ID NO: 286) en un ensayo de traducción de corrección de corte y empalme en cultivo celular, como se describe para la Fig. 8.

La Figura 9 compara actividades antisentido de +PMO con Pip-modificado "P8-centralizado" (véase Fig. 7) y +PMO-GuX con GuX-modificado "G8-centralizado" (véase Fig. 8) con homólogos de secuencia mezclados (SCR) y PMO sin carga en un ensayo de traducción de corrección de corte y empalme en cultivo celular, como se describe para la Fig. 8.

La Figura 10 muestra afinidades de unión (T_m) de oligómeros de +PMO y +PMO-GuX seleccionados de las Figs. 7 y 8 en comparación con PMO sin carga de la misma secuencia.

Las Figuras 11A-B muestran el aumento de la actividad de captación/antisentido de +PMO, +PMO-GuX y PMO sin carga conjugado con péptido ("PPMO") en relación con PMO sin carga no conjugado (SEQ ID NO: 286) en un ensayo de traducción de corrección de corte y empalme en cultivo celular, como se describe para la Fig. 7. La Figura 11A muestra efectos dependientes de la concentración hasta 10 μ M, y la Fig. 11B muestra efectos dependientes de la concentración hasta 100 μ M.

La Figura 12 es un gráfico de inhibición de +PMO de la traducción sin células del ARNm del gen de fusión de luciferasa:CYP3A2 en comparación con el PMO CYP3A2 sin carga (SEQ ID NO: 35-42). También se muestran valores de CE50 para los diversos +PMO y PMO.

Descripción detallada

I. Definiciones

Las expresiones a continuación, como se usa en el presente documento, tienen los siguientes significados, a no ser que se indique otra cosa:

Las expresiones "oligómero antisentido" o "compuesto antisentido" se usan indistintamente y se refieren a una secuencia de subunidades, que tienen cada una una base portada en una subunidad de cadena principal compuesta de ribosa y otro azúcar pentosa o grupo de morfolino, y donde los grupos de cadena principal se unen por enlaces intersubunitarios que permiten que las bases en el compuesto hibriden con una secuencia diana en un ácido nucleico (típicamente un ARN) por formación de pares de bases de Watson-Crick, para formar un heterodúplex de ácido nucleico:oligómero dentro de la secuencia diana. El oligómero puede tener complementariedad de secuencia exacta con la secuencia diana o casi complementariedad. Dichos oligómeros antisentido se diseñan para bloquear o inhibir la traducción del ARNm que contiene la secuencia diana, y puede decirse que están "dirigidos a" una secuencia con la que hibridan.

Un "oligómero morfolino" se refiere a una molécula polimérica que tiene una cadena principal que soporta bases capaces de formar enlaces de hidrógeno con polinucleótidos típicos, en la que el polímero carece de un resto de

cadena principal de azúcar pentosa, y más específicamente una cadena principal de ribosa unida por enlaces fosfodiéster que es típica de nucleótidos y nucleósidos, pero que en su lugar contiene un anillo de nitrógeno con acoplamiento a través del nitrógeno anular. Un oligómero "morfolino" preferido está compuesto por estructuras subunitarias de morfolino unidas entre sí por enlaces (tio)fosforamidato o (tio)fosforodiamidato, que unen el nitrógeno de morfolino de una subunidad con el carbono exocíclico 5' de una subunidad adyacente, incluyendo cada subunidad un resto de formación de pares de bases de purina o pirimidina eficaz para unir, por enlaces de hidrógeno específicos de bases, con una base en un polinucleótido. Se detallan oligómeros morfolino (incluyendo oligómeros antisentido), por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos del mismo propietario que la presente N.º 5.698.685, 5.217.866, 5.142.047, 5.034.506, 5.166.315, 5.185.444, 5.521.063 y 5.506.337.

Un grupo de "fosforamidato" comprende fósforo que tiene tres átomos de oxígeno unidos y un átomo de nitrógeno unido, mientras que un grupo de "fosforodiamidato" (véase por ejemplo Figs. 1A-B) comprende fósforo que tiene dos átomos de oxígeno unidos y dos átomos de nitrógeno unidos. En los enlaces intersubunitarios sin carga o catiónicos de los oligómeros descritos en el presente documento, un nitrógeno siempre está colgante de la cadena principal. El segundo nitrógeno, en un enlace de fosforodiamidato, es típicamente el nitrógeno anular en una estructura anular de un morfolino (de nuevo, véase Figs. 1A-B).

En un enlace tiofosforamidato o tiofosforodiamidato, un átomo de oxígeno, típicamente el oxígeno colgante de la cadena principal en los oligómeros descritos en el presente documento, se reemplaza con azufre.

Las expresiones "con carga", "sin carga", "catiónico" y "aniónico" como se usan en el presente documento se refiere al estado predominante de un resto químico a pH casi neutro, por ejemplo aproximadamente 6 a 8. Preferentemente, la expresión se refiere al estado predominante del resto químico a pH fisiológico, es decir, aproximadamente 7,4.

"Alquilo inferior" se refiere a un radical de alquilo de uno a seis átomos de carbono, como se ejemplifica por metilo, etilo, *n*-butilo, *i*-butilo, *t*-butilo, isoamilo, *n*-pentilo e isopentilo. En realizaciones seleccionadas, un grupo de "alquilo inferior" tiene de uno a cuatro átomos de carbono o 1-2 átomos de carbono; es decir metilo o etilo. De forma análoga, "alqueno inferior" se refiere a un radical de alqueno de dos a seis, preferentemente tres o cuatro, átomos de carbono, como se ejemplifica por alilo y butenilo.

Un sustituyente "no interferente" es uno que no afecta de forma adversa a la capacidad de un oligómero antisentido como se describe en el presente documento a unirse con su diana pretendida. Dichos sustituyentes incluyen grupos pequeños y preferentemente no polares tales como metilo, etilo, metoxi, etoxi, hidroxilo o fluoro.

Un oligonucleótido u oligómero antisentido "hibrida específicamente" con un polinucleótido diana si el oligómero hibrida con la diana en condiciones fisiológicas, con una T_m mayor de 37 °C. La " T_m " de un oligómero es la temperatura a la que el 50 % hibrida con un polinucleótido complementario. La T_m se determina en condiciones convencionales en solución salina fisiológica, como se describe, por ejemplo, en Miyada *et al.*, *Methods Enzymol.* 154: 94-107 (1987).

Los polinucleótidos se describen como "complementarios" entre sí cuando se produce hibridación en una configuración antiparalela entre dos polinucleótidos monocatenarios. La complementariedad (el grado en que un polinucleótido es complementario de otro) es cuantificable con respecto a la proporción de bases en cadenas opuestas que se espera que formen enlaces de hidrógeno entre sí, de acuerdo con normas de formación de pares de bases generalmente aceptadas.

Una primera secuencia es una "secuencia antisentido" con respecto a una segunda secuencia si un polinucleótido cuya secuencia es la primera secuencia se une específicamente, o hibrida específicamente, con la segunda secuencia polinucleotídica en condiciones fisiológicas.

La expresión "secuencia de dirección" es la secuencia en el análogo de oligonucleótido que es complementaria (lo que significa, además, sustancialmente complementaria) de la secuencia diana en el genoma de ARN. La secuencia completa, o solamente una parte, del compuesto análogo puede ser complementaria de la secuencia diana. Por ejemplo, en un análogo que tiene 20 bases, solamente 12-14 pueden ser secuencias de dirección. Típicamente, la secuencia de dirección está formada por bases contiguas en el análogo, pero puede como alternativa estar formada de secuencias no contiguas que cuando se colocan juntas, por ejemplo, de extremos opuestos del análogo, constituyen una secuencia que abarca la secuencia diana.

Las secuencias diana y de dirección se describen como "complementarias" entre sí cuando se produce hibridación en una configuración antiparalela. Una secuencia de dirección puede tener complementariedad "cercana" o "sustancial" con la secuencia diana y aún actuar para el fin de los métodos descritos por la presente, es decir, aún ser "complementaria". Preferentemente, los compuestos análogos de oligonucleótidos empleados en los métodos descritos por la presente tienen como máximo un desapareamiento con la secuencia diana de 10 nucleótidos, y preferentemente como máximo un desapareamiento de 20. Como alternativa, los oligómeros antisentido empleados tienen al menos 90 % de homología de secuencia, y preferentemente al menos 95 % de homología de secuencia, con las secuencias de dirección ejemplares designadas en el presente documento. Para fines de unión

complementaria con una diana de ARN, y como se analiza posteriormente, una base de guanina puede ser complementaria de una base de ARN de citosina o uracilo.

Un análogo de oligonucleótido “hibrida específicamente” con un polinucleótido diana si el oligómero hibrida con la diana en condiciones fisiológicas, con una T_m sustancialmente mayor de 45 °C, preferentemente al menos 50 °C, y típicamente 60 °C-80 °C o mayor. Dicha hibridación corresponde preferentemente a condiciones de hibridación rigurosas. A una fuerza iónica y un pH dados, la T_m es la temperatura a la que el 50 % de una secuencia diana hibrida con un polinucleótido complementario. De huevo, dicha hibridación puede producirse con complementariedad “cercana” o “sustancial” del oligómero antisentido con la secuencia diana, así como con complementariedad exacta.

Un “heterodúplex” se refiere a una doble cadena entre un análogo de oligonucleótido y la parte complementaria de un ARN diana. Un “heterodúplex resistente a nucleasa” se refiere a un heterodúplex formado por la unión de un oligómero antisentido con su diana complementaria, de modo que el heterodúplex sea sustancialmente resistente a la degradación *in vivo* por nucleasas intracelulares y extracelulares, tales como RNasa H, que son capaces de cortar complejos bicatenarios de ARN/ARN o ARN/ADN.

Un agente es “captado de forma activa por células de mamífero” cuando el agente puede entrar en la célula por un mecanismo distinto de difusión pasiva a través de la membrana celular. El agente puede transportarse, por ejemplo, por “transporte activo”, en referencia a transporte de agentes a través de una membrana celular de mamífero mediante por ejemplo un mecanismo de transporte dependiente de ATP, o mediante “transporte facilitado”, en referencia a transporte de agentes antisentido a través de la membrana celular por un mecanismo de transporte que requiere la unión del agente con una proteína de transporte, que después facilita el pase del agente unido a través de la membrana.

Las expresiones “modulación de la expresión” y/o “actividad antisentido” se refieren a la capacidad de un oligómero antisentido para potenciar o, más típicamente, reducir la expresión de una proteína dada, mediante interferencia con la expresión o traducción de ARN. En el caso de expresión de proteínas reducida, el oligómero antisentido puede bloquear directamente la expresión de un gen dado, o contribuir a la degradación acelerada del ARN transcrito a partir de ese gen. Se cree que los oligómeros morfolino como se describen en el presente documento actúan mediante el primer mecanismo (bloqueo estérico). Las dianas antisentido preferidas para oligómeros de bloqueo estérico incluyen la región de codón de inicio ATG, sitios de corte y empalme, regiones estrechamente adyacentes a sitios de corte y empalme y región no traducida 5' de ARNm, aunque otras regiones se han dirigido exitosamente usando oligómeros morfolino.

Una “subunidad de aminoácido” es preferentemente un resto de α -aminoácido (-CO-CHR-NH-); también puede ser un resto de aminoácido β u otro (por ejemplo -CO-CH₂CHR-NH-), donde R es una cadena lateral.

La expresión “aminoácido de origen natural” se refiere a un aminoácido presente en proteínas halladas en la naturaleza. La expresión “aminoácidos no naturales” se refiere a los aminoácidos no presentes en proteínas halladas en la naturaleza; los ejemplos incluyen beta-alanina (β -Ala) y ácido 6-aminohexanoico (Ahx).

Una “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de oligómero antisentido administrado a un sujeto mamífero, como una única dosis o como parte de una serie de dosis, que es eficaz para producir un efecto terapéutico deseado, típicamente inhibiendo la traducción de una secuencia de ácido nucleico diana seleccionada.

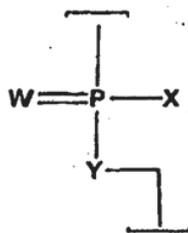
El “tratamiento” de un individuo (por ejemplo un mamífero, tal como un ser humano) o una célula es cualquier tipo de intervención usada en un intento de alterar la evolución natural del individuo o la célula. El tratamiento incluye, pero sin limitación, la administración de una composición farmacéutica, y puede realizarse bien de forma profiláctica o bien después del inicio de un acontecimiento patológico o en contacto con un agente etiológico.

II. Elementos estructurales de oligómeros objeto

A. Oligómeros con enlaces intersubunitarios catiónicos

La invención proporciona, en un aspecto, un oligómero que comprende una cadena principal que consiste en una secuencia de estructuras anulares de morfolino unidas por enlaces intersubunitarios, donde cada una de dichas estructuras anulares soporta un resto de formación de pares de base, de modo que dicho oligómero puede unirse de una manera específica de secuencia con un ácido nucleico diana, y donde al menos un enlace intersubunitario entre dos de dichas estructuras anulares consecutivas contiene un grupo catiónico colgante. El grupo colgante porta un átomo de nitrógeno distal que puede portar una carga positiva a pH neutro o casi neutro (por ejemplo fisiológico).

Los enlaces intersubunitarios son preferentemente enlaces que contienen fósforo, que tienen la estructura:



donde

- 5 W es S u O, y es preferentemente O,
 X = NR¹R² u OR⁶,
 Y = O o NR⁷, y cada uno de dichos enlaces en el oligómero se seleccionada de:

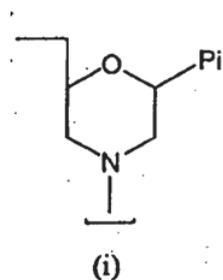
- 10 (a) enlace sin carga (a), donde cada uno de R¹, R², R⁶ y R⁷ se selecciona de forma independiente de hidrógeno y alquilo inferior;
 (b1) enlace catiónico (b1), donde = NR¹R² e Y = O y NR¹R² representa un grupo de piperazino opcionalmente sustituido, de modo que R¹R² = -CHRCHRN(R³)(R⁴)CHRCHR-, donde cada R es de forma independiente H o CH₃,
 R⁴ es H, CH₃ o un par de electrones, y
 15 R³ se selecciona de G, alquilo inferior, por ejemplo CH₃, C(=NH)NH₂, Z-L-NHC(=NH)NH₂ y [C(O)CHR'NH]_mH, donde:
 Z es C(O) o un enlace directo, L es un enlazador opcional de hasta 18 átomos de longitud, preferentemente hasta 12 átomos, y más preferentemente hasta 8 átomos de longitud, que tiene enlaces seleccionados de alquilo, alcoxi y alquilamino, R' es una cadena lateral de un aminoácido de origen natural o un homólogo de
 20 uno o dos carbonos del mismo y m es 1 a 6, preferentemente 1 a 4;
 (b2) enlace catiónico (b2), donde X = NR¹R² e Y = O, R¹ = H o CH₃ y R² = LNR³R⁴R⁵, donde L, R³ y R⁴ son como se ha definido anteriormente, y R⁵ es H, alquilo inferior o (alcoxi)alquilo inferior; y
 (b3) enlace catiónico (b3), donde Y = NR⁷ y X = OR⁶, y R⁷ = LNR³R⁴R⁵ donde L, R³, R⁴ y R⁵ son como se ha definido anteriormente y R⁶ es H o alquilo inferior;
 25 y al menos uno de dichos enlaces se selecciona de enlaces catiónicos (b1), (b2) y (b3).

Preferentemente, el oligómero incluye al menos dos enlaces consecutivos de tipo (a) (es decir, enlaces sin carga). En realizaciones adicionales, al menos el 5 % de los enlaces en el oligómero son enlaces catiónicos (es decir de tipo (b1), (b2) o (b3)); por ejemplo, 10 % a 80 %, 10 % a 50 % o 10 % a 35 % de los enlaces pueden ser enlaces catiónicos.

En una realización, al menos un enlace es de tipo (b1), donde, preferentemente, cada R es H, R⁴ es H, CH₃, o un par de electrones, y R³ se selecciona de H, alquilo inferior, por ejemplo CH₃, C(=NH)NH₂, y C(O)-L-NHC(=NH)NH₂. Las dos últimas realizaciones de R³ proporcionan un resto de guanidino, unido directamente con el anillo de piperazina o colgante de un grupo enlazador L, respectivamente. Para facilitar la síntesis, la variable Z en R³ es preferentemente C(O) (carbonil), como se muestra.

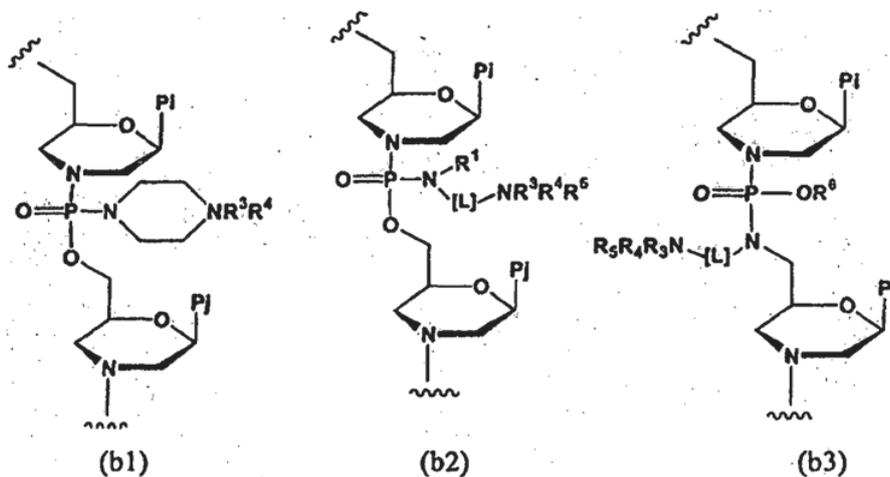
El grupo enlazador L, como se ha indicado anteriormente, contiene enlaces en su cadena principal seleccionados de alquilo (por ejemplo, -CH₂-CH₂-), alcoxi (-C-O-), y alquilamino (por ejemplo, -CH₂-NH-), a condición de que los átomos terminales en L (por ejemplo, los adyacentes a carbonilo o nitrógeno) sean átomos de carbono. Aunque son posibles enlaces ramificados (por ejemplo, -CH₂-CHCH₃-), el enlazador está preferentemente no ramificado. En una realización, el enlazador es un enlazador de hidrocarburo. Dicho enlazador puede tener la estructura -(CH₂)_n-, donde n es 1-12, preferentemente 2-8 y más preferentemente 2-6.

45 Las subunidades de morfolino tienen la estructura:



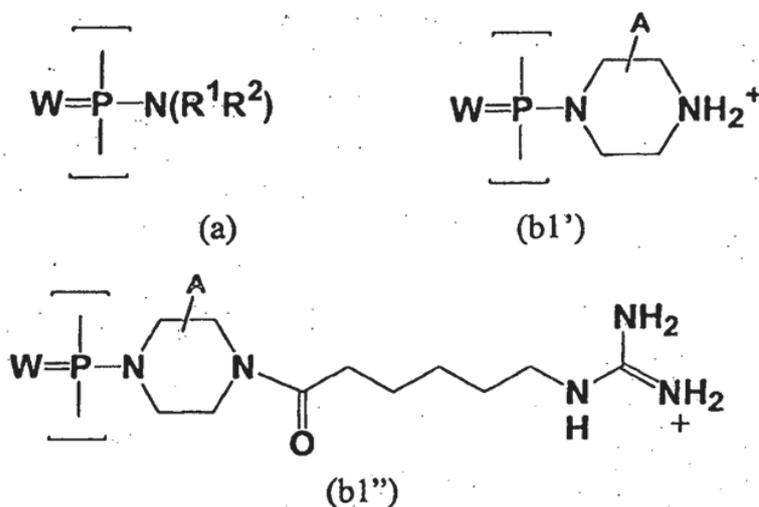
donde Pi es un resto formador de pares de bases, y los enlaces representados anteriormente conectan el átomo de nitrógeno de (i) con el carbono 5' de una subunidad adyacente. Los restos formadores de pares de bases Pi pueden ser iguales o diferentes y en general se diseñan para proporcionar una secuencia que se une con un ácido nucleico diana.

5 El uso de realizaciones de los tipos de enlace (b1), (b2) y (b3) anteriores para unir subunidades de morfolino puede ilustrarse gráficamente de la siguiente manera:



10 Preferentemente, todos los enlaces catiónicos en el oligómero son del mismo tipo; es decir todos de tipo (b1), todos de tipo (b2) o todos de tipo (b3).

15 En realizaciones adicionales, los enlaces catiónicos se seleccionan de enlaces (b1') y (b1'') como se muestra posteriormente, donde (b1'') se denomina en el presente documento un enlace "Pip" y (b1') se denomina en el presente documento enlace "GuX":



20 En las estructuras anteriores, W es S u O, y es preferentemente O; cada uno de R¹ y R² se selecciona de forma independiente de hidrógeno y alquilo inferior y es preferentemente metilo; y A representa hidrógeno o un sustituyente no interferente en uno o más átomos de carbono en (b1') y (b1''). Preferentemente, los carbonos anulares en el anillo de piperazina no están sustituidos; sin embargo, pueden incluir sustituyentes no interferentes, tales como metilo o flúor. Preferentemente, como máximo se sustituyen así uno o dos átomos de carbono.

25 En realizaciones adicionales, al menos 10 % de los enlaces son de tipo (b1') o (b1''); por ejemplo, 20 % a 80 %, 20 % a 50 % o 20 % a 30 % de los enlaces pueden ser del tipo (b1') o (b1'').

30 En otras realizaciones, el oligómero no contiene ningún enlace del tipo (b1') anterior. Como alternativa, el oligómero no contiene ningún enlace del tipo (b1) donde cada R es H, R³ es H o CH₃ y R⁴ es H, CH₃, o un par de electrones.

Las subunidades de morfolino también pueden estar unidas por enlaces intersubunitarios no basados en fósforo, como se describe adicionalmente más adelante, donde al menos un enlace está modificado con un grupo catiónico colgante como se ha descrito anteriormente.

5 Podrían usarse otros enlaces de análogos de oligonucleótidos que no tienen carga en su estado no modificado pero que también podrían portar un sustituyente de amina colgante. Por ejemplo, un átomo de nitrógeno 5' en un anillo de morfolino podría emplearse en un enlace de sulfamida (véase por ejemplo Fig. 2G) o un enlace de urea (donde el fósforo se reemplaza con carbono o azufre, respectivamente) y modificarse de una manera análoga al átomo de nitrógeno 5' en la estructura (b3) anterior.

10 Se proporcionan oligómeros que tienen cualquier variedad de enlaces catiónicos, incluyendo oligómeros con todos los enlaces catiónicos. Preferentemente, sin embargo, los oligómeros tienen carga parcial, teniendo, por ejemplo, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 por ciento de enlaces catiónicos. En realizaciones seleccionadas, aproximadamente 10 a 80, 20 a 80, 20 a 60, 20 a 50, 20 a 40 o aproximadamente 20 a 35 de los enlaces son catiónicos.

15 En una realización, los enlaces catiónicos se intercalan a lo largo de la cadena principal. Los oligómeros con carga parcial preferentemente contienen al menos dos enlaces sin carga consecutivos; es decir, el oligómero preferentemente no tiene un patrón estrictamente alternante a lo largo de su longitud completa.

20 También se consideran oligómeros que tienen bloques de enlaces catiónicos y bloques de enlaces sin carga; por ejemplo, un bloque central de enlaces sin carga puede estar flanqueado por bloques de enlaces catiónicos, o viceversa. En una realización, el oligómero tiene regiones 5', 3' y centrales de longitud aproximadamente igual, y el porcentaje de enlaces catiónicos en la región central es mayor de aproximadamente 50 %, preferentemente mayor de aproximadamente 70 %.

25 Los oligómeros para uso en aplicaciones antisentido generalmente varían en su longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 subunidades, más preferentemente de aproximadamente 15 a 25 subunidades. Por ejemplo, un oligómero de la invención que tiene 19-20 subunidades, una longitud útil para un oligómero antisentido, puede tener idealmente de dos a siete, por ejemplo de cuatro a seis, o de tres a cinco, enlaces catiónicos, y el resto de enlaces sin carga. Un oligómero que tiene 14-15 subunidades puede idealmente tener de dos a cinco, por ejemplo 3 o 4, enlaces catiónicos y el resto de enlaces sin carga.

30 Cada estructura anular de morfolino soporta un resto de formación de pares de bases, para formar una secuencia de restos de formación de pares de bases que se diseña típicamente para hibridar con una diana antisentido seleccionada en una célula o en un sujeto que se trata. El resto de formación de pares de bases puede ser una purina o pirimidina hallada en ADN o ARN nativo (A, G, C, T o U) o un análogo, tal como hipoxantina (el componente básico del nucleósido inosina) o 5-metil citosina.

35 Como se ha indicado anteriormente, el oligonucleótido sustancialmente sin carga puede modificarse, de acuerdo con un aspecto de la invención, para incluir uno o más enlaces con carga, por ejemplo hasta aproximadamente 1 por cada 2-5 enlaces sin carga, típicamente 3-5 por cada 10 enlaces sin carga. Se ha visto una mejora óptima en la actividad antisentido donde hasta aproximadamente la mitad de los enlaces de cadena principal son catiónicos. Se ve típicamente algo de potenciación, pero no potenciación máxima, con un número pequeño, por ejemplo, 10-20 % de enlaces catiónicos; donde el número de enlaces catiónicos supera el 50-60 %, la especificidad de secuencia de la unión antisentido con su diana puede estar comprometida o perderse.

40 Los experimentos adicionales realizados en apoyo de la presente invención indican que la potenciación vista con cargas de cadena principal catiónicas añadidas puede potenciarse adicionalmente, en algunos casos, distribuyendo el volumen de las cargas cerca de los enlaces de cadena principal de "región central" del oligonucleótido antisentido, por ejemplo, en un oligonucleótido de 20 unidades con 8 enlaces de cadena principal catiónicos, que tienen 70 %-100 % de estos enlaces con carga localizados en los 10 enlaces más centrales.

55 B. Transportadores de péptidos

El oligómero objeto también puede conjugarse con un resto de transporte de péptidos que es eficaz para potenciar el transporte del oligómero a células. El resto de transporte se une preferentemente con un extremo de los oligómeros, como se muestra, por ejemplo, en la Figura 1D, así como en las Figuras 2P-2Q.

60 Preferentemente, el resto de transporte comprende de 6 a 16 aminoácidos y está compuesto de subsecuencias seleccionadas del grupo representado por (X'Y'X'), (X'Y'), (X'Z') y (X'Z'Z'), donde

65 (a) cada subunidad X' representa de forma independiente lisina, arginina o un análogo de arginina, siendo dicho análogo un aminoácido α catiónico que comprende una cadena lateral de la estructura $R^1N=C(NH_2)R^2$, donde R^1 es H o R; R^2 es R, NH_2 , NHR o NR^2 , donde R es alquilo inferior o alqueno inferior y puede incluir además

oxígeno o nitrógeno; R^1 y R^2 pueden formar juntos un anillo; y la cadena lateral se une a dicho aminoácido mediante R^1 o R^2 ;

(b) cada subunidad Y' representa de forma independiente un aminoácido lineal neutro $-C(O)-(CHR)_n-NH-$, donde n es de 1 a 7 y cada R es de forma independiente H o metilo; y

5 (c) cada subunidad Z' representa de forma independiente un aminoácido α que tiene una cadena lateral de aralquilo neutra.

10 Como se usa en el presente documento, una proteína vehículo está "compuesta de las subsecuencias seleccionadas del grupo representado por $X'Y'X'$, $X'Y'$, $X'Z'Z'$ y $X'Z'$ " si sustancialmente todos sus aminoácidos pueden representarse por una serie no solapante de las subsecuencias, o variaciones posicionales de las mismas, por ejemplo, $(X'X'Y')_n$, $(X'Y'X')_n$, $(Y'X'X')_n$, $(Y'X')_n$, $(X'Y')(X'X'Y')(X'Y')(X'X'Y')$, $(X'Y')_n(X'X'Y')_m$, $(X'FF)_n$ o $(FFX')_n$. La proteína puede alojar un número pequeño, por ejemplo, 1-3, de aminoácidos neutros distintos de Y .

15 En realizaciones seleccionadas, el péptido comprende una secuencia que consiste en al menos dos, o al menos tres, repeticiones de una única subsecuencia seleccionada de $(X'Y'X')$, $(X'Y')$, $(X'Z')$ y $(X'Z'Z')$. Por ejemplo, el péptido puede comprender una secuencia representada por una de $(X'Y'X')_p$, $(X'Y')_m$ y $(X'Z'Z')_p$, donde p es de 2 a 5 y m es de 2 a 8.

20 En realizaciones seleccionadas, para cada X' , el resto de cadena lateral se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en guanidilo ($HN=C(NH_2)NH-$), amidinilo ($HN=C(NH_2)C<$), 2-aminodihidropirimidilo, 2-aminotetrahidropirimidilo, 2-aminopiridinilo y 2-aminopirimidonilo, y se selecciona preferentemente de guanidilo y amidinilo.

25 En realizaciones preferidas, para cada X' , el resto de cadena lateral es guanidilo, como en la subunidad de aminoácido arginina (Arg). En realizaciones adicionales, cada Y' es $-CO-(CH_2)_n-R-NH-$, donde n es de 1 a 7 y R es H. Por ejemplo, cuando n es 5 y R es H, Y' es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico, abreviada en el presente documento como Ahx; donde n es 2 y R es H, Y' es una subunidad de β -alanina.

30 La cadena lateral de aralquilo de la subunidad Z' es preferentemente bencilo ($-CH_2C_6H_6$) o fenetilo ($-CH_2CH_2C_6H_6$), que preferentemente no sustituyen adicionalmente pero pueden incluir un sustituyente no interferente como se define en el presente documento. Preferentemente, la cadena lateral es bencilo ($-CH_2C_6H_6$), de modo que cada Z' es fenilalanina (F).

35 Los péptidos preferidos de este tipo incluyen los que comprenden dímeros de arginina que alternan con subunidades Y' individuales, donde Y' es preferentemente Ahx. Los ejemplos incluyen péptidos que tienen la fórmula $(RY'R)_4$ o la fórmula $(RRY')_4$, donde Y' es preferentemente Ahx. En una realización, Y' es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico, R es arginina y p es 4. En una realización adicional, el péptido comprende una secuencia representada por $(X'Z'Z')_p$ donde R es arginina, cada Z' es fenilalanina y p es 3 o 4.

40 El péptido conjugado se une preferentemente con un extremo del oligómero mediante un enlazador Ahx-B, donde Ahx es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico y B es una subunidad de β -alanina, como se muestra, por ejemplo, en la Fig. 1D.

45 Las subunidades Y' son contiguas, porque ninguna subunidad X' está situada entre subunidades Y' , o intercaladas individualmente entre subunidades X' . Sin embargo, la subunidad de enlace puede estar entre subunidades Y' . En una realización, las subunidades Y' están en un extremo terminal del transportador; en otras realizaciones, están flanqueadas por subunidades X' .

50 En realizaciones adicionales preferidas, cada Y' es $-CO-(CH_2)_n-CHR-NH-$, donde n es 1 a 7 y R es H. Por ejemplo, cuando n es 5 y R es H, Y' es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico, abreviada en el presente documento como Ahx. En realizaciones seleccionadas de este grupo, cada X' comprende un resto de cadena lateral de guanidilo, como en una subunidad de arginina. Los péptidos preferidos de este tipo incluyen los que comprenden dímeros de arginina que alternan con subunidades de Y' individuales, donde Y' es preferentemente Ahx. Los ejemplos incluyen péptidos que tienen la fórmula $(RY'R)_4$ o la fórmula $(RRY')_4$, donde Y' es preferentemente Ahx.

55 Otra realización preferida incluye subunidades de arginina que alternan con subunidades Y' individuales $((RY')_m)$, donde Y' se selecciona de β -alanina y Ahx; se proporciona un ejemplo como SEQ ID NO: 285 posteriormente.

60 El análogo de ácido nucleico se une preferentemente con el péptido transportador en el extremo C terminal, como se muestra, por ejemplo, en la Fig. 1D. Un enlazador preferido es de la estructura AhxB, donde Ahx es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico y B es una subunidad de β -alanina.

65 Se ha mostrado que los restos de transporte como se han descrito anteriormente potencian en gran medida la entrada celular de oligómeros unidos, en relación con la captación del oligómero en ausencia del resto de transporte unido, y en relación con la captación por un resto de transporte unido que carece de las subunidades hidrófobas Y' . dicha captación potenciada se demuestra preferentemente por un aumento al menos doble, y preferentemente un

aumento cuádruple, en la captación del compuesto de células de mamífero en relación con la captación del agente por un resto de transporte unido que carece de las subunidades hidrófobas Y'. La captación está potenciada preferentemente al menos veinte veces, y más preferentemente cuarenta veces, en relación con el compuesto no conjugado.

5 Un beneficio adicional del resto de transporte es su capacidad esperada de estabilizar una doble cadena entre un oligómero antisentido y su secuencia de ácido nucleico diana, supuestamente según la interacción electrostática entre el resto de transporte con carga positiva y el ácido nucleico con carga negativa. El número de subunidades con carga en el transportador es menor de 14, como se ha indicado anteriormente, y preferentemente entre 8 y 11, ya
10 que un número demasiado alto de subunidades con carga puede conducir a una reducción en la especificidad de secuencia

Se proporcionan a continuación transportes peptídicos ejemplares, incluyendo los enlazadores (B o AhxB):

Péptido	Secuencia (N terminal a C terminal)	SEQ ID NO:
(RAhxR) ₄ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	278
(RAhxR) ₄ AhxB	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	279
(AhxRR) ₄ AhxB	AhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	280
(RAhx) ₆ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	281
(RAhx) ₈ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	282
(RAhxR) ₃ AhxB	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	283
(RAhxRRBR) ₂ AhxB	RAhxRRBRRAhxRRBRRAhxB	284
((RB)3RAhx)2B	RBRBRBRAhxRBRBRBRAhxB	285

15 III. Actividad antisentido de oligómeros objeto

Como se muestra en el presente documento, los oligómeros parcialmente catiónicos, tales como +PMO, tienen mayor afinidad por ADN y ARN que los compuestos neutros correspondientes, demostrada por actividad antisentido
20 potenciada *in vitro* e *in vivo*.

A. Actividad *in vitro* en ensayos sin células

Se ha mostrado que los oligómeros de la invención proporcionan actividad antisentido superior con respecto a oligómeros completamente sin carga cuando se dirigen a una diversidad de diferentes dianas. En una primera serie
25 de experimentos, se prepararon diversos PMO (sin carga) y +PMO (parcialmente catiónicos) que se dirigían a diferentes regiones de ARNm del EBOV (virus del Ébola), incluyendo el ARNm del gen de L y VP35 y dos regiones diferentes del ARNm de VP24, como se describe en Materiales y Métodos. Las secuencias se muestran como SEQ ID NO: 1-15 en la Tabla del Listado de Secuencias posterior, con el enlace (1-piperazino) fosfinilidenoxi catiónico
30 (como se muestra en la Fig. 1B) en cada posición indicado con un "+" en la Tabla del Listado de Secuencias.

Se realizaron ensayos de traducción sin células usando el ARNm de luciferasa:EBOV apropiado, preparado como se describe en Materiales y Métodos, como el ARN de entrada. Se evaluaron los PMO y +PMO con respecto a su capacidad para inhibir la expresión de luciferasa, basándose en emisión de luz de luciferasa (n=3 por concentración
35 de PMO).

Los resultados para los oligómeros que se dirigen a ARNm de luciferasa:VP24 (SEQ ID NO: 9 y 10) se muestran en la Fig. 3. En comparación con los PMO sin carga con la misma secuencia de bases (SEQ ID NO: 15 y 5,
40 respectivamente), los +PMO con de 6 a 8 enlaces catiónicos demostraron actividad antisentido aumentada de 10 a 100 veces.

Se muestran resultados para ensayos similares que emplean PMO y +PMO que se dirigen a los ARNm de gen de VP33, VP24 y L de EBOV (SEQ ID NO: 2-3, 6-8 y 12-14, respectivamente, que tienen una carga total variable y densidad de carga como se indica en la tabla del Listado de Secuencia) en la Fig. 4. La Tabla 1 a continuación
45 enumera los valores de CE₅₀ determinados. En todos los casos, la incorporación de 2 a 4 enlaces catiónicos en la cadena principal de estos oligómeros aumentó la actividad antisentido aproximadamente 2-30 veces.

Tabla 1

Inhibición específica de traducción sin células usando +PMO dirigido a ARNm de EBOV			
Nombre	SEQ ID NO	Carga +	CE ₅₀ (nM)
VP35-AUG	1	0	84,8
VP35-2+	2	2	23,0
VP35-4a+	3	4	18,7
VP35-4b+	4	4	18,4
VP24-AUG	5	0	223,2
VP24-2+	6	2	109,4

Inhibición específica de traducción sin células usando +PMO dirigido a ARNm de EBOV			
Nombre	SEQ ID NO	Carga +	CE ₅₀ (nM)
VP24-4a+	7	4	47,6
VP24-4b+	8	4	62,5
L-AUG	11	0	203,6
L-2+	12	2	76,6
L-4a+	13	4	21,7
L-4b+	14	4	7,1

- Una serie adicional de ensayos empleó PMO y +PMO que se dirigían a la región de codón de inicio del gen de CYP3A2 de rata (SEQ ID NO: 35-42) para inhibir la traducción de un transcrito de ARNm de gen de fusión de CYP3A2:luciferasa. El número de cargas de enlaces catiónicos en la serie de +PMO CYP3A2 de +3 a +6. Los cinco +PMO con tres cargas catiónicas variaron en la localización dentro del oligómero de los enlaces catiónicos. Se muestran resultados de los ensayos de traducción sin células en la Fig. 12, con los valores de CE₅₀ determinados. Puede verse que la serie de +PMO completa demostró actividad antisentido potenciada, con la reducción de hasta 11 veces en la CE₅₀ en comparación con el control de PMO sin carga (SEQ ID NO: 35).
- En un experimento adicional, se comparó una serie de +PMO que se dirigían a la región de codón de inicio del virus de la hepatitis C (VHC; SEQ ID NO: 19-35) con el PMO sin carga correspondiente (designado AVI-4065) en su capacidad para inhibir la traducción de un transcrito de gen de fusión de luciferasa:VHC. Como se muestra en la Tabla de Secuencia posterior, el número de enlaces catiónicos en la serie de +PMO de VHC varió de +2 a +7. Se realizaron ensayos de traducción sin células usando el ARNm de luciferasa:VHC como el ARN de entrada, y se proporcionan los valores de CE₅₀ observados en la Tabla 2 a continuación. En todos los casos, en relación con el PMO AVI-4065 sin carga, la adición de enlaces catiónicos redujo significativamente la CE₅₀ observada.

Tabla 2. Inhibición específica de la traducción sin células usando +PMO dirigido a ARNm del VHC

Nombre	SEQ ID NO	Carga +	Descripción	CE ₅₀ (nM)
AVI-4065	18	0	*****	850,8
HCV-2a+	19	+2	+**+*****	471,0
HCV-2b+	20	2	*****+***+**	724,4
HCV-2c+	21	2	+*****+**	231,4
HCV-2d+	22	2	*****+*****+*****	326,3
HCV-2e+	23	2	*****+**+*****	430,6
HCV-2f+	24	2	*****+*****	656,3
HCV-3g+	25	3	*****+**+***+**	228,9
HCV-3h+	26	3	*****+*****+***+**	583,5
HCV-3i+	27	3	+*****+*****+**	427,7
HCV-4j+	28	4	*****+**+**+***+**	315,3
HCV-4k+	29	4	+*****+**+*****+**	193,1
HCV-4l+	30	4	+****+*****+***+**	314,5
HCV-5m+	31	5	+**+**+**+*****+**	146,0
HCV-5n+	32	5	+****+***+**+***+**	212,0
HAV-60+	33	6	+**+**+**+**+***+**	161,7
HCV-7p+	34	7	+**+**+**+**+**+***+**	50,98

- Para evaluar la especificidad de secuencia de la actividad antisentido aumentada del +PMO, el +PMO también se usó en ensayos de traducción sin células en los que el ARNm de entrada no codificaba una diana para el +PMO. En este caso, se usó +PMO que se dirigía al gen de VP24 de EBOV en un ensayo con ARNm de luciferasa:gen de L de EBOV. Los resultados presentados en la Fig. 5 demuestran un alto grado de especificidad para el +PMO. Fueron necesarias concentraciones de +PMO mayores de 30 µM antes de observarse inhibición no específica significativa.

B. Actividad *in vitro* en cultivo celular

- Como muestran los datos descritos anteriormente, los oligómeros PMO+ proporcionaron una potenciación múltiple de la actividad antisentido en ensayos sin células sobre oligómeros PMO sin carga. En un ensayo habitualmente usado para evaluar el transporte y la actividad antisentido en el cultivo celular, las células HeLa se transfectan de forma estable con el plásmido pLuc/75, que tiene un gen de luciferasa interrumpido por un intrón de β-globina humana mutado en el nucleótido 705, que provoca de este modo el corte y empalme incorrecto. Debido a que los transcritos con corte y empalme incorrecto no producen proteínas indicadoras funcionales, no se observa ninguna señal indicadora a no ser que se induzca corte y empalme de tipo silvestre con un oligómero antisentido corrector de corte y empalme. Un oligómero antisentido que se dirija al sitio de corte y empalme 705 (que tiene SEQ ID NO: 286), cuando se suministra eficazmente, corrige el corte y empalme y permite la expresión de luciferasa. Este ensayo mide la capacidad de los oligómeros para entrar en células y núcleos, y posteriormente bloquea el corte y empalme incorrecto de preARNm, lo que conduce a la expresión de un gen indicador. Debido a que los oligómeros deben

entrar en células y núcleos celulares para producir una señal en el ensayo, es útil para medir la captación y eficacia de restos de suministro (cuando estén presentes) así como actividad antisentido de los oligómeros de unión.

5 Se valora en dicho ensayos oligómeros morfolino que tienen enlaces catiónicos designados en el presente documento enlaces "GuX" o enlaces "Pip" (véase Fig. 1), en cantidades y distribución diferentes, en dicho ensayo. Los últimos oligómeros (que tienen enlaces "Pip") también se denominan PMO+ o PMO Plus, mientras que los primeros oligómeros (que tienen enlaces "GuX") se denominan PMO GuX.

10 La distribución de cargas en los oligómeros fue como se muestra a continuación:

10	C	C	T	C	T	T	A	C	C	T	C	A	G	T	T	A	C	A	PMO de control 705
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+								8+-Centralizado
	+		+		+	+	+												8+-Polarizado
		+			+			+							+	+			8+-Dispersado
			+		+			+							+		+	+	6+-Dispersado
				+			+			+					+				4+-Dispersado

15 Como muestran los datos en las Figs. 7 y 8, el aumento del número de cargas, hasta ocho, en el 18mero aumentó la actividad antisentido en este ensayo en relación con PMO sin carga. Los datos también sugieren que la posición "centralizada" de las cargas aumentó la actividad antisentido en relación con las distribuciones "polarizada" y "distribuida", y que los enlaces "GuX" fueron significativamente más eficaces que los enlaces "Pip". Una comparación de las afinidades de unión, basándose en T_m, muestra que este patrón no basa simplemente en la afinidad de unión (Fig. 10), aunque todos los PMO con carga tuvieron mayores T_m que los PMO sin carga.

20 Los datos en la Fig. 9 incorporan controles mezclados en los ensayos de las Figs. 7-8. Como se muestra, los controles mezclados (SCR-G₈-Cent y SCR-P₈-Cent) no mostraron esencialmente ninguna actividad antisentido en el ensayo.

25 Los datos en las Figs. 11A-B comparan los oligómeros con carga "G₈-centralizados" y "P₈-centralizados" con el PMO de control 705 conjugado con un péptido de transporte que tiene la fórmula (RXR)₄, donde R es arginina y X es ácido 6-aminohexanoico (véase por ejemplo Fig. 1D). Esta conjugación tiene un efecto drástico en la actividad antisentido, que se cree que se debe en gran parte al transporte potenciado a las células.

C. Actividad *in vivo*: eficacia antivírica aumentada de +PMO específicos de virus del Ébola en roedores

30 Para determinar la eficacia *in vivo* de los +PMO específicos de virus del Ébola, se trataron ratones con dos dosis de 50 µg de tres +PMO individuales y un PMO sin carga que se dirigía al ARNm del gen de VP24 (VP24-AUG, VP24-2+, VP24-4a+ y VP24-4b+; SEQ ID NOS: 5-8, respectivamente) a las 24 y 4 horas antes de la exposición con 1000 unidades formadoras de placas (ufp) de virus del Ébola adaptado a ratones. La supervivencia se determinó durante un periodo de 14 días, con diez ratones en cada grupo de tratamiento.

35 Los +PMO de VP24 mostraron un amplio intervalo de eficacia contra infección por EBOV letal, conteniendo el +PMO cuatro cargas positivas que proporcionaban la mayor protección (70 % de supervivencia), como se muestra en la Fig. 6. Los dos +PMO con dos cargas positivas demostraron el efecto intermedio (50-60 % de supervivencia) y el PMO sin carga proporcionó la menor protección, con solamente 10 % de supervivencia. El grupo de control negativo recibió PBS y no se observaron Supervivientes. Se vio un efecto beneficioso similar con +PMO que se dirigía a ARNm de VP35.

45 +PMO proporcionó protección mejorada contra una exposición a virus del Ébola letal en un sistema modelo de cobaya de Hartley. Una combinación de tres fármacos de PMO sin carga (SEQ ID NO: 1, 5 y 11) o versiones conjugadas con péptidos de estos mismos tres PMO no proporcionó ninguna protección contra una exposición a virus del Ébola letal en el sistema modelo de cobaya. La misma combinación de tres fármacos en la forma +PMO (SEQ ID NO: 247, 248 y 249) proporcionó protección a 75 % de las cobayas expuestas. Además, el uso de PMO+ permitió que una terapia de combinación de dos fármacos (SEQ ID NO: 248 y 249) proporcionara protección al 80 % de las cobayas expuestas al virus del Ébola.

50 Se realizaron experimentos en primates no humanos (macacos rhesus) similares a los descritos previamente (Warfield, Swenson *et al.* 2006) usando compuestos +PMO en la forma de combinación de dos fármacos (SEQ ID NO: 248 y 249). Los animales infectados por el virus del Ébola se trataron con postinfección de +PMO a 20 mg/kg diariamente durante 10 días. El tratamiento proporcionó protección al 75 % de los animales, todos los cuales se expusieron a 1000 ufp del virus del Ébola.

IV. Preparación de oligómero que tiene enlaces intersubunitarios catiónicos

60 Las Figuras 2A a 2R ilustran la preparación de subunidades de morfolino que tienen grupos de formación de pares de bases protegidos adecuadamente, y la conversión de estas subunidades en oligómeros morfolino que tienen

enlaces catiónicos. Se proporcionan detalles experimentales adicionales en Materiales y Métodos, posteriormente. Las subunidades con enlaces con carga pueden usarse en síntesis de oligómeros por etapas convencional, como se describe, para oligómeros morfolino, en la Patente de Estados Unidos N.º 5.185.444 o en Summerton y Weller, 1997 (citado anteriormente).

5 La Figura 2A muestra subunidades de morfolino representativas **1a-e** con restos de formación de pares de bases Pi de A, C, G, T e I. Estas subunidades pueden prepararse a partir de los ribonucleósidos correspondientes como se ilustra en la Figura 2B y se describe en el Ejemplo 1. Se usan grupos protectores adecuados para las bases nucleosídicas, cuando sea necesario; por ejemplo, benzoílo para adenina y citosina, fenilacetilo para guanina y pivaloiloximetilo para hipoxantina (1). El grupo de pivaloiloximetilo puede introducirse en la posición N1 de la base heterocíclica de hipoxantina como se muestra en la Figura 2B. Aunque puede emplearse una subunidad de hipoxantina desprotegida, como en If, los rendimientos en las reacciones de activación son muy superiores cuando la base está protegida.

15 El tratamiento de 5'-hidroxi (**1**) con un cloruro ácido reactivo, tal como N,N-dimetilfosforamidodichlorhidrato (4), proporciona subunidades activadas de tipo (a) (enlace sin carga) **5a-e**, como se muestra en la Figura 2C y se describe en el Ejemplo 2. Aunque puede emplearse la subunidad que contiene hipoxantina desprotegida, como en If, los rendimientos en las reacciones de activación son muy superiores cuando la base está protegida.

20 La Figura 2C también ilustra el uso de cloruros ácidos reactivos alternativos, tales como **6a**, para convertir subunidades de 5'-hidroxi **1a-e** en subunidades activadas de tipo (b1) (enlace con carga) **7a-e**.

25 De forma similar, un cloruro ácido reactivo acíclico, tal como **8a**, puede usarse para convertir subunidades 5'-hidroxi **1a-e** en subunidades activadas de tipo (b2) (enlace con carga) **9a-e**. Estas subunidades de enlace con carga pueden incorporarse en oligómeros morfolino con enlaces fosfordiamidato y, tras el tratamiento con los reactivos habituales que retiran los grupos protectores de bases, preferentemente amoníaco, producen oligómeros que contienen enlaces fosfordiamidato catiónicos de tipo (b1) y (b2).

30 Un esquema de una ruta sintética que puede usarse para preparar subunidades de morfolino que contienen el enlace (1-piperazino)fosfoinildenoxi (tipo b1'; "Pip") se muestra en la Figura 2D y se describe en el Ejemplo 3. La reacción de piperazina y cloruro de tritilo 10 proporciona tritil piperazina, que puede aislarse como la sal de succinato **11**. La reacción con trifluoroacetato de etilo **13a** en presencia de una base débil, por ejemplo diisopropiletilamina, proporciona 1-trifluoroacetil-4-tritil piperazina **14**, que tras el tratamiento con HCl le proporciona la sal destritilada **15** con buen rendimiento. Se realizó introducción del resto de diclorofosforilo en el nitrógeno libre con oxicluro de fósforo en tolueno, produciendo el resto de piperazina-P(O)Cl₂ **6a**. Este reactivo puede hacerse reaccionar con subunidades de morfolino 5'-hidroxi para producir subunidades activadas que contienen el enlace de (1=piperazino) fosfinildenoxi protegido, que puede incorporarse en oligómeros usando el protocolo de síntesis de oligómeros posterior.

40 Puede prepararse aminas acíclicas protegidas selectivamente, adecuadas para incorporación en subunidades de morfolino para la preparación de enlaces catiónicos de tipo (b2), mediante métodos análogos al descrito e ilustrado para las aminas cíclicas; véase Ejemplo 4. Como alternativa, el tratamiento de una solución de una diamina con 1,6 equivalentes del éster reactivo **13a-d** proporciona una solución con <5 % de las especies de diamino libres. La solución se usó directamente para activación con POCl₃ y la activación de las subunidades de morfolino **1a-e**. Sería posible para un experto en la materia preparar oligómeros con cadenas laterales catiónicas más complejas usando los métodos anteriores.

50 Pueden prepararse subunidades para la introducción de enlaces catiónicos de tipo (b3), es decir que tienen un nitrógeno en la posición 5' en oligómeros, como se muestra en la Figura 2E y se describe en el Ejemplo 5, por oxidación de una subunidad de morfolino en el aldehído correspondiente (**16a-e**) y aminación reductora con una diamina protegida convenientemente, que proporciona una subunidad de 5'-aminomorfolino representativa **20a-e**. Es con frecuencia preferible aislar la amina como el derivado de 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) **21a-e** después de tratamiento con cloruro de Fmoc. La amina libre puede regenerarse fácilmente cuando sea necesario mediante tratamiento con trietilamina o 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU). La activación de la amina con fosfordicloridato de etilo proporciona subunidades activadas de tipo (b3) **22a-e**, que pueden incorporarse en oligómeros de la misma manera que las subunidades de tipo (a), (b1) y (b2).

60 Un método para la preparación de variantes de **22a-e**, que contiene diversas cadenas laterales en el nitrógeno 5', implica alquilación de una subunidad de 5'-morfolino activada con aminas protegidas convenientemente. Como se muestra en la Figura 2F para dos ejemplos, y se describe en el Ejemplo 6, la hexametilén diamina se protegió en primer lugar, después se hizo reaccionar con subunidad 5'-O-p-toluenosulfonada **23a-e**. Usando los métodos en las figuras 2E y 2F y en los Ejemplos correspondientes, un experto en la materia podría preparar una amplia serie de subunidades 5'-amino sustituidas adecuadas para incorporación en oligómeros morfolino catiónicos.

65 Como se ha indicado anteriormente, también pueden prepararse enlaces catiónicos a partir de enlaces que no contienen fósforo. Por ejemplo, pueden introducirse subunidades capaces de proporcionar enlaces sulfonamida con

grupos catiónicos colgantes a partir de la amina usada en enlaces de tipo (b3), como se muestra en la Figura 2G y se describe en el Ejemplo 7. La reacción de las subunidades aminadas con sulfurtrioxido/piridina en trietilamina que contiene N,N-dimetilformamida proporciona un ácido sulfámico que se trató con fosgeno en diclorometano que contiene piridina para proporcionar la subunidad que contiene cloruro de sulfamoilo activado.

Pueden prepararse oligómeros morfolino a partir de dichas subunidades por etapas en un soporte sólido, preferentemente un soporte sólido de aminometil poliestireno, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 5.185.144 o en Summerton y Weller, 1997 (citado anteriormente). La resina se modifica, preferentemente, por reacción con un "anclaje" disulfuro, que permite la producción del oligómero morfolino en el soporte y fácil liberación tras tratamiento con un tiol, como se muestra en la Figura 2H y se describe en el Ejemplo 8.

En algunos casos es ventajoso introducir un resto que contiene trietilenglicol ("cola") que aumenta la solubilidad acuosa de los oligómeros morfolino. Un método para conseguir esto se ilustra en la Figura 2I y se describe en el Ejemplo 9.

En una síntesis típica, el anclaje disulfuro **34** se hace reaccionar como se muestra en la Figura 2J con resina de aminometilpoliestireno en 1-metil-2-pirrolidinona (NMP) para proporcionar anclaje de resina **39**, adecuado para la incorporación de subunidades activadas. Opcionalmente, el resto de Cola puede introducirse en el extremo 5' terminal del oligómero por reacción de la resina de anclaje disulfuro con **38** para producir resina de Cola **40**. El uso de resina **40** provocará que el grupo HOCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂OC(O) (=EG3) se una al extremo 5' terminal del oligómero.

Las subunidades activadas, que contienen el tipo de enlace intersubunitario apropiado, se introducen por etapas mediante síntesis de fase sólida en la resina **39** que contiene anclaje u, opcionalmente, la resina de Cola **40**. Un ciclo de síntesis de fase sólida realizado usando un sintetizador automático consiste en lavar la resina con NMP o diclorometano (DCM), seguido de tratamiento con ácido cianoacético 11 % en acetonitrilo 20 %/DCM (v/v). Después de neutralización con una solución al 5 % de diisopropiltilamina (DIEA) en isopropanol 20 %/DCM, la resina se hace reaccionar con una solución 0,2 M de la subunidad activada en 1,3-dimetil-2-imidazolidinona (DMI) (o Cola en NMP) que contiene 4-etilmorfolina 0,4 M. Después de lavar con solución de neutralización, el ciclo puede repetirse para introducir la siguiente subunidad. Opcionalmente, después de la adición de subunidad final, el grupo tritilo al final de la resina se retira y se introduce cloruro de metoxitritilo para preparar el oligómero 3'-metoxitritilado. La especie de metoxitritilo más lábil proporciona un beneficio en la etapa de destritolación acuosa que sigue a la purificación de "tritilo-activación/tritilo-desactivación" de los oligómeros en bruto.

El diseño de reactor usado para la preparación de las resinas a granel **39** y **40** se empleó para la síntesis a mayor escala de oligómeros morfolino. A gran escala, las etapas de destritolación realizadas cuando se habían introducidos enlaces fosforodiamidato en la resina usaron una solución de trifluoroacetato de 4-cianopiridinio en trifluoroetanol/DCM 20 %. Esto proporcionó menos hidrólisis de los enlaces fosforodiamidato algo lábiles por ácidos que los reactivos de destritolación basados en ácido carboxílico. Adicionalmente, se descubrió que el uso de subunidad G doblemente protegida era ventajoso. La Figura 2K ilustra la síntesis de la especie G protegida por N₂, O6 46 que se empleó.

Los oligómeros sintetizados se liberaron del soporte sólido por tratamiento con una solución de 1,4-ditiotreitol y trietilamina en NMP. La solución se trató con amoníaco concentrado y se mantuvo a 45 °C. La mezcla se selló en un vaso a presión y se calentó a 45 °C durante 16-24 horas. La solución se diluyó con amoníaco acuoso 0,28 % y se pasó a través de resina de intercambio iónico para capturar el oligómero metoxitritilado en bruto. El producto se eluyó con un gradiente salino para recuperar el producto que contenía metoxitritilo o tritilo, que se eluía posteriormente, y el producto que contenía fracciones agrupadas. Para preparación de oligómeros 3' no sustituidos (3'-H) que no requerían modificaciones adicionales, la solución se trató con ácido a pH = 2,5 para desmetoxitritilar el oligómero. La mezcla de desmetoxitritilación se neutralizó inmediatamente con amoníaco concentrado, y la solución se pasó a través de resina de fase inversa. El producto se recuperó por elución con acetonitrilo 45 %/amoníaco acuoso 0,28 % y se aisló como un polvo blanco después de la liofilización. Puede realizarse purificación adicional del producto en resinas de intercambio catiónico como se describe en la sección de métodos. Como alternativa, fue ventajoso conservar el grupo de 3'-metoxitritilo/tritilo para realizar la modificación de los restos de amina de cadena principal independientes del extremo 3' terminal del oligómero, como se describe posteriormente. En este caso, se siguió el procedimiento anterior excepto que se omitió el tratamiento con ácido acuoso.

Los grupos amina introducidos en un oligómero morfolino como parte de enlaces catiónicos pueden modificarse adicionalmente. Este concepto permite construir un oligómero a partir de una subunidad modificada relativamente sencilla, pero con funcionalidad suficiente para permitir la introducción de restos complejos en cualquier localización a lo largo de la cadena principal de los oligómeros morfolino.

(Obsérvese que, por razones de síntesis, el enlace 5' terminal de un oligómero no comprende típicamente un enlace de tipo (b1) descrito en presente documento. Como se muestra, por ejemplo, en las Figs. 2P-2Q, la síntesis apoyada en resina por etapas preferida de los oligómeros proporciona un anillo de piperazina en el átomo de fósforo en el

extremo 5' terminal; la presencia de un segundo anillo de piperazina en el fósforo estaría restringida por razones estéricas).

Una modificación importante es la incorporación de grupos de guanidinio en el oligómero. Esto puede realizarse de dos maneras. En la primera, el resto de amina en la cadena principal del oligómero se convirtió directamente en una especie de guanidinio por reacción con clorhidrato de 1H-pirazol-1-carboxamida (M S Bernatowicz, Y Wu, G R Matsueda, J. Org. Chem., 1992, 57(8), 2497-2502) en solución acuosa tamponada con carbonato sódico, como en la Fig. 2L, que también muestra la cola de EG3 en el extremo 5' terminal. En la segunda, una sustancia que comprende grupos tanto carboxilo como guanidinio, por ejemplo, ácido 6-guanidinohexanoico se activó con hexafluorofosfato de 2-(1-*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamomio (HBTU) y se hizo reaccionar con el oligómero que contenía amina (Fig. 2M). De una manera similar, puede introducirse ácido 4-guanidinobutanoico, ácido 3-guanidinopropanoico y ácido guanidinoacético. En un híbrido de estos enfoques, el resto de amina se hizo reaccionar con un aminoácido FMOC protegido, por ejemplo, ácido 6-aminohexanoico de FMOC para introducir una cadena lateral que contiene amina primaria protegida, que después del tratamiento con amoníaco para retirar el grupo de FMOC se guaniló como anteriormente. Se separaron las especies totalmente guaniladas de oligómeros parcialmente guanilados por cromatografía catiónica al pH apropiado.

Los extremos del oligómero también pueden sustituirse con restos de guanidinio por estos métodos, como se ilustra en la Fig. 2N, que también muestra un oligómero representativo creado a partir de la resina 39, sin adición de la cola de PEG.

Otra modificación notable es la incorporación de péptidos a lo largo de la cadena principal. Están fácilmente disponibles de fuentes comerciales péptidos pequeños, por ejemplo, Bachem California, Inc. 3132 Kashiwa Street Torrance, CA 90505 Estados Unidos, y AnaSpec, Inc. 2149 O'Toole Ave., San Jose, CA 95131. La incorporación del péptido seguido de la química de hexafluorofosfato de 2-(1-*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamomio (HBTU) clásica, como se ilustra en la Fig. 2O. Los grupos de guanidinio en los oligómeros o el péptido no interfieren.

Los oligómeros también pueden conjugarse en el extremo 3' terminal con péptidos ricos en arginina, útiles para potenciar el suministro de los productos a células. En este caso, se realizó protección de restos de amina primaria y secundaria a lo largo de la cadena principal de oligómeros 3'-metoxitritilados/tritilados por trifluoroacetilación, como se muestra en la Fig. 2P. El grupo de metoxicitrilo terminal se retiró y el péptido se conjugó usando HBTU. La reacción de conjugación se preparó por tratamiento con amoníaco para retirar los grupos de trifluoroacetilo. El conjugado se purificó por cromatografía de intercambio catiónico. Cuando las funciones de amina de cadena principal están completamente guaniladas, el péptido puede introducirse sin interferencia de estas cadenas laterales, como se muestra en la Figura 2Q.

Puede conseguirse metilación de la piperazina de la serie de enlaces b1 tratando el oligómero morfolino con formaldehído y borohidruro sódico en solución acuosa, como se ilustra en la Fig. 2R. Pueden usarse otros aldehídos para incorporar grupos alternativos.

V. Aplicaciones de Oligómeros Morfolino que contiene Enlaces Catiónicos

Los compuestos descritos en el presente documento pueden usarse en métodos para inhibir la producción de una proteína. En consecuencia, un ácido nucleico que codifica dicha proteína se expone a un oligómero antisentido que contiene al menos un enlace intersubunitario catiónico y preferentemente que contiene 20 % a 50 % de dichos enlaces catiónicos, como se desvela en el presente documento, donde los restos de formación de pares de bases Pi forman una secuencia eficaz para hibridar con una parte del ácido nucleico en una localización eficaz para inhibir la producción de la proteína. La localización puede ser, por ejemplo, un codón de inicio ATG de una ARNm, un sitio de corte y empalme de un pre-ARNm, o una secuencia diana vírica como se describe posteriormente.

En general, para aplicaciones antisentido, el oligómero puede ser 100 % complementario de la secuencia diana de ácido nucleico o puede incluir desapareamientos, por ejemplo, para acomodar variantes, siempre que un heterodúplex formado entre el oligómero y la secuencia diana de ácido nucleico sea suficientemente estable para resistir la acción de nucleasas celulares y otros modos de degradación que pueden producirse *in vivo*. Los desapareamientos, si están presentes, son menos desestabilizantes hacia las regiones finales de la doble cadena híbrida que en el medio. El número de desapareamientos permitidos dependerá de la longitud del oligómero, el porcentaje de pares de bases G:C en la doble cadena, y la posición del desapareamiento o los desapareamientos en la doble cadena, de acuerdo con principios bien entendidos de la estabilidad de doble cadena. Aunque dicho oligómero antisentido no es necesariamente 100 % complementario de la secuencia diana de ácido nucleico, es eficaz para unir de forma estable y específica con la secuencia diana, de modo que una actividad biológica de la diana de ácido nucleico, por ejemplo, expresión de proteína o proteínas codificadas, esté modulada.

La estabilidad de la doble cadena formada entre un oligómero y la secuencia diana es una función de la T_m de unión y la susceptibilidad de la doble cadena a escisión enzimática celular. La T_m de un compuesto antisentido con respecto a ARN de secuencia complementaria puede medirse por métodos convencionales, tales como los descritos

por Hames *et al.*, Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, 1985, pág. 107-108 o como se describe en Miyada C.G. y Wallace R.B., 1987, Oligonucleotide hybridization techniques, Methods Enzymol. Vol. 154 pág. 94-10.

Cada oligómero antisentido debería tener una T_m , de unión, con respecto a un ARN de secuencia complementaria, de temperatura mayor que la corporal y preferentemente mayor de 50 °C. Se prefieren T_m en el intervalo de 60-80 °C o mayores. De acuerdo con principios bien conocidos, la T_m de un compuesto oligomérico, con respecto a un híbrido de ARN de base complementaria, puede aumentarse aumentando la reacción de bases emparejadas de C:G en la doble cadena y/o aumentando la longitud (en pares de bases) del heterodúplex. Al mismo tiempo, para fines de optimización de la captación celular, puede ser ventajoso limitar el tamaño del oligómero. Por esta razón, se prefieren en general compuestos que muestran alta T_m (50 °C o mayor) a una longitud de 20 bases o menos frente a las que requieren más de 20 bases para valores de T_m altos.

Preferentemente, el oligómero se capta activamente por células de mamífero. El oligómero puede conjugarse con un resto de transporte como se describe en el presente documento para facilitar dicha captación.

El suministro eficaz del oligómero antisentido al ácido nucleico diana es un aspecto importante del tratamiento. Las vías de suministro de oligómero antisentido incluyen, pero sin limitación, diversas vías sistémicas, incluyendo vías oral y parenteral, por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal e intramuscular, así como inhalación, suministro transdérmico y tópico. La vía apropiada puede determinarse por un experto en la materia, según sea apropiado para la afección del sujeto que se trate. Por ejemplo, una vía apropiada para suministro de un oligómero antisentido en el tratamiento de infección vírica de la piel es suministro tópico, mientras que el suministro de un oligómero antisentido para el tratamiento de una infección respiratoria vírica es por inhalación. El oligómero también puede suministrarse directamente al sitio de infección vírica, o al torrente sanguíneo.

El oligómero antisentido puede administrarse en cualquier vehículo conveniente que sea fisiológicamente aceptable. Dicha composición puede incluir cualquiera de una diversidad de vehículos convencionales farmacéuticamente aceptables empleados por los expertos habituales en la materia. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), agua, etanol acuoso, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua o emulsiones de triglicéridos, comprimidos y cápsulas. La elección de vehículo fisiológicamente aceptable adecuado variará dependiendo del modo elegido de administración.

En algunos casos, pueden emplearse liposomas para facilitar la captación del oligonucleótido antisentido en células. (Véase, por ejemplo, Williams, S.A., Leukemia 10(12):1980-1989, 1996; Lappalainen *et al.*, Antiviral Res. 23:119, 1994; Uhlmann *et al.*, Antisense Oligonucleotides: A New Therapeutic Principle, Chemical Reviews, Volumen 90, N.º 4, páginas 544-584, 1990; Gregoriadis, G., Capítulo 14, Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine, pág. 287-341, Academic Press, 1979). También pueden usarse hidrogeles como vehículos para administración de oligómeros antisentido, por ejemplo, como se describe en el documento WO 93/01286. Como alternativa, los oligonucleótidos pueden administrarse en microesferas o micropartículas. (Véase, por ejemplo, Wu, G.Y. y Wu, C.H., J. Biol. Chem. 262:4429-4432, 1987). Como alternativa, el uso de microburbujas cargadas de gas en complejo con los oligómeros antisentido puede potenciar el suministro a tejidos diana, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 6.245.747.

También pueden usarse composiciones de liberación sostenida. Estas pueden incluir matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos moldeados tales como películas o microcápsulas.

A. Compuestos Antisentido para Tratar la Reestenosis

Los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento de trastornos proliferativos vasculares tales como reestenosis. Las áreas de lesión vascular incluyen, por ejemplo, reestenosis o reestrechamiento del lumen vascular después de intervención vascular, tal como angioplastia de globo de las arterias coronarias, con o sin inserción de estent. Se cree que la reestenosis se produce en aproximadamente 30 % a 60 % de las lesiones tratadas por angioplastia y aproximadamente 20 % de las lesiones creadas con estents en un periodo de 3 a 6 meses después del procedimiento (Véase, por ejemplo, Devi, N.B. *et al.*, Cachet Cardiovasc Diagn 45(3):337-45, 1998). La estenosis también puede producirse después de una operación de derivación de arterias coronarias, en la que se realiza cirugía cardíaca para redirigir, o "derivar", sangre alrededor de arterias obstruidas y mejorar el aporte de sangre y oxígeno al corazón. En dichos casos, la estenosis puede producirse en los segmentos de vasos sanguíneos trasplantados y particularmente en el punto de unión de vasos reemplazados. También puede producirse estenosis en puntos de unión anastomóticos creados para diálisis.

Los oligómeros de la invención pueden usarse por lo tanto en composiciones y métodos para tratar la reestenosis. En particular, los enlaces catiónicos contenidos en una composición de oligómero morfolino antisentido se dirigen contra *c-myc* para reducir el riesgo de reestenosis en angioplastia transluminal, tal como angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA) (véase por ejemplo Publicación de PCT N.º WO/2000/044897). En comparación con oligómeros morfolino con solamente enlaces sin carga, se espera que los que contienen enlaces catiónicos intercalados a lo largo del compuesto de *c-myc* antisentido proporcionen mayor eficacia a menores dosis en el tratamiento de reestenosis.

Por tanto, el método incluye administrar al paciente, por administración local directamente al sitio de lesión del vaso, o por suministro sistémico mediante administración intravascular, un oligómero como se describe en el presente documento, que contiene al menos un enlace intersubunitario catiónico, y preferentemente que contiene 20 % a 50 % de dichos enlaces catiónicos, que tiene de 12 a 40 subunidades, incluyendo una secuencia de bases de dirección que es complementaria de una secuencia diana en al menos 12 bases contiguas dentro de la región de sitio de inicio AUG de ARNm de *c-myc* humano definido por SEQ ID NO: 59 (*c-myc* humano, -100 a +25 en relación con ATG: CGCCGCTGCC AGGACCCGCT TCTCTGAAAG GCTCTCCTTG CAGCTGCTTA GACGCTGGAT TTTTTCGGG TAGTGGAAAA CCAGCAGCCT CCCGCGACGA TGCCCCTCAA CGTTAGCTTC ACCAA), en una cantidad eficaz para reducir el riesgo de reestenosis en el paciente. El compuesto se administra por una de:

- (a) puesta en contacto de la región del vaso con un depósito que contiene el compuesto antisentido e introducción en el compuesto del depósito en el vaso por iontoforesis o electroporación;
- (b) inyección del compuesto del catéter directamente en la región del vaso, bajo presión, mediante inyectoros contenidos en la superficie del globo de catéter, donde dichos inyectoros son capaces de penetrar en la túnica media en el vaso;
- (c) inyección en o puesta en contacto de la región del vaso de micropartículas que contienen el compuesto antisentido en forma inmovilizada;
- (d) puesta en contacto de la región del vaso con un recubrimiento de hidrogel contenido en la superficie del globo de catéter y que contiene el compuesto antisentido en forma difundible;
- (e) puesta en contacto de la región del vaso con un estent que tiene una capa de superficie externa que contiene el compuesto antisentido en forma difundible; y
- (f) inyección del compuesto por administración intravascular que da como resultado suministro sistémico a los tejidos vasculares.

El compuesto antisentido puede tener una secuencia de dirección que tiene al menos 90 % de homología con la secuencia identificada por SEQ ID NO: 43 (ACGTTGAGGGGCATCGTCGC) y, como alternativa, al menos 90 % de homología con una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 60 (GGAGGCTGCTGGTTTTCCAC) y 61 (GGCATGGTCGCGGGAGGCTC).

La cantidad de compuesto antisentido administrada puede ser de entre aproximadamente 0,5 y 30 mg. El compuesto puede derivatizarse con un resto que potencia la solubilidad del compuesto en medio acuoso, y el compuesto se administra de una solución que contiene al menos aproximadamente 30 mg/ml del compuesto antisentido.

El compuesto se diseña para hibridar con ARNm de *c-myc* en condiciones fisiológicas con una T_m sustancialmente mayor de 37 °C, por ejemplo, al menos 50 °C y preferentemente 60-80 °C. El compuesto contiene preferentemente un triplete de 3 bases interno complementario del sitio AUG, y bases complementarias de una o más bases 5' y 3' del sitio diana. Una secuencia de compuesto preferida es el 20mero identificado como SEQ ID NO: 43, en el que el triplete de CAT en las secuencias se une con el sitio de inicio AUG, las 6 bases 3' de la secuencia CAT se extienden en la dirección cadena arriba (5') en la diana, y las 11 bases 5' de la secuencia de CAT se extienden cadena abajo en la diana. Este compuesto tiene solubilidad potenciada en virtud de la ausencia de regiones autohibridantes.

El oligómero se emplea, por ejemplo, en un estent recubierto, o mediante una solución de empapado *ex vivo* para tratamiento de venas safenas, o se suministra de otro modo al sitio de lesión vascular. En otra realización, el compuesto antisentido forma parte de una composición de partículas para su uso en el tratamiento de la reestenosis.

Una de dichas partículas es una partícula biodegradable, por ejemplo, una partícula de polilactato o poliglicólica, que contiene compuesto antisentido inmovilizado. Las partículas están preferentemente en el intervalo de 1-5 micrómetros, y son útiles para suministro mediante suministro directo de partículas a un sitio de vaso de angioplastia, como se describe posteriormente, bien imprimiéndose en las paredes vasculares por presión de un globo contra la pared, o por liberación de un vehículo de partículas, tal como un estent.

El oligómero puede también emplearse administrando mediante suministro sistémico al sitio de lesión vascular por inyección intravascular.

Como alternativa, las partículas pueden ser microburbujas que contienen el compuesto en forma inmovilizada. Las partículas pueden suministrarse también al sitio vascular, es decir, mediante contacto de las paredes vasculares directamente con una suspensión de las partículas, con liberación del compuesto de las partículas, que puede facilitarse por exposición de la región vascular a energía ultrasónica. Se ha descubierto que las composiciones de microburbujas son particularmente útiles en el suministro de moléculas unidas, tales como oligonucleótidos, a áreas de trombosis o lesión vascular, por ejemplo endotelio dañado, así como a órganos seleccionados tales como el hígado y el riñón. Véase, por ejemplo, Publicación de PCT N.º WO 2000/02588, Patentes de Estados Unidos N.º 6.245.247 y 7.094.765, y Publicación de Solicitud de Estados Unidos N.º 20030207907.

En otra realización más, las partículas son liposomas que contienen compuesto antisentido inmovilizado. Debido a que las partículas liposómicas se aplican directamente al sitio vascular, los liposomas pueden ser liposomas convencionales sin modificaciones de superficie necesarias para conseguir tiempos de circulación largos.

B. Aplicaciones Antivíricas

En otra realización, pueden usarse oligómeros de la invención para inhibir la replicación de un virus de ARN que tiene un genoma de sentido positivo, monocatenario, y seleccionarse de una de las familias de virus Flaviviridae, Picornaviridae, Caliciviridae, Togaviridae, Arteriviridae, Coronaviridae, Astroviridae y Hepeviridae.

B1. Estructura secundaria de Tallo-Bucle de dirección de virus de ARNm

Una clase de compuesto antivírico antisentido ejemplar es un oligómero morfolino que tiene enlaces catiónicos, como se describe en la presente invención, que tienen una secuencia de 12-40 subunidades y una secuencia de dirección que es complementaria de una región asociada con estructura secundaria de tallo-bucle dentro de las 40 bases del extremo 5' terminal de la cadena de ARN con sentido positivo del virus diana (Véase, por ejemplo, Publicación de PCT N.º WO/2006/033933 o Publicaciones de solicitud de Estados Unidos N.º 20060269911 y 20050096291).

El método incluye identificar en primer lugar como una secuencia diana vírica, una región dentro de las 40 bases 5' terminales de la cadena positiva del virus infeccioso cuya secuencia es capaz de formar estructura secundaria de tallo-bucle interna. Se construye después, por síntesis de fase sólida por etapas, un oligómero que tiene al menos un enlace intersubunitario catiónico como se describe en el presente documento y que contiene preferentemente de 20 % a 50 % de dichos enlaces catiónicos, y que tiene una secuencia de dirección de al menos 2 subunidades que es complementaria de la región de genoma del virus capaz de formar estructura de doble cadena interna, donde el oligómero es capaz de formar con la secuencia diana vírica una estructura de heterodúplex compuesta de la cadena con sentido positivo del virus y el compuesto oligonucleotídico, y caracterizado por una T_m de disociación de al menos 45 °C y alteración de dicha estructura de tallo-bucle.

La secuencia diana puede identificarse analizando las secuencias 5' terminales, por ejemplo, las 40 bases 5' terminales, por un programa informático capaz de realizar predicciones de estructura secundaria basándose en una búsqueda del estado de energía libre mínima de la secuencia de ARN de entrada.

En un aspecto relacionado, los oligómeros pueden usarse en métodos para inhibir en una célula hospedadora de mamífero, replicación de un virus de ARN infeccioso que tiene un genoma con sentido positivo, monocatenario, y seleccionado de una de las familias Flaviviridae, Picornaviridae, Caliciviridae, Togaviridae, Arteriviridae, Coronaviridae, Astroviridae o Hepeviridae. El método incluye la administrar a las células hospedadoras infectadas, una cantidad inhibidora de virus de un oligómero como se describe en el presente documento, que tiene una secuencia de dirección de al menos 12 subunidades que es complementaria de una región dentro de las 40 bases 5' terminales del genoma vírico de cadena positiva que es capaz de formar una estructura secundaria de tallo-bucle interna. El compuesto es eficaz, cuando se administra a las células hospedadoras, para formar una estructura de heterodúplex (i) compuesta de la cadena con sentido positivo del virus y el compuesto oligonucleotídico, y (ii) caracterizada por una T_m de disociación de al menos 45 °C y rotura de dicha estructura secundaria de tallo-bucle. El compuesto puede administrarse a un sujeto mamífero infectado con el virus, o en riesgo de infección con el virus.

Para el tratamiento de un *Flavivirus* o *Hepacivirus*, la secuencia de dirección es complementaria de una región asociada con una estructura secundaria de tallo-bucle dentro de una de las siguientes secuencias:

- (i) SEQ ID NO. 77, para virus de la encefalitis de San Luis;
- (ii) SEQ ID NO. 78, para virus de la encefalitis japonesa;
- (iii) SEQ ID NO. 79, para un virus de la encefalitis del Valle de Murray;
- (iv) SEQ ID NO. 80, para un virus de la fiebre del Nilo occidental;
- (v) SEQ ID NO. 81, para un virus de la fiebre amarilla;
- (vi) SEQ ID NO. 82, para un virus de dengue de Tipo-2;
- (vii) SEQ ID NO. 83, para un virus de la Hepatitis C;
- (viii) SEQ ID NO. 84, para un virus de la encefalitis transmitida por garrapatas;
- (ix) SEQ ID NO. 85, para virus de la fiebre hemorrágica de Omsk; y
- (x) SEQ ID NO. 86, para virus de Powassan.

Las secuencias de dirección ejemplares para estos virus incluyen las siguientes secuencias, o partes de estas secuencias que solapan con una o más regiones de estructura secundaria de doble cadena en la secuencia diana asociada:

- (i) SEQ ID NO. 87 y 88, para virus de encefalitis de San Luis;
- (ii) SEQ ID NO. 89 y 90, para virus de la encefalitis japonesa;
- (iii) SEQ ID NO. 91 y 92, para un virus de una encefalitis del Valle de Murray;
- (iv) SEQ ID NO. 93 y 94, para un virus de la fiebre del Nilo occidental;
- (v) SEQ ID NO. 95 y 96, para un virus de la fiebre amarilla;
- (vi) SEQ ID NO. 97, 98, para un virus de dengue;
- (vii) SEQ ID NO. 99 y 100, para un virus de la Hepatitis C;

- (viii) SEQ ID NO. 101 y 102, para un virus de la encefalitis transmitida por garrapatas;
- (ix) SEQ ID NO. 103 y 104, para un virus de la fiebre hemorrágica de Omsk; y
- (x) SEQ ID NO. 105 y 106, para un virus de Powassan.

5 Para el tratamiento de un *Enterovirus*, *Rhinovirus*; *Hepatovirus* o *Aphthovirus*, la secuencia de dirección es complementaria de una región asociada con estructura secundaria de tallo-bucle dentro de una de las siguientes secuencias:

- (i) SEQ ID NO. 107, para un virus de la polio de las cepas Mahoney y Sabin;
- 10 (ii) SEQ ID NO. 108, para un enterovirus humano A;
- (iii) SEQ ID NO. 109, para un enterovirus humano B;
- (iv) SEQ ID NO. 110, para un enterovirus humano C;
- (v) SEQ ID NO. 111, para un enterovirus humano D;
- (vi) SEQ ID NO. 112, para un enterovirus humano E;
- 15 (vii) SEQ ID NO. 113, para un enterovirus bovino;
- (viii) SEQ ID NO. 114, para rinovirus humano 89;
- (ix) SEQ. ID NO. 115, para rinovirus humano B;
- (x) SEQ ID NO. 116, para virus de la glosopeda; y
- 20 (xi) SEQ ID NO. 117, para un virus de la hepatitis A.

Las secuencias de dirección ejemplares para estos virus incluyen las siguientes secuencias, o parte de estas secuencias que solapan con una o más regiones de estructura secundaria de doble cadena en la secuencia diana asociada:

- (i) SEQ ID NO. 118 y 119, para un virus de la polio de las cepas Mahoney y Sabin;
- (ii) SEQ ID NO. 120 y 121, para un enterovirus humano A;
- (iii) SEQ ID NO. 122 y 123, para un enterovirus humano B;
- (iv) SEQ ID NO. 124 y 125, para un enterovirus humano C;
- (v) SEQ ID NO. 126 y 127, para un enterovirus humano D;
- 30 (vi) SEQ ID NO. 128 y 129, para un enterovirus humano E;
- (vii) SEQ ID NO. 130 y 131, para un enterovirus bovino;
- (viii) SEQ ID NO. 132 y 133, para rinovirus humano 89;
- (ix) SEQ ID NO. 134 y 135, para rinovirus humano B;
- (x) SEQ ID NO. 136 y 137, para virus de glosopeda; y
- 35 (xi) SEQ ID NO. 138 y 139, para un virus de la hepatitis A.

Para el tratamiento de un calicivirus o *Norovirus*, la secuencia de dirección es complementaria de una región asociada con estructura secundaria de tallo-bucle dentro de una de las siguientes secuencias:

- (i) SEQ ID NO. 140, para un calicivirus felino;
- (ii) SEQ ID NO. 141, para un calicivirus canino;
- (iii) SEQ ID NO. 142, para un calicivirus entérico porcino;
- (iv) SEQ ID NO. 143, para la cepa de calicivirus NB; y
- 45 (v) SEQ ID NO. 144, para un virus de Norwalk.

Las secuencias de dirección ejemplares para estos virus incluyen las siguientes secuencias, o parte de estas secuencias que solapan con una o más regiones de estructura secundaria de doble cadena en la secuencia diana asociada:

- (i) SEQ ID NO. 145 y 146, para un calicivirus felino;
- (ii) SEQ ID NO. 147 y 148, para un calicivirus canino;
- (iii) SEQ ID NO. 149 y 150, para un calicivirus entérico porcino;
- (iv) SEQ ID NO. 151 y 152, para la cepa de calicivirus NB; y
- 55 (v) SEQ ID NO. 153 y 154, para un virus de Norwalk.

Para el tratamiento del *Hepevirus*, virus de la Hepatitis E, la secuencia de dirección es complementaria de una región asociada con estructura secundaria de tallo-bucle dentro de la secuencia identificada como SEQ ID NO: 155. Las secuencias de dirección ejemplares incluyen SEQ ID NO: 156 y 157, o partes de las mismas que solapan con una o más regiones de estructura secundaria en la secuencia diana asociada.

60 Para el tratamiento de un *Rubivirus* o *Alphavirus*, la secuencia de dirección es complementaria de una región asociada con estructura secundaria de tallo-bucle dentro de una de las siguientes secuencias:

- (i) SEQ ID NO. 158, para virus de la rubeola;
- 65 (ii) SEQ ID NO. 159, para virus de la encefalitis equina oriental;
- (iii) SEQ ID NO. 160, para virus de la encefalitis equina occidental; y

(iv) SEQ ID NO. 161, para virus de la encefalitis equina Venezolana.

Las secuencias de dirección ejemplares para cada uno de estos virus se identifican por los siguientes números de ID de secuencia, o partes de estas secuencias que solapan con una o más regiones de estructura secundaria de doble cadena en la secuencia diana asociada:

- (i) SEQ ID NO. 162 y 163, para virus de la rubeola;
- (ii) SEQ ID NO. 164 y 165, para virus de la encefalitis equina oriental;
- (iii) SEQ ID NO. 166 y 167, para virus de la encefalitis equina occidental; y
- (iv) SEQ ID NO. 168 y 169, para virus de la encefalitis equina Venezolana.

Para el tratamiento de un *Coronavirus* o *Arterivirus*, la secuencia de dirección es complementaria de una región asociada con estructura secundaria de tallo-bucle dentro de una de las siguientes secuencias:

- (i) SEQ ED NO. 170, para coronavirus de SARS TOR2;
- (ii) SEQ ID NO. 171, para virus de la diarrea epidémica porcina;
- (iii) SEQ ID NO. 172, para virus de la gastroenteritis transmisible;
- (iv) SEQ ID NO. 173, para coronavirus bovino;
- (v) SEQ ID NO. 174, para coronavirus humano 229E;
- (vi) SEQ ID NO. 175, para virus de la hepatitis murina; y
- (vii) SEQ ID NO. 176, para virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino.

Las secuencias de dirección ejemplares para cada uno de estos virus se identifican por los siguientes números de ID de secuencia, o parte de estas secuencias que solapan con una o más regiones de estructura secundaria de doble cadena en la secuencia diana asociada:

- (i) SEQ ID NO. 177 y 178, para coronavirus de SARS TOR2;
- (ii) SEQ ID NO. 179 y 180, para virus de la diarrea epidémica porcina;
- (iii) SEQ ID NO. 181 y 182, para virus de la gastroenteritis transmisible;
- (iv) SEQ ID NO. 183 y 184, para coronavirus bovino;
- (v) SEQ ID NO. 185 y 186, para coronavirus humano 229E;
- (vi) SEQ ID NO. 187 y 188, para virus de la hepatitis murina; y
- (vii) SEQ ID NO. 189 y 190, para virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino.

Para tratamiento de un *Mamastrovirus*, *Astrovirus* humano, la secuencia de dirección es complementaria de una región asociada con estructura secundaria de tallo-bucle dentro de la secuencia identificada como SEQ ID NO: 191. Son secuencias de dirección ejemplares SEQ ID NO. 193 y 194, o partes de estas secuencias que solapan con una o más regiones de estructura secundaria de doble cadena en la secuencia diana asociada.

Para el tratamiento de un virus de la arteritis Equina, la secuencia de dirección es complementaria de una región asociada con estructura secundaria de tallo-bucle dentro de la secuencia identificada como SEQ ID NO: 192. Son secuencias de dirección ejemplares SEQ ID NO. 195, 196, o partes de estas secuencias que solapan con una o más regiones de la estructura secundaria de doble cadena en la secuencia diana asociada.

B2. Dirección de la Primera ORF de Virus de ARNmc

Una segunda clase de compuestos antivíricos antisentido ejemplares para uso en la inhibición del crecimiento de virus de las familias de picornavirus, calicivirus, togavirus, coronavirus y flavivirus que tienen un genoma con sentido positivo, monocatenario, de menos de 12 kb y una primera fase abierta de lectura que codifica una poliproteína que contiene múltiples proteínas funcionales. En realizaciones particulares, el virus es un virus de ARN de la familia de coronavirus o un virus del Nilo occidental, de la fiebre amarilla o del dengue de la familia de flavivirus. Los compuestos inhibidores consisten en oligómeros antisentido con enlaces catiónicos intercalados, como se describe en el presente documento, que tienen una secuencia de bases de dirección que es sustancialmente complementaria de una secuencia diana vírica que abarca el sitio de inicio AUG de la primera fase abierta de lectura del genoma vírico. En una realización del método, los oligómeros se administran a un sujeto mamífero infectado con el virus. Véase, por ejemplo, Publicación de PCT N.º WO/2005/007805 y Publicación de Solicitud de Estados Unidos N.º 2003224353.

Los compuestos antivíricos ejemplares dirigidos contra un picornavirus incluyen los que tienen una secuencia de dirección que tiene al menos 90 % de homología con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: (i) SEQ ID NO. 62, para un virus de la polio de las cepas de Mahoney y Sabin, (ii) SEQ ID NO. 63, para un virus de la hepatitis A, (iii) SEQ ID NO. 64, para un rinovirus 14, (iv) SEQ ID NO. 65, para un rinovirus 16, y (v) SEQ ID NO. 66, para un rinovirus 1B.

Los compuestos antivíricos ejemplares dirigidos contra un calicivirus incluyen los que tienen una secuencia de dirección que tiene al menos un 90 % de homología con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: (i)

SEQ ID NO. 67, 68, y 69, para un vesivirus de serotipo Pan-1, (ii) SEQ ID NO. 70, para un calicivirus porcino, (iii) SEQ ID NO. 71, para un virus de Norwalk, y (iv) SEQ ID NO. 72, para un calicivirus felino.

5 Para uso en la inhibición de un flavivirus de la hepatitis C, la secuencia de dirección es complementaria de una secuencia de al menos 12 bases contiguas de la región del sitio de inicio AUG del VHC identificada por SEQ ID NO: 75. Las secuencias de dirección ejemplares incluyen las que tienen al menos 90 % de homología con SEQ ID NO. 18 o 76.

10 Los compuestos antivíricos ejemplares dirigidos contra un togavirus incluyen los que tienen una secuencia de dirección que tiene al menos 90 % de homología con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 73 y 74, para virus de la hepatitis E.

15 La secuencia diana preferida es una región que abarca el sitio de inicio AUG de la primera fase abierta de lectura (ORF1) de los genomas víricos. La primera ORF generalmente codifica una poliproteína que contiene proteínas no estructurales tales como polimerasas, helicasas y proteasas. Por "abarca el sitio de inicio AUG" se entiende que la secuencia diana incluye al menos tres bases en un lado del sitio de inicio AUG y al menos dos bases en el otro (un total de al menos 8 bases). Preferentemente, incluye al menos cuatro bases en cada lado de sitio de inicio (un total de al menos 11 bases).

20 Más en general, los sitios diana preferidos incluyen dianas que están conservadas entre una diversidad de aislados víricos. Otros sitios favorecidos incluyen el IRES (sitio de entrada de ribosoma interno), sitios de unión a proteína de transactivación, y sitios de inicio de la replicación. Los genomas víricos complejos y grandes, que pueden proporcionar múltiples genes redundantes, pueden ser dianas eficaces por dirección a genes celulares hospedadores que codifican la entrada vírica y la respuesta del hospedador a la presencia vírica.

25 Está disponible una diversidad de secuencias de genoma vírico de fuentes bien conocidas, tales como las bases de datos de Genbank del NCBI. El sitio de inicio AUG de ORF1 también puede identificarse en la base de datos de genes o en la referencia utilizada, o puede encontrarse explorando la secuencia con respecto a un codón AUG en la región del sitio de inicio de ORF1 esperado.

30 La organización genómica general de cada una de las cuatro familias de virus se proporciona a continuación, seguida de secuencias diana ejemplares obtenidas para miembros seleccionados (géneros, especies o cepas) dentro de cada familia.

35 Picornavirus. Típico del picornavirus, el genoma de rinovirus es una única molécula de ARN poliadenilado, con sentido positivo, monocatenario, de aproximadamente 7,5 kb. El genoma incluye una UTR larga, que se localiza cadena arriba de la primera poliproteína, y una única fase abierta de lectura (ORF) que tiene una proteína VPg (unida a genoma vírico) unida covalentemente con su extremo. La ORF se subdivide en dos segmentos, cada uno de los cuales codifica una poliproteína. El primer segmento codifica una poliproteína que se escinde posteriormente para formar proteínas víricas, VP1 a VP4, y el segundo segmento codifica una poliproteína que se es el precursor de proteínas víricas que incluye una Cis-pro, una proteasa y una polimerasa. La ORF termina en una secuencia de terminación de poliA.

45 El sitio de inicio AUG inicial diana se localiza entre las posiciones de bases 615-640; la dirección a estas regiones es eficaz para inhibir la traducción de ambos segmentos de poliproteínas.

50 Calicivirus. El genoma de un vesivirus, de la familia Calicivirus, es una única molécula de ARN con sentido positivo, monocatenario, infeccioso, de aproximadamente 7,5 kb. El genoma incluye una UTR de cadena arriba de la primera fase abierta de lectura (ORF1) que no está modificada. El extremo 3' del genoma está poliadenilado. El genoma incluye tres fases abiertas de lectura. La primera fase abierta de lectura codifica una poliproteína, que se escinde posteriormente para formar las proteínas no estructurales víricas incluyendo una helicasa, una proteasa, una ARN polimerasa dependiente de ARN, y "VPg", una proteína que se une al extremo 5' del ARN genómico vírico. La segunda fase abierta de lectura codifica la proteína de cápside individual y la tercera fase abierta de lectura codifica lo que se ha indicado que es una proteína estructural que es básica en la naturaleza y probablemente capaz de asociarse con el ARN.

55 El sitio de inicio AUG inicial diana se localiza entre las posiciones de bases 7-35; la dirección a esta región es eficaz para inhibir la traducción de la primera fase de lectura.

60 Togavirus. El genoma de un virus de la rubeola, de la familia Togavirus, es una única molécula lineal de ARN con sentido positivo, monocatenario, de aproximadamente 11,7 kb, que es infeccioso. El extremo 5' está recubierto con una molécula 7-metilG y el extremo 3' está poliadenilado. Se han demostrado ARN mensajeros de longitud completa y subgenómicos y se produce escisión postraduccional de poliproteínas durante la replicación del ARN. El genoma incluye dos fases abiertas de lectura. La primera fase abierta de lectura codifica una poliproteína que se escinde posteriormente en cuatro proteínas funcionales, risP1 a nsP4. La segunda fase abierta de lectura codifica la proteína de la cápsida vírica y otras tres proteínas víricas, PE2, 6K y E1.

65

El sitio de inicio AUG para la primera fase abierta de lectura se localiza entre las posiciones de bases 10-40; la dirección a esta región es eficaz para inhibir la traducción de la primera fase abierta de lectura.

5 Flavivirus. El genoma del virus de la hepatitis C es una única molécula lineal de ARN con sentido positivo, monocatenario, de aproximadamente 11 kb. El extremo 5' está recubierto con una molécula GppAmp m⁷, y el extremo 3' no está poliadenilado. El genoma incluye solamente una fase abierta de lectura, que codifica una poliproteína precursora separable en seis proteínas estructurales y funcionales. El sitio de inicio AUG inicial se localiza en la posición de base 343.

10 Se enumeran referencias de GenBank para secuencias de ácido nucleico víricas ejemplares que contienen el sitio de inicio de ORF1 en los genomas víricos correspondientes en la Tabla 3, a continuación. Se apreciará que estas secuencias son solamente ilustrativas de otras secuencias en la región del sitio de inicio de ORF1 de miembros de las cuatro familias de virus, como puede estar disponible de bases de datos de secuencias de genes disponibles de la bibliografía o las fuentes de patentes.

15 Se seleccionan secuencias de dirección dirigidas contra una región diana que abarca el sitio de inicio de la traducción de la primera fase abierta de lectura (ORF1) construyendo una secuencia complementaria de una o más secuencias que abarcan el sitio AUG en estas regiones diana; véase Tabla 3 a continuación.

20 Tabla 3. Secuencias antisentido ejemplares que se dirigen a la región de inicio de la traducción de ORF1

Virus	N.º de referencia de GenBank	Región diana	Oligómero antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO.
Picornaviridae				
Poliovirus Cepa de Mahoney Cepa de Sabin	NC002058 V01150	735-755 735-755	CCTGAGCACCC ATT TATGATAC	62
Hepatitis A	M14707	731-754	CCTTGTCTAG AC ATGTT CATT ATT	63
Rinovirus 14	NC001490	621-640	CTGAGCGCCC AT GATCACAG	64
Rinovirus 16	NC001752	618-637	TTGAGCGCCC AT GATAACAA	65
Rinovirus 1B	D00239	615-634	CTGGGCACCC AT GATGCCAA	66
Caliciviridae				
Vesivirus (Pan-1)	AF0911736	7-26	GAGCC AT AGCTCAAATTCTC	67
		1-21	TAGCTCAAATTCT CATT TAC	68
		15-34	GAGCGTTTGAGCC AT AGCTC	69
Porcino	AF182760	6-25	GACGGCAATTAGCC AT CACG	70
Norwalk	AF093797	1-19	CGACGCCATCAT CATT CAC	71
Felino	AF479590	14-34	CAGAGTTTGAG ACATT GTCTC	72
Togaviridae				
Hepatitis E	NC001434	6-28	CCTTAATAAACTGATGGGCCTCC	73
		1-18	CTGATGGGCCTCC AT GGC	74
Flaviviridae				
Hepatitis C	AF169005	348-330	GTGCT CAT GGTGCACGGTC-3	18
			GGCCTTTCGCGACCCAACAC	76

B3. Dirección al Virus de la Gripe

25 Una tercera clase de compuestos antivíricos antisentido ejemplares se usan en la inhibición del crecimiento de virus de la familia Ortomixoviridae y en el tratamiento de una infección vírica. La célula hospedadora se pone en contacto con un oligómero como se describe en el presente documento, que contiene al menos un enlace intersubunitario catiónico, y preferentemente que contiene 20 % a 50 % de dichos enlaces catiónicos, y que contiene una secuencia de bases eficaz para hibridar con una región diana seleccionada de las siguientes: i) las 25 bases 5' o 3' terminales de un segmento de ARN vírico con sentido negativo de virus de la gripe A, virus de la gripe B y virus de la gripe C, ii)

las 30 bases terminales del extremo 3' terminal de un ARNc con sentido positivo de virus de la gripe A, virus de la gripe B y virus de la gripe C, y iii) las 50 bases que rodean el codón de inicio AUG de un ARNm vírico de la gripe. (Véase, por ejemplo, Publicación de PCT N.º WO/2006/047683 o Publicación de solicitud de Estados Unidos N.º 20070004661.)

5 Los compuestos son particularmente útiles en el tratamiento de infección por virus de la gripe en un mamífero. El oligómero puede administrarse a un sujeto mamífero infectado con el virus de la gripe, o en riesgo de infección con el virus de la gripe.

10 Para tratamiento de virus de la gripe A, la secuencia de dirección híbrida con una región asociada con una del grupo de secuencias identificadas como SEQ ID NO: 221-222. Son secuencias de dirección preferidas las complementarias de la diana de cadena menos de SEQ ID NO: 222 o la diana de cadena positiva de SEQ ID NO: 221. Se enumeran oligómeros antisentido ejemplares que se dirigen a estas dos regiones como SEQ ID NO: 223 y 224, respectivamente.

15 Estas secuencias se dirigirán a la mayoría, si no todas, de cepas del virus de la gripe A debido al alto grado de homología entre cepas en las dianas respectivas.

20 La Tabla 4 a continuación muestra secuencias de dirección ejemplares, en una orientación de 5' a 3' que son complementarias del virus de la gripe A. Las secuencias enumeradas proporcionan una colección de secuencias de dirección a partir de las que pueden seleccionarse secuencias de dirección, de acuerdo con las normas de clase generales analizadas anteriormente.

Tabla 4. Secuencias oligoméricas antisentido ejemplares para dirigirse a gripe A

PMO	Nucleótidos diana	N.º de referencia de GenBank	Oligómero antisentido de dirección (5' a 3')	SEQ NO.
PB1-AUG	13-33	J02151	GACATCCATTCAAATGGTTTG	224
(-)NP-3'trm	1-22	J02147	AGCAAAGCAG GGTAGATAAT C	223

25 **B4. Dirección a Virus de la familia de Picornaviridae**

Se usa una cuarta clase de compuestos antivíricos antisentido ejemplares en la inhibición del crecimiento de virus de la familia Picornaviridae y en el tratamiento de una infección vírica. Los compuestos son particularmente útiles en el tratamiento de infección por *Enterovirus* y/o *Rhinovirus* en un mamífero. Los compuestos antivíricos antisentido son oligómeros morfolino con carga parcial positiva que tienen una secuencia de 12-40 subunidades, incluyendo al menos 12 subunidades que tienen una secuencia de dirección que es complementaria de una región asociada con secuencias de ARN vírico dentro de una de dos regiones de 32 nucleótidos conservados de la región no traducida 5' vírica identificada por SEQ ID NO: 55 y 56. (Véase, por ejemplo, Publicaciones de PCT N.º WO/2007/030576 y WO/2007/030691 o solicitudes provisionales relacionadas y del mismo propietario que la presente N.º de serie 60/800.120 y 60/800.145).

Se enumeran entradas de referencia de GenBank para secuencias de ácido nucleico víricas ejemplares que representan ARN genómico de picornavirus en la Tabla 5 a continuación. Esta tabla enumera regiones diana para una secuencia de 32 bases correspondiente a los nucleótidos 443-474 de la secuencia de referencia de poliovirus (NC 002058) y contenida en la región 5' UTR de varios picornavirus. Todos los virus enumerados en la Tabla 2 son aislados humanos y se organizan en los géneros *Enterovirus* y *Rhinovirus* como Enterovirus Humanos A-D, Poliovirus, Rinovirus A y Rinovirus B de acuerdo con la convención como proporciona el Comité Internacional sobre Taxonomía de Virus (ICTV).

Existe un alto grado de conservación de secuencias entre virus en los dos géneros, *Enterovirus* y *Rhinovirus*. La secuencia diana identificada como SEQ ID NO: 56 (TCCTCCGCC CCTGAATGYG GCTAAYCYA AC) representa una secuencia diana combinada, en la que la letra "Y" en la secuencia representa una base de pirimidina, es decir, puede ser C o T.

Tabla 5. Secuencias Diana de Ácido Nucleico de Picornavirus Humanas Ejemplares: Región 5'

Virus	Ref. N.º	GB N.º	Región
Poliovirus cepa Mahoney	NC 002058	V01149	443-474
Enterovirus A (CV-A16)	NC 001612	U05876	452-483
Enterovirus 71 (HEV-71)		U22521	448-479
Enterovirus B (CV-B1)	NC 001472	M16560	446-477

ES 2 645 410 T3

Virus	Ref. N.º	GB N.º	Región
Coxsackievirus B3 (CV-B3)		M88483	447-478
Coxsackievirus B2 (CV-B2)		AF081485	448-479
Coxsackievirus B4 (CV-B4)		X05690	448-479
Coxsackievirus B5 (CV-B5)		X67706	448-479
Coxsackievirus A9 (CV-A9)		D00627	448-479
Echovirus 4 (EV-4)		X89534	331-362
Echovirus 6 (EV-6)		U16283	446-477
Echovirus 11 (EV-11)		X80059	449-480
Echovirus 13 (EV-13)		AF412361	259-290
Echovirus 18 (EV-18)		AF412366	259-290
Echovirus 25 (EV-25)		AY302549	466-477
Enterovirus C (CV-A21)	NC 001428	D00538	441-472
Enterovirus D (HEV-70)	NC 001430	D00820	446-477
Rinovirus A (HRV-89)	NC 001617	M16248	442-473
Rinovirus B (HRV-14)	NC 001490	K02121	453-484
Rinovirus B (HRV-14)	NC 001490	K02121	453-484

La Tabla 6 a continuación muestra secuencias de dirección ejemplares que son complementarias de un amplio espectro de Picornavirus, específicamente miembros de los géneros *Enterovirus* y *Rhinovirus*.

5

Tabla 6. Secuencia de Dirección de Oligómeros Antisentido Ejemplares

Nombre	Nucleótidos diana	N.º de referencia de GenBank	Oligómero antisentido de dirección (5' a 3')	SEQ. ID NO.
5'-32	443-474		GTTGGGRTRGCCGCATTCAGGGGCCGGAGGA	234
PV444	444-463	V00149	CGCATTTCAGGGGCCGGAGG	235
PV449	449-470	V00149	GGATTAGCCGCATTCAGGGGCC	236
PV454	454-474	V00149	GTTGGGATTAGCCGCATTCAG	237

La Tabla 7 enumera regiones diana para una segunda secuencia de 32 bases de la secuencia de referencia de poliovirus (NC 002058) y contenida en la región 5' UTR de varios picornavirus. La secuencia diana identificada como SEQ ID NO: 55 (RYG- GRACCRA CTACTTTGGG TGTCCGTGTT TC) representa una secuencia diana combinada, donde las posiciones indicadas por la letra "R" pueden ser A o G, y la posición indicada por la letra "Y" puede ser C o T en estas regiones diana.

10

Tabla 7. Secuencias diana de ácido nucleico de picornavirus humano ejemplares; región 3'

Virus	Ref. N.º	GB N.º	Región
Poliovirus-cepa de Mahoney	NC 002058	V01149	531-562
Enterovirus A (CV-A16)	NC 001612	U05876	540-571
Enterovirus 71 (HEV-71)		U22521	536-567
Enterovirus B (CV-B1)	NC 001472	M16560	534-565
Coxsackievirus B3 (CV-B3)		M88483	535-566
Coxsackievirus B2 (CV-B2)		AF081485	536-567

Virus	Ref. N.º	GB N.º	Región
Coxsackievirus B4 (CV-B4)		AF311939	537-568
Coxsackievirus B5 (CV-B5)		X67706	536-567
Coxsackievirus A9 (CV-A9)		D00627	536-567
Echovirus 4 (EV-4)		X89534	419-450
Echovirus 6 (EV-6)		U16283	534-565
Echovirus 9 (EV-9)		X92886	533-564
Echovirus 11 (EV-11)		X80059	537-568
Echovirus 13 (EV-13)		AY302539	535-566
Echovirus 18 (EV-18)		AF521513	94-125
Echovirus 25 (EV-25)		X90722	534-565
Echovirus 30 (EV-30)		AF311938	537-568
Enterovirus C (CV-A21)	NC 001428	D00538	529-560
Enterovirus D (HEV-70)	NC 001430	D00820	534-565
Rinovirus A (HRV-89)	NC 001617	M16248	530-561
Rinovirus B (HRV-14)	NC 001490	K02121	541-572

Se enumeran en la Tabla 8 secuencias de dirección diseñadas para hibridar con estas regiones diana.

Tabla 8. Secuencias de dirección de oligómero antisentido ejemplares.

Nombre	Nucleótidos diana	N.º de referencia de GenBank	Oligómero antisentido de dirección (5' a 3')	SEQ. ID NO.
3'-37	526-562	V00149	AAAANGAAACACGGACACCCAAAGTAGTCGGTCCG C	238
PV533	533-552	V00149	CACCCAAAGTAGTCGGTTCC	239
PV539	539-558	V00149	CACGGACACCCAAAGTAGTC	240
PV544	544-562	V00149	GGAAACACGGACACCCAAAG	241
PV548	548-567	V00149	AAAAGGAAACACGGACACCC	242
CVB3-548	548-568	M88483	ATGAAACACGGACACCCAAAG	243
EnteroX	541-562	V00149	GAAACACGGACACCCAAAGTAG	244
HRV14-IRES	551-574	K02121	GAGAAACACGGACACCCAAAGTAG	245

5

B5. Dirección a virus de la familia de Flavivirus

Una quinta clase de compuestos antivíricos antisentido ejemplares se usan en la inhibición de la replicación de un flavivirus en células animales. Un oligómero antisentido ejemplar de esta clase es un oligómero morfolino con enlaces catiónicos, como se describe en la presente invención, de entre 8 y 40 bases nucleotídicas de longitud y que tienen una secuencia de al menos 8 bases complementarias de una región del genoma de ARN de cadena positiva del virus que incluye al menos una parte de SEQ ID NO: 57. Véase, por ejemplo, Publicación de solicitud de Estados Unidos N.º 20050096291.

Las secuencias diana son las adyacentes a y que incluyen al menos una parte, por ejemplo, al menos 2-8 bases, de la secuencia de ciclación 5' (5'-CS) o secuencias 3'-CS del ARN flavivírico de cadena positiva. Una diana altamente preferida es la 3'-CS. Se enumeran referencias de GenBank para secuencias de ácido nucleico víricas ejemplares que contienen las secuencias terminales de extremo 5'-CS y 3'-CS en los genomas víricos correspondientes en la Tabla 1 posterior. Las regiones conservadas de 5'-CS y 3'-CS se muestran en negrita en la Tabla 9. Otro grupo de secuencias diana ejemplares son los complementos de SEQ ID NO: 267-277.

20

Se obtienen secuencias de dirección dirigidas contra las 5'-CS y 3'-CS para virus seleccionados del género flavivirus de secuencias complementarias y antiparalelas a las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 267-277 a continuación.

5

Tabla 9. Secuencias diana 5'-CS y 3'-CS ejemplares

Virus	N.º de referencia de GenBank	Nucleótidos diana de 5'-CS	SEQ ID NO.	Secuencia diana (5' a 3')
Encefalitis de San Luis Encefalitis del Valle de Murray Nilo occidental Kunjin	M16614 AF161266 M12294 D00246	138 - 157 136 - 154 135 - 155 115 - 134	267	GUCAUAUAGCUA AAACGCGG
Encefalitis japonesa	M18370	135 - 154	268	AUCAUAUAGCUG AAACGCGG •
Fiebre amarilla	X03700	155 - 174	269	GUCAUAUAGGUA CGACGAGG
Dengue - Tipo 1 Dengue - Tipo 2 Dengue - Tipo 4	M87512 M19197 M14931	115 - 135 131 - 151 133 - 153	270	CUUUCAAUAUGC UGAAACGCG
Dengue - Tipo 3	M93130	129 - 149	271	CUAUCAAUAUGC UGAAACGCG
Encefalitis transmitida por garrapatas Powassen Louping III Enfermedad del bosque de Kyasanur Alkhurma	U27495 L06436 Y07863 X74111 AF331718	108 - 129 81 - 102 105 - 126 94 - 115 90 - 111	272	CAGCUUAGGAGA ACAAGAGCUG
Nilo occidental	M12294	132 - 151	273	GGCUGUCAUAU GCUAAAAC
Encefalitis de San Luis Encefalitis japonesa Encefalitis del Valle de Murray Nilo occidental Kunjin	M18370 AF161266 M12294 AY274505	10861-10882 10899-10920 10853-10874 10914-10934	274	AACAGCAUAUUG ACACCUGGGA
Fiebre amarilla	X03700	10745-10767	275	UGGGACCAUAUU GACGCCAGGGA
Dengue - Tipo 1 Dengue - Tipo 2 Dengue - Tipo 3 Dengue - Tipo 4	M87512 M19197 M93130 M14931	10609-10630 10595-10616 10588-10609 10540-10561	276	AAACAGCAUAUtr GACGCUGGGA
Encefalitis transmitida por garrapatas Powassen Louping III	U27495 L06436 Y07863	11057-11078 10755-10776 10787-10808	277	CGGUUCUUGUUC UCCUGAGCC

B6. Dirección a Virus de la familia de Nidovirus

10 Se usa una sexta clase de compuestos antivíricos antisentido ejemplares en la inhibición de la replicación de un nidovirus en células de animales infectadas por virus. Un oligómero antisentido ejemplar de esta clase es un oligómero morfolino con enlaces catiónicos, como se describe en la presente invención, que contiene entre 8-25 bases nucleotídicas, y tiene una secuencia capaz de alterar la formación de pares de bases entre las secuencias reguladoras de la transcripción en la región líder 5' del genoma vírico de cadena positiva y la región subgenómica 3' de cadena negativa (Véase, por ejemplo, Publicación de PCT N.º WO/2005/065268 o Publicación de solicitud de Estados Unidos N.º 20070037763).

15

Se enumeran Nidovirus representativos en la Tabla 10, a continuación. El término "Nidovirus" se refiere a virus del orden Nidovirales que incluye las familias Coronaviridae y Arteriviridae. El término "coronavirus" se usa en el presente documento para incluir todos los miembros de la familia Coronaviridae incluyendo virus de los géneros Coronavirus y Torovirus. El término "arterivirus" incluye miembros de la familia Arteriviridae que incluye el género *Arterivirus*.

5

Tabla 10. Nidovirus representativos

Nombre del virus	Abreviatura
Coronavirus canino	CCoV
Coronavirus felino	FCoV
Coronavirus humano 229E	HCoV-229E
Virus de la diarrea epidémica porcina	PEDV
Virus de la gastroenteritis transmisible	TGEV
Coronavirus respiratorio porcino	PRCV
Coronavirus bovino	BCoV
Coronavirus humano OC43	HCoV-OC43
Virus de la hepatitis murina	MHV
Coronavirus de rata	RCV
Virus de la bronquitis infecciosa	IBV
Coronavirus de pavo	TCoV
Coronavirus de conejo	RbCoV
Coronavirus de SARS	SARS-CoV
Torovirus Humano	HuTV
Virus de la arteritis equina	EAV
Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino	PRRSV
Virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina	PHEV
Virus de la fiebre hemorrágica de simio	SHFV

Las secuencias diana preferidas son las secuencias de nucleótidos adyacentes y que incluyen al menos una parte, por ejemplo, al menos 2-8 bases, de la TRS líder del ARN positivo o la TRS de cuerpo de cadena menos de ARN de nidovirus. Están disponibles una diversidad de secuencias genómicas de Nidovirus de fuentes bien conocidas, tales como las bases de datos de Genbank del NCBI. Se enumeran referencias de GenBank para secuencias de ácido nucleico víricas ejemplares que contienen la TRS líder en los genomas víricos correspondientes en la Tabla 11 a continuación; los nucleótidos en negrita identifican la TRS líder central.

10

15

Tabla 11. Secuencias Diana de TRS Ejemplares

Virus	N.º de referencia de GenBank	TRS líder	SEQ ID NO.	Secuencia diana (5' a 3')
HCoV-229E	AF304460	55-78	207	CUACUUUUUCU CAACUAA CGAAAU
HCoV-OC43	AY391777	51-74	208	GAUCUUUUUGU AUCUAA ACUUUA
SARS-CoV	AY274119	53-76	209	GAUCUGUUCUCU AAACGA ACUUUA

Las secuencias de dirección ejemplares dirigidas contra la TRS líder para Nidovirus seleccionados incluyen SEQ ID NO: 210-214.

20

Más en general, las secuencias de dirección ejemplares incluyen una secuencia de al menos 8 bases complementarias de una región de la cadena negativa del virus o, como alternativa, genoma de ARN de cadena positiva, que incluye al menos una parte de la TRS líder de cadena negativa del genoma, o TRS líder de cadena positiva, respectivamente. La secuencia de dirección contiene un número suficiente de bases en las TRS para alterar la formación de pares de bases entre las secuencias de TRS líder y de cuerpo del virus. El número de

25

secuencias de dirección necesarias para alterar esta estructura es preferentemente de al menos 2-4 bases complementarias de la TRS líder del núcleo o del cuerpo (mostrada en negrita en la Tabla 2), más bases complementarias de bases de secuencia diana adyacentes.

5 B7. Dirección a VIH-1

10 En un método para inhibir de forma selectiva la replicación de VIH-1 en células hematopoyéticas humanas infectadas por VIH, activadas, por ejemplo, macrófago o células linfocíticas T, dichas células infectadas por VIH-1 activadas se exponen a un oligómero antisentido como se describe en el presente documento, que tiene al menos un enlace intersubunitario catiónico como se describe en el presente documento y que contiene preferentemente del 20 % al 50 % de dichos enlaces catiónicos, y que tiene una secuencia de bases que es sustancialmente complementaria de una secuencia diana vírica compuesta de al menos 12 bases contiguas en una región de ARN de cadena positiva del VIH-1 identificada por una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 197-199.

15 En una realización, el oligómero es capaz de hibridar con una región de SEQ ID NO: 17, para inhibir la síntesis de la proteína Vif del VIH en las células infectadas. El compuesto en esta realización puede tener al menos 12 bases contiguas de una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 200-203.

20 En otra realización, el oligómero es capaz de hibridar con una región de SEQ ID NO: 198, para inhibir la transcripción de transcritos de ARNm del VIH. El compuesto en esta realización puede tener al menos 12 bases contiguas de las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 204 y 205.

25 En otra realización, el oligómero es capaz de hibridar con una región de SEQ ID NO: 199, para inhibir la transcripción inversa de ARN vírico bloqueando la etapa de transferencia de cadena menos. El compuesto en esta realización puede tener al menos 12 bases contiguas de la secuencia identificada como SEQ ID NO: 206.

B8. Dirección de Filovirus

30 En otra realización, pueden usarse uno o más oligómeros como se describe en el presente documento en un método para inhibir la replicación dentro de una célula hospedadora de un virus del Ébola o virus de Marburg, poniendo en contacto la célula con un oligómero como se describe en el presente documento, que contiene al menos un enlace intersubunitario catiónico, y preferentemente que contiene del 20 % al 50 % de dichos enlaces catiónicos, y que tiene una secuencia de bases de dirección que es complementaria de una secuencia diana compuesta de al menos 12 bases contiguas dentro de una región del sitio de inicio AUG de un ARNm de cadena positiva, como se describe adicionalmente posteriormente.

35 El genoma vírico de filovirus es de aproximadamente 19.000 bases de ARN monocatenario que no está segmentado y en la orientación antisentido. El genoma codifica 7 proteínas de ARNm monocistrónicos complementarios del ARNv.

40 Las secuencias diana son secuencias de ARN de cadena positiva (con sentido) que abarcan o están justo cadena abajo (a una distancia de 25 bases) o cadena arriba (a una distancia de 100 bases) del codón de inicio AUG de proteínas del virus del Ébola seleccionadas o las 30 bases 3' terminales del ARN vírico de la cadena menos. Son dianas proteicas preferidas las subunidades de polimerasa vírica VP35 y VP24, aunque también se contemplan L, nucleoproteínas NP y VP30. Entre estas se favorecen las proteínas tempranas, por ejemplo, se favorece VP35 frente a la polimerasa L expresada más tarde.

45 En otra realización, pueden usarse uno o más oligómeros como se describe en el presente documento en un método para inhibir la replicación dentro de una célula hospedadora de un virus del Ébola o virus de Marburg, poniendo en contacto la célula con un oligómero como se describe en el presente documento, que contiene al menos un enlace intersubunitario catiónico, y que contiene preferentemente del 20 % al 50 % de dichos enlaces catiónicos, y que tiene una secuencia de bases de dirección que es complementaria de una secuencia diana compuesta de al menos 12 bases contiguas dentro de una región de sitio de inicio AUG de un ARNm de cadena positiva identificado por una de las secuencias de ARNm de Filovirus seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 250-255.

50 Para tratar una infección por virus del Ébola, el compuesto puede tener una secuencia de dirección que es complementaria de una secuencia diana compuesta de al menos 12 bases contiguas dentro de la región del sitio de inicio AUG de VP35 identificada por una secuencia diana seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 250. Una secuencia de dirección ejemplar se identifica por SEQ ID NO: 1.

55 En otra realización para tratar una infección por virus del Ébola, el compuesto puede tener una secuencia de dirección que es complementaria de una secuencia diana compuesta de al menos 12 bases contiguas dentro de las regiones de sitio de inicio AUG de VP24 o AUG de L identificadas por una secuencia diana seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 251 y 252, respectivamente. Las secuencias de dirección ejemplares incluyen SEQ ID NO: 5 y 11, respectivamente.

Para tratar una infección por virus de Marburg, el compuesto puede tener una secuencia de dirección que es complementaria de una secuencia diana compuesta de al menos 12 bases contiguas dentro de la región de sitio de inicio AUG de VP35 identificada por una secuencia diana identificada por SEQ ID NO: 253. Una secuencia de dirección ejemplar se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 256 y 257.

En otra realización para tratar una infección por virus de Marburg, el compuesto puede tener una secuencia de dirección que es complementaria de una secuencia diana compuesta de al menos 12 bases contiguas dentro de las regiones de sitio de inicio AUG de VP24 o AUG de L de identificadas por una secuencia diana seleccionada del grupo identificado por SEQ ID NO: 254 y 255, respectivamente. Se identifican secuencias de dirección ejemplares por SEQ ID NO: 258-260.

Los oligómeros desvelados en el presente documento también pueden usarse en un método para tratar una infección por Filovirus del Ébola o de Marburg en el sujeto, administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligómero que tiene una secuencia de dirección como se ha descrito anteriormente; o en un método para vacunar a un sujeto mamífero contra virus del Ébola, pretratando el sujeto con un oligómero como se describe en el presente documento y que tiene una secuencia de dirección como se ha descrito anteriormente, y exponiendo el sujeto al virus del Ébola, preferentemente en una forma atenuada.

Las secuencias de ARN del virus del Ébola (virus del Ébola de Zaire, cepa Mayinga) pueden obtenerse del N.º de Referencia de GenBank AF086833. Las secuencias de dirección particulares mostradas posteriormente se seleccionaron con respecto a su especificidad contra la cepa de virus del Ébola de Zaire. Se determinan fácilmente secuencias correspondientes para Ébola de la Costa de Marfil, Ébola de Sudán y Ébola de Reston (N.º de referencia de GenBank AF52284) a partir de las entradas de GenBank conocidas para estos virus. Se seleccionan preferentemente secuencias de dirección que proporcionan un consenso máximo entre las cepas víricas, particularmente las cepas de Zaire, Costa de Marfil, y Sudán, o desapareamientos de bases que pueden acomodarse por bases ambiguas en la secuencia antisentido, de acuerdo con normas de formación de pares de base bien conocidas.

Se enumeran referencias de GenBank para secuencias de ácido nucleico víricas ejemplares que representan segmentos genómicos de filovirus en la Tabla 12 a continuación. Los números de secuencia de nucleótidos en la Tabla 12 derivan de la referencia de GenBank para el ARN de cadena positiva de Ébola de Zaire (AF086833) y virus de Marburg (Z29337). La Tabla 12 enumera dianas para genes víricos del Ébola ejemplares VP35, VP24 y L. Las secuencias diana para los codones de inicio AUG de estos genes están representadas como SEQ ID NO: 250-252. El conjunto correspondiente de secuencias diana para virus de Marburg se muestra como SEQ ID NO: 253-255.

Tabla 12. Secuencias diana de ácido nucleico de filovirus ejemplares

Nombre	N.º de GenBank	Región de nucleótidos	Secuencia (5' a 3')	SEQ ID NO.
VP35-AUG	AF086833	3029-3153	AAUGAUGAAGAUUAAAACCUUCAUC AUCCUUCGUCACAAUUGAAUUCUCUA GCACCGAAGCUUUAUUGUCUUCAAU GUAAAAGAAAAGCUGGUCUACAAG AUGACAACUAGAACAAGGGCAGGG	250
VP24-AUG	AF086833	10245-10369	CGUJCCAACAAUCGAGCGCAAGGUU UCAAGGUUGAACUGAGAGUGUCUAG ACAACAAAAUUAUUGAUACUCCAGAC ACCAAGCAAGACCUAGAGAAAAAACC AUGGCUAAAAGCUACGGGACGAUACA	251
L-AUG	AF086833	11481-11605	GUAGAUUAAGAAAAAGCCUGAGGA AGAUUAAGAAAAACUGCUUAUUGGG UCUUCCGUGUUUUAUGAUGAAGCAG UUGAAAUUCUCCUCUUGAUUAUUA AUGGCUACACAACAUACCCAAUAC	252

Nombre	N.º de GenBank	Región de nucleótidos	Secuencia (5' a 3')	SEQ ID NO.
VP35-AUG	Z29337	2844-2968	CUAAAAUUCGAAGAAUUAUUAAGGU UUUCUUUAAUUAUCAGAAAAGGUUU UUUAUUCUCUUCUUUCUUUUUGCAA ACAUAUUGAAAUAUUAUUUCACA AUGUGGGACUCAUCAUAUUGCAAC	253
VP24-AUG	Z29337	10105-10229	UUCAUUCAAACACCCCAAUUUUUCA AUCAUACACAUAAUAACCAUUUUAG UAGCGOUACCUUUCAAUJACAAUCUA GGUGAUUGUGAAAAGACUCCAAAC AUGGCAGAAUUAUCAACGCGUUACA	254
L-AUG	Z29337	11379-11503	UCAUUCUCUUCGAUACACGUUAUUAU CUUUAGCAAAGUAAUGAAAUAAGCC UUGUCAUGUUAGACGCCAGUUAUCC AUCUUAAGUGAAUCCUUUCUCAAU AUGCAGCAUCCAACUCAAUUCCUG	255

5 Se diseñan secuencias de dirección para hibridar con una región de la secuencia diana como se enumera en la Tabla 13. Las secuencias de dirección seleccionadas pueden hacerse más cortas, por ejemplo, de 12 bases, o más largas, por ejemplo, de 40 bases, e incluyen un número pequeño de desapareamientos, siempre que la secuencia sea suficientemente complementaria para permitir la hibridación con la diana, y forma con la cadena positiva o la cadena negativa del virus un heterodúplex que tiene una T_m de 45 °C o mayor.

10 La Tabla 13 a continuación muestra secuencias de dirección ejemplares, en una orientación 5' a 3', que se dirigen al virus del Ébola de Zaire (N.º de referencia de GenBank AF086833) de acuerdo con las directrices descritas anteriormente. Pueden seleccionarse secuencias de dirección adicionales, de acuerdo con las normas de clase general analizadas anteriormente.

Tabla 13. Secuencias de oligómero antisentido ejemplares que se dirigen a Ébola Zaire

Nombre	N.º de GenBank diana AF086833	Secuencia 5'-3'	SEQ ID NO
VP35'-AUG	3133-3152	CCTGCCCTTTGTTCTAGTTG	1
VP24-AUG	10331-10349	GCCATGGTTTTTCTCAGG	5
VP24-5'trm	10261-10280	TTCAACCTTGAAACCTTGCG	15

15 La Tabla 14 a continuación muestra secuencias de dirección ejemplares en una orientación 5' a 3', que se dirigen al virus de Marburg (N.º de referencia de GenBank Z29337) de acuerdo con las directrices descritas anteriormente. Pueden seleccionarse secuencias de dirección adicionales, de acuerdo con las normas de clase general analizadas anteriormente.

20 Tabla 14. Secuencias de oligómero antisentido ejemplares que se dirigen a virus de Marburg

Nombre	N.º de GenBank diana Z29337	Secuencia 5'-3'	SEQ ID NO
L-AUG	11467-11485	GCTGCATATTGAAGAAAGG	259
L+7-AUG	11485-11506	CATCAGGATATTGAGTTGGATG	260
VP35-AUG	2932-2952	GTCCCACATTGTGAAAATTAT	256
VP35+7-AUG	2950-2971	CTTGTTGCATATATGATGAGTC	257
VP24+5-AUG	10209-10231	GTTGTAACGCGTTGATAATTCTG	258

B9. Dirección de Arenavirus

25 En otra realización, puede usarse un oligómero como se describe en el presente documento para inhibir la infección vírica en células de mamífero por una especie en la familia Arenaviridae. En un aspecto, los oligómeros pueden usarse en el tratamiento de un sujeto mamífero infectado con el virus.

30 La Tabla 15 es una lista ejemplar de virus diana a los que se dirige la invención organizada por su clasificación de Arenavirus del Viejo Mundo o del Nuevo Mundo.

Tabla 15. Arenavirus diana

Familia	Género	Virus
Arenaviridae	Arenavirus	Arenavirus del Viejo Mundo
		Virus de Lassa (LASV)
		Virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV)
		Virus de Mopeia (MOPV)
		Arenavirus del Nuevo Mundo
		Virus de Guanarito (GTOV)
		Virus de Junin (JUNV)
		Virus de Machupo (MACV)
		Virus de Pichinide (PICV)
		Virus de Pirital (PIRV)
		Virus de Sabia (SABV)
		Virus de Tacaribe (TCRV)
		Virus de Whitewater Arroyo (WWAV)

El genoma de los Arenavirus consiste en dos segmentos de ARN monocatenario designados S (pequeño) y L (grande). En viriones, la relación molar de ARN del segmento S con respecto a L es de aproximadamente 2:1. La secuencia de ARN del segmento S completa se ha determinado para varios arenavirus y varía de 3.366 a 3.535 nucleótidos. La secuencia de ARN del segmento L completa también se ha determinado para varios arenavirus y varía de 7.102 a 7.279 nucleótidos. Las secuencias 3' terminales de los segmentos de ARN S y L son idénticas en 17 de los últimos 19 nucleótidos. Estas secuencias terminales están conservadas entre todos los arenavirus conocidos. Los 19 o 20 nucleótidos 5' terminales al comienzo de cada ARN genómico son imperfectamente complementarios con cada extremo 3' correspondiente. Debido a esta complementariedad, se cree que los extremos 3' y 5' forman pares de bases y forman estructuras de Panhandle.

La replicación del virión infeccioso o ARN vírico (ARNv) para formar una cadena de ARN complementario vírico (ARNcv) antígenómica se produce en la célula infectada. Tanto el ARNv como el ARNcv codifican ARNm complementarios; en consecuencia, los Arenavirus se clasifican como virus de ARN ambisentido, en lugar de virus de ARN con sentido negativo o positivo. La orientación ambisentido de genes víricos está en los segmentos tanto L como S. Los genes de NP y polimerasa residen en el extremo 3' de los segmentos de ARNv S y L, respectivamente, y están codificados en el sentido negativo convencional (es decir, se expresan mediante transcripción de ARNv o ARNm complementario de genoma). Los genes localizados en el extremo 5' de los segmentos de ARNv S y L, GPC y Z, respectivamente, están codificados en el sentido de ARNm pero no hay ninguna prueba de que se traduzcan directamente de ARNv genómico. Estos genes se expresan en su lugar mediante transcripción de ARNm con sentido genómicos de antígenomas (es decir, el ARNcv), copias complementarias de longitud completa de ARNv genómicos que actúan como intermedios de replicación.

Se enumeran entradas de referencia de GenBank para secuencias de ácido nucleico víricas ejemplares que representan ARNv de Arenavirus en la Tabla 2 posterior. La Tabla 2 enumera las dianas antisentido para una secuencia de 19 bases correspondiente a los nucleótidos 1-19 o 2-20 y contenida en la región 5' terminal de los segmentos tanto S como L de los Arenavirus enumerados. Todos los virus enumerados en la Tabla 2 son aislados humanos. La secuencia diana (SEQ ID NO: 261) es 5'-CGCACMGDGG ATCCTAGGC-3', donde la nomenclatura de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) para bases especificadas de forma incompleta se usa en la descripción de la secuencia (es decir, "M" para C o A y "D" para A, G o T).

Existe un alto grado de conservación de secuencia entre Arenavirus en el extremo 5' terminal del ARNv y ARNcv. Las dianas antisentido incluyen los extremos 5' terminales de las cadenas de ARNv o ARNcv de segmento S o L o los extremos 5' terminales de cualquiera de los cuatro ARNm víricos. Como tales, los oligómeros alteran potencialmente la replicación vírica, la transcripción o la traducción de especies de ARN vírico.

El miembro prototípico de la familia Arenaviridae es virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV). La Tabla 16 enumera las regiones diana correspondientes en varios Arenavirus clínicamente relevantes y las presentes en la base de datos de Secuencias de Referencia de NCBI. La secuencia diana identificada como SEQ ID NO: 261 representa una secuencia diana combinada para cada una de estas regiones, donde las posiciones indicadas por la letra "M" pueden ser C o A y "D" es A, G o T.

Tabla 16. Regiones de diana de ácido nucleico de Arenavirus humano ejemplares

Virus	N.º de Ref.	N.º GB	Segmento	Región
LASV	NC_004296	J04324	S	1-19
LASV	NC_004297	U73034	L	1-19
LCMV	NC_004294	M20869	S	1-19
LCMV	NC_004291	J04331	L	1-19
MOPV	NC_006575	AY772170	S	1-19
MOPV	NC_006574	AY772169	L	1-19

Virus	N.º de Ref.	N.º GB	Segmento	Región
GTOV	NC_005077	AY129247	S	1-19
GTOV	NC_005082	AY358024	L	1-19
JUNV	NC_005081	AY358023	S	1-19
JUNV	NC_005080	AY358022	L	1-19
MACV	NC_005078	AY129248	S	1-19
MACV	NC_005079	AY358021	L	1-19
PICV	NC_006447	K02734	S	1-19
PICV	NC_006439	AF427517	L	1-19
PIRV	NC_005894	AF485262	S	1-19
PIRV	NC_005897	AY494081	L	1-19
SABV	NC_006317	U41071	S	1-19
SABV	NC_006313	AY358026	L	1-19
TCRV	NC_004293	M20304	S	1-19
TCRV	NC_004292	J04340	L	1-19

- 5 La Tabla 17 a continuación muestra secuencias de dirección ejemplares, en una orientación 5' a 3', que son complementarias de un amplio espectro de Arnavirus. Los oligómeros de dirección a CL-trm, LS-trm y SS-trm (SEQ ID NO: 262-264, respectivamente) se diseñaron para dirigirse específicamente a Junin-Candid-1. Como se muestra posteriormente, las secuencias de dirección representadas por SEQ ID NO: 265 y 266 incorporan inosina ("I") en dos posiciones de variabilidad de secuencia a través de una amplia serie de especies de Arnavirus.

Tabla 17. Secuencias de dirección de oligómero antisentido ejemplares

Nombre	Nucleótidos diana	N.º de ref. de GenBank	Oligómero antisentido de dirección (5' a 3')	SEQ. ID NO.
CL-trm	1-20	NC_005080	CGC CTA GGA TCC CCG GTG CG	262
LS-trm	1-21	NC_005080	CGC CTAGGA TCC CCG GTG CGC	263
SS-trm	1-20	NC_005081	GCC TAG GAT CCA CTG TGC GC	264
PanCL	1-19	N/D	GCC TAG GAT CCI CIG TGC G	265
PanLS	1-20	N/D	CGC CTA GGA TCC ICI GTG CG	266

10 B9. Aspectos generales de aplicaciones antivíricas

B9(a). Variaciones de bases

- 15 Las bases de secuencias de dirección pueden ser bases de ADN normales o análogos de las mismas, por ejemplo, uracilo e inosina, que son capaces de formar pares de bases de Watson-Crick con bases de ARN de secuencia diana.

- 20 Los oligómeros también pueden incorporar bases de guanina en lugar de adenina cuando el nucleótido diana es un resto de uracilo. Esto es útil cuando la secuencia diana varía entre diferentes especies víricas y la variación en cualquier resto de nucleótido dado es citosina o uracilo. Utilizando guanina en el oligómero de dirección en la posición de variabilidad, puede aprovecharse la capacidad bien conocida de la guanina para formar pares de bases con uracilo (denominada formación de pares de bases C/U:G). Incorporando guanina en estas localizaciones, un único oligómero puede dirigirse eficazmente a una serie más amplia de variabilidad de diana de ARN.

25 B9(b). Inhibición de la replicación vírica

- 30 En una realización, la inhibición antisentido es eficaz en el tratamiento de la infección de un animal hospedador por un virus, poniendo en contacto una célula infectada con el virus con un agente antisentido eficaz para inhibir la replicación del virus específico. El agente antisentido se administra a un sujeto mamífero, por ejemplo, ser humano o animal doméstico, infectado con un virus dado, en un vehículo farmacéutico adecuado. Se contempla que el oligonucleótido antisentido detiene el crecimiento de virus de ARN en el hospedador. El virus de ARN puede reducirse en número o eliminarse con poco o ningún efecto perjudicial en el crecimiento o desarrollo normal del hospedador.

35 B9(c). Métodos de administración

- 40 En un aspecto del método, el sujeto es un sujeto humano, por ejemplo, un paciente al que se ha diagnosticado que tiene una infección vírica localizada o sistémica. La condición de un paciente también puede dictar la administración profiláctica de un oligómero antisentido de la invención, por ejemplo en el caso de un paciente que (1) está inmunocomprometido; (2) es una víctima de quemadura; (3) tiene un catéter interno; o (4) va a someterse o se ha sometido recientemente a cirugía. En una realización preferida, el oligómero es un oligómero morfolino de fosforodiamidato, contenido en un vehículo farmacéuticamente aceptable, y se suministra por vía oral. En otra

realización preferida, el oligómero es un oligómero morfolino de fosfordiamidato, contenido en un vehículo farmacéuticamente aceptable y se suministra por vía intravenosa (i.v.).

En otra aplicación del método, el sujeto es un animal de ganadería, por ejemplo, un pollo, pavo, cerdo, vaca o cabra, etc. y el tratamiento es profiláctico o terapéutico. La invención también incluye una composición alimentaria de ganado y aves de corral que contiene un grano alimentario complementado con una cantidad subterapéutica de un compuesto antisentido antivírico del tipo descrito anteriormente. También se contempla, en un método de alimentación de ganadería y aves de corral con un grano alimentario complementado con niveles subterapéuticos de un antivírico, una mejora en la que el grano alimentario se complementa con una cantidad subterapéutica de una composición oligonucleotídica antivírica como se ha descrito anteriormente.

El compuesto antisentido se administra en general en una cantidad y de una manera eficaz para dar como resultado una concentración máxima en sangre de oligómero antisentido de al menos 200-400 nM. Típicamente, se administran una o más dosis de oligómero antisentido, generalmente a intervalos regulares, durante un periodo de aproximadamente una a dos semanas. Son dosis preferidas para administración oral de aproximadamente 1-100 mg de oligómero por cada 70 kg. En algunos casos, pueden ser necesarias dosis de más de 100 mg de oligómero/paciente. Para administración i.v., las dosis preferidas son de aproximadamente 0,5 mg a 100 mg de oligómero por cada 70 kg. El oligómero antisentido puede administrarse a intervalos regulares durante un periodo de tiempo corto, por ejemplo, diariamente durante dos semanas o menos. Sin embargo, en algunos casos el oligómero se administra intermitentemente durante un periodo de tiempo más largo. La administración puede seguirse de, o ser simultánea con, la administración de un antibiótico u otro tratamiento terapéutico. El régimen de tratamiento puede ajustarse (dosis, frecuencia, vía, etc.) según se indica, basándose en los resultados de inmunoensayo, otros ensayos bioquímicos y examen fisiológico del sujeto que se trata.

B9(d). Supervisión del tratamiento

Un régimen de tratamiento *in vivo* eficaz usando los oligonucleótidos antisentido de la invención puede variar según la duración, dosis, frecuencia y vía de administración, así como la condición del sujeto que se trata (es decir, administración profiláctica frente a administración en respuesta a infección sistémica o localizada). En consecuencia, dicha terapia *in vivo* requerirá con frecuencia supervisión por ensayos apropiados para el tipo particular de infección vírica que se trate, y ajustes correspondientes en la dosis o el régimen de tratamiento, para conseguir un resultado terapéutico óptimo. El tratamiento puede supervisarse, por ejemplo, por indicadores generales de infección, tales como recuento sanguíneo completo (CBC), métodos de detección de ácido nucleico, ensayos de inmunodiagnóstico, cultivo vírico o detección de heterodúplex.

La eficacia de un oligómero antisentido administrado *in vivo* de la invención en la inhibición o eliminación del crecimiento de uno o más tipos de virus de ARN puede determinarse a partir de muestras biológicas (tejido, sangre, orina, etc.) tomadas de un sujeto antes de, durante y después de la administración del oligómero antisentido. Los ensayos de dichos ejemplos incluyen (1) supervisión de la presencia o ausencia de la formación de heterodúplex con secuencias diana y no diana, usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, un ensayo de movilidad en gel electroforético; (2) supervisión de la cantidad de producción de proteína vírica, como se determina por técnicas convencionales tales como ELISA o transferencia de Western o (3) medición del efecto en el título vírico, por ejemplo, mediante el método de Spearman-Kärber. (Véase, por ejemplo, Pari, G.S. *et al.*, *Antimicrob. Agents and Chemotherapy* 39(5): 1157-1161, 1995; Anderson, K.P. *et al.*, *Antimicrob. Agents and Chemotherapy* 40(9): 2004-2011, 1996, Cottral, G.E. (ed) en: *Manual of Standard Methods for Veterinary Microbiology*, pp. 60-93, 1978).

Un método preferido de supervisión de la eficacia del tratamiento de oligómero antisentido es mediante la detección del heterodúplex de ARN antisentido. En un momento o momentos seleccionados después de la administración del oligómero antisentido, se recoge un fluido corporal para detectar la presencia y/o medir el nivel de especie de heterodúplex en la muestra. Típicamente, la muestra de fluido corporal se recoge 3-24 horas después de la administración, preferentemente aproximadamente 6-24 horas después de la administración. Como se ha indicado anteriormente, la muestra de fluido corporal puede ser orina, saliva, plasma, sangre, líquido cefalorraquídeo u otra muestra líquida de origen biológico y puede incluir células o fragmentos celulares suspendidos en el mismo, o el medio líquido y sus solutos. La cantidad de muestra recogida está típicamente en el intervalo de 0,1 a 10 ml, preferentemente de aproximadamente 1 ml o menos.

La muestra puede tratarse para retirar componentes no deseados y/o para tratar las especies de heterodúplex en la muestra para retirar regiones salientes de ARNm no deseadas, por ejemplo, mediante tratamiento con RNasa. Es, por supuesto, particularmente importante retirar salientes cuando la detección de heterodúplex se basa en la separación por tamaño, por ejemplo, electroforesis de espectroscopia de masas.

Está disponible una diversidad de métodos para retirar componentes no deseados de la muestra. Por ejemplo, ya que el heterodúplex tiene una carga negativa neta, pueden usarse técnicas electroforéticas o de intercambio iónico para separar el heterodúplex de material neutro o de carga positiva. La muestra puede también ponerse en contacto con un soporte sólido que tenga un anticuerpo unido a superficie u otro agente específicamente capaz de unirse al

heterodúplex. Después de lavar el soporte para retirar el material no unido el heterodúplex puede liberarse en una forma sustancialmente purificada para análisis adicional, por ejemplo, mediante electroforesis, espectroscopia de masas o inmunoensayo.

5 **B9(e). Identificación de un agente infeccioso**

El virus específico que provoca una infección puede determinarse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo métodos serológicos o de cultivo, o por métodos que emplean los oligómeros antisentido de la presente invención.

10 La identificación serológica emplea una muestra vírica o cultivo aislado de una muestra de ensayo biológica, por ejemplo, heces, orina, líquido cefalorraquídeo, sangre, etc., del sujeto. El inmunoensayo para la detección de virus se lleva a cabo generalmente por métodos empleados habitualmente por los expertos en la materia, por ejemplo, ELISA o transferencia de Western. Además, están disponibles con frecuencia en el mercado anticuerpos monoclonales específicos para cepas o especies víricas particulares.

15 Pueden usarse métodos de cultivo para aislar e identificar tipos de virus particulares, empleando técnicas que incluyen, pero sin limitación, comparar características tales como tasas de crecimiento y morfología en diversas condiciones de cultivo.

20 Otro método para identificar el agente infeccioso vírico en un sujeto infectado emplea uno o más oligómeros antisentido que se dirigen a familias y/o géneros amplios de virus. Pueden usarse secuencias que se dirijan a cualquier ARN vírico característico. Las secuencias diana deseadas son preferentemente (i) comunes para amplias familias/géneros de virus y (ii) no halladas en seres humanos. Están disponibles en bases de datos públicas secuencias de ácido nucleico características para un gran número de virus infecciosos, y pueden actuar como la base del diseño de oligómeros específicos.

30 Para cada pluralidad de oligómeros, se llevan a cabo las siguientes etapas: (a) el oligómero o los oligómeros se administran al sujeto; (b) en un momento seleccionado después de dicha administración, se obtiene una muestra del fluido corporal del sujeto; y (c) la muestra se ensaya con respecto a la presencia de un heterodúplex resistente a nucleasa que comprende el oligómero antisentido y una parte complementaria del genoma vírico. Las etapas (a) – (c) se llevan a cabo para al menos uno de dichos oligómeros, o tantos como sean necesarios para identificar el virus o la familia de virus. Pueden administrarse oligómeros y ensayarse secuencialmente o, más convenientemente, simultáneamente. El virus se identifica basándose en la presencia (o ausencia) de un heterodúplex que comprende el oligómero antisentido y una parte complementaria del genoma vírico del virus o la familia de virus conocidos dados.

40 Preferentemente, un primer grupo de oligómeros, que se dirigen a familias amplias, se utilizan en primer lugar, seguido de oligómeros seleccionados complementarios de géneros y/o especies y/o cepas específicos dentro de la amplia familia/género identificada de este modo. Este segundo grupo de oligómeros incluye secuencias de dirección dirigidas a géneros y/o especies y/o cepas específicos dentro de una amplia familia/género. Se proporcionan en general varias colecciones de segundos oligómeros diferentes, es decir una para cada amplia familia/género de virus ensayada en el primer estadio. Se seleccionan secuencias que son (i) específicas para los géneros/especies/cepas individuales que se ensayan y (ii) no halladas en seres humanos.

45 **C. Proliferación mejorada e injerto de células madre hematopoyéticas después del tratamiento con oligómeros antisentido que se dirigen a TGF-beta**

50 En otra realización, la presente invención proporciona oligómeros congelados para el tratamiento de células madre hematopoyéticas (HSC) con capacidad de repoblación *in vivo* rápida del sistema hematopoyético. Además, estudios recientes apoyan la utilidad de HSC como terapia para enfermedad vascular periférica y cardiovascular. Sin embargo, estos estudios subrayan la importancia de la calidad de la población de HSC inyectada y su potencial proliferativo. La manipulación de HSC usando oligómeros antisentido para TGF-beta aumenta el número de precursores de HSC en circulación y potencia el potencial reparador de estas células. Una mejora en el potencial de HSC para alojar y unirse con sitios de lesión junto con supervivencia y proliferación de HSC mejoradas representa una estrategia terapéutica importante para el cuidado del paciente con enfermedades cardiovasculares y vasculares periféricas.

60 Las composiciones de la invención comprenden oligómeros antisentido de TGF-beta intercalados con enlaces catiónicos, como se describe en la presente invención, que se dirigen a sitios de corte y empalme en el ARN preprocesado o el codón de inicio AUG en el ARNm del gen de TGF-beta. Los oligómeros antisentido ejemplares preferidos tienen una secuencia presentada como SEQ ID NO: 247 (GAGGGCGGCA TGGGGGAGGC), SEQ ID NO: 248 (GACCCATGGC AGCCCCGTC G) o SEQ ID NO: 249 (GCAGCAGTTC TTCTCCGTGG). El tratamiento de HSC CD34+ con dichos agentes antisentido se realiza en condiciones de cultivo eficaces para bloquear la expresión de un TGF-beta funcional y de este modo bloquear el efecto de TGF-beta en la replicación y/o diferenciación de las células madre (véase por ejemplo, Publicación de PCT N.º WO/2002/004479 o Publicación de Solicitud de Estados Unidos N.º 20030109465).

En un método relacionado, el tiempo de supervivencia de células madre humanas en cultivo se prolonga, exponiendo las células *ex vivo* a un agente de bloqueo TGF- β en condiciones de cultivo, y durante un periodo de tiempo, eficaces para conservar la viabilidad y el estado de diferenciación de las células madre. Estas células pueden mantenerse *in vitro* durante un periodo de tiempo prologando, y pueden usarse para transferencia *in vivo* en un sujeto que necesite reconstitución hematopoyética, o las células madre tratadas con agente de bloqueo de TGF- β pueden cultivarse en condiciones eficaces para dar como resultado rápida proliferación y diferenciación de las células a células progenitoras comprometidas al linaje y su descendencia.

D. Modulación de la respuesta inmunitaria

Los oligómeros descritos en el presente documento también pueden usarse para manipular una respuesta inmunitaria en un sujeto mamífero, para el tratamiento o prevención de una afección autoinmunitaria o un rechazo de trasplante. Manipulando el mecanismo normal del sistema inmunitario para la generación de tolerancia inmunitaria a autoantígenos, el método es eficaz para alterar la función y actividad de células T de manera que sea ventajoso en el tratamiento de rechazo de trasplantes o trastornos autoinmunitarios, tales como esclerosis múltiple, lupus, miastenia grave, enfermedad inflamatoria del intestino y artritis reumatoide. El uso de un oligómero antisentido con enlaces catiónicos como se describe en el presente documento, dirigido contra CTLA-4, proporciona un medio mejorado para alterar la activación de células T en respuesta a un antígeno presentado por una célula dendrítica madura. Esto permite la generación de una población de células T que se han hecho tolerantes que responden a un tejido trasplantado, cuando se activan crónicamente como en una afección autoinmunitaria, o mediante una proteína terapéutica inmunogénica.

Para la prevención del rechazo de trasplantes en un sujeto humano que se ha programado que reciba un trasplante de órgano alogénico, puede iniciarse administración de compuesto al menos una semana antes del trasplante programado. La administración puede llevarse a cabo por administración parenteral, a un nivel de dosis correspondiente a entre aproximadamente 5 y 200 mg de compuesto/día.

Para el tratamiento de una afección autoinmunitaria, la administración del compuesto puede continuarse hasta que se observe una mejora deseada en la condición autoinmunitaria. La administración puede llevarse a cabo por administración parenteral, a un nivel de dosis correspondiente a entre aproximadamente 5 y 200 mg de compuesto/día.

En aplicaciones preferidas del método, el sujeto es un sujeto humano y los métodos de la invención son aplicables al tratamiento de cualquier afección en la que la promoción de la tolerancia inmunológica o la potenciación de la activación inmunitaria serían eficaces para dar como resultado un resultado terapéutico mejorado del sujeto que se trata.

El gen de CTLA tiene cuatro exones, designados exones 1-4, con un intrón que separa cada par de exones. Los intrones se designan 1-3, donde el intrón 1 es la secuencia intermedia entre los exones 1 y 2, el intrón 2, entre los exones 2 y 3 y el intrón 3, entre los exones 3 y 4. La isoforma CTLA de longitud completa está codificada por los cuatro exones, que requieren escisión de los tres intrones y conservación de los cuatro exones. Una forma independiente de ligando de CTLA-4 se forma a partir de los exones 1, 3 y 4, que requieren escisión del intrón 1 y el exón adyacente 2, y los intrones 3 y 4. Se forma una forma secretada de CTLA-4 de los exones 1, 2 y 4, que requieren la escisión del intrón 1, y una sección contigua de ARNm de preprocesado que contiene intrón 2, exón 3 e intrón 3.

La secuencia de dirección del oligómero es preferentemente complementaria de al menos 12 subunidades de una secuencia diana identificada por SEQ ID NO: 246, que abarca el punto de unión de corte y empalme del intrón 1 y el exón 2 del ARNm del antígeno 4 de célula T preprocesado (CTLA-4) del sujeto.

El método antisentido actual se basa en el hallazgo de que la actividad de CTLA-4 puede modularse en células T no tratadas previamente y activadas manipulando las relaciones relativas de isoformas de ARNm con corte y empalme específico del gen de CTLA-4 para aumentar la inmunosupresión y la tolerancia inmunológica. Más específicamente, se ha descubierto que la administración de un compuesto antisentido que se dirige a la región de corte y empalme entre el intrón-1 y el exón-2 desplaza las relaciones de ARNm de CTLA-4 y proteínas de CTLA-4 de longitud completa a formas independientes de ligando, y que este desplazamiento es eficaz en el tratamiento de una afección autoinmunitaria o rechazo de trasplante, y la reducción el riesgo de rechazo de trasplante, al pretratar el sujeto antes de la operación de trasplante.

En otra realización, los presentes oligómeros pueden usarse para alterar de forma precisa y específica la forma en que las células dendríticas inducen respuestas inmunitarias específicas de antígeno de células T. En particular, se consigue una disminución del nivel de proteína CD86 (B7-2) mediante inhibición antisentido dirigida a células dendríticas. Los estudios han mostrado que las CD que maduran producen cantidades aumentadas de IL-10 como resultado de expresión de CD86 reducida. Además, se ha determinado que la región citoplasmática codificada por el exón 10, en el homólogo murino, está funcionalmente ligada a la regulación de esta citocina. El uso de oligómeros antisentido que contienen enlaces catiónicos, como se describe en la presente invención, dirigidos al codón de inicio

de CD86 o regiones aceptores de corte y empalme de exón de CD86 proporciona un medio mejorado para bloquear de forma precisa y específica la activación de células T frente a un antígeno presentado por una célula dendrítica madura (véase por ejemplo Publicación de PCT N.º WO/2005/072527). Esto permite la generación de una célula T tolerante y población de células dendríticas que responden a tejido trasplantado, cuando se activan de forma crónica como en una afección autoinmunitaria, o mediante una proteína terapéutica inmunogénica.

Manipulando el mecanismo normal del sistema inmunitario para la generación de tolerancia inmunitaria a auto-antígenos, el presente método altera la función y actividad de células dendríticas maduras de tal modo que sea ventajoso en el tratamiento de rechazo de trasplante o trastornos autoinmunitarios, tales como esclerosis múltiple, lupus, miastenia grave, enfermedad inflamatoria de intestino y artritis reumatoide.

El compuesto antisentido se dirige contra una región sensible a la expresión de un transcrito de CD procesado o preprocesado, es decir, una región que, cuando se une al compuesto antisentido, es eficaz para inhibir la expresión de CD86 de longitud completa en células dendríticas. En una realización general, la región sensible a expresión es una que incluye o está adyacente al sitio de inicio AUG de un transcrito procesado, donde la formación de un heterodúplex de transcrito antisentido es eficaz para inhibir la traducción del transcrito. Aquí el compuesto antisentido tiene una secuencia de bases que es complementaria de una región diana que contiene al menos 12 bases contiguas en un transcrito de CD86 humano procesado (identificado, en su forma procesada, por SEQ ID NO: 215), en la región diana de aproximadamente -20 a +30 bases con respecto al nucleótido A del sitio de inicio AUG en la posición 1, y que incluye al menos 6 bases contiguas de la secuencia identificada por SEQ ID NO: 216. Las secuencias antisentido ejemplares incluyen las identificadas como SEQ ID NO: 48-50.

En una realización más específica, los compuestos antisentido se diseñan para abarcar o cubrir las tres bases +12 a +14 (donde el nucleótido A del sitio de inicio AUG representa +1). En esta realización, el compuesto antisentido puede hibridar con una región que abarca estas bases, por ejemplo, donde las tres bases están en el medio de la región diana, o pueden hibridar con una región predominantemente cadena arriba de y que incluye estas bases, por ejemplo, las bases diana que se extienden desde -2 a +19 (SEQ ID NO: 50 posteriormente).

En otra realización general, la región sensible a la expresión es una región diana de sitio de corte y empalme que puede incluir (i) una región de intrón adyacente, por ejemplo, a una distancia de 5 bases de un donante de sitio de corte y empalme o punto de unión aceptor, (ii) una región que abarca un punto de unión de sitio de corte y empalme donante o aceptor o (iii) la región exónica adyacente, por ejemplo, a una distancia de 5 bases de, un punto de unión de donante o aceptor de sitio de corte y empalme. La región diana contiene preferentemente al menos 12 bases contiguas en un transcrito CD86 humano preprocesado, e incluye, en una realización ejemplar, al menos 6 bases contiguas de una de las secuencias identificada por SEQ ID NO: 217-220. Las secuencias antisentido ejemplares incluyen las identificadas como SEQ ID NO: 51-54.

Se enumeran secuencias diana ejemplares para el gen de CD86 (B7-2) en la Tabla 18 posterior. Las secuencias diana y de dirección de AUG de CD86 humano derivan del N.º de referencia de Genbank NM006889. Las secuencias de dirección y diana donante de corte y empalme (sd) y aceptor de corte y empalme (sa) de Exón 6 y 7 humano derivan de los N.º de referencia de Genbank U17720 y U17721, respectivamente.

Tabla 18. Secuencias diana CD86 ejemplares

Diana de oligómero	Secuencia (5' a 3')	Intervalo de nucleótidos	SED ID NO.
CD86 AUG	CATTGTGACAGCACTATGGGACT GAGTAAACATTCTCTTTGTGATG	132-177	216
CD86Ex6sa	AGCTTGAGGACCCTCAGCCTC	170-190	217
CD86Ex6sd	GCCTCGCAACTCTTATAAAATGTG	291-313	218
CD86Ex7sa	GAACCAACACAATGGAGAGGGA	274-295	219
CD86Ex7sd	GAGTGAACAGACCAAGAAAAG	298-319	220

Tabla 19. Secuencias de dirección de CD86 ejemplares

Diana de oligómero	Secuencia (5' a 3')	SEQ ID NO.
CD86 AUG1	GTTACTCAGTCCCATAGTGCTG	48
CD86 AUG2	CCATAGTGCTGTCACAAATG	49
CD86 AUG3	GAATGTTACTCAGTCCCATAG	50
CD86EX6SA	GAGGCTGAGGGTCTCAAGCT	51
CD86EX6SD	CACATTTATAAGAGTTGCGAGGC	52
CD86EX7SA	TCCCTCTCCATTGTGTTGGTTC	53
CD86EX7SD	CTTTTCTTGGTCTGTTCACTC	54

En un método para inducir tolerancia inmunológica *in vivo* en un paciente, se administra al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligómero antisentido CD86 como se describe en el presente documento. Los oligómeros pueden ser eficaces en el tratamiento de pacientes modulando la respuesta inmunológica a trasplante alogénico, o eliminación de células T activadas de forma crónica en el caso de enfermedades autoinmunitarias.

En el trasplante alogénico, el paciente se trata típicamente con el conjugado poco antes, por ejemplo, algunos días antes, de recibir el trasplante, después se tratan periódicamente, por ejemplo, una vez cada 14 días, hasta que se establece la tolerancia inmunológica. La tolerancia inmunológica puede supervisarse durante el tratamiento ensayando células T del paciente con respecto a reactividad con antígenos de MHC de donante en un ensayo *in vitro* convencional, como se detalla posteriormente.

Para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario, tal como esclerosis múltiple, lupus, miastenia grave, enfermedad inflamatoria del intestino y artritis reumatoide, se proporciona al paciente una dosis individual inicial del conjunto antisentido CD86 y después dosis adicionales periódicamente, por ejemplo, cada 3-14 días, hasta que se observa mejora en el trastorno. Como anteriormente, el desarrollo de tolerancia inmunológica puede supervisarse durante el tratamiento ensayando células T de una muestra sanguínea con respecto a su capacidad para reaccionar con un antígeno relevante, seleccionado, *in vitro*.

Las vías de suministro de oligómero antisentido incluyen, pero sin limitación, inhalación; suministro transdérmico; diversas vías sistémicas, incluyendo vías oral y parenteral, por ejemplo, suministro intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal o intramuscular. En aplicaciones preferidas del método, el sujeto es un sujeto humano y los métodos de la invención son aplicables al tratamiento de cualquier afección en la que la promoción de la tolerancia inmunológica sería eficaz para dar como consecuencia un resultado terapéutico mejorado para el sujeto que se trate.

En otra aplicación preferida del método, las células dendríticas autólogas aisladas de un sujeto humano pueden tratarse *ex vivo* con el compuesto antisentido CD86 en presencia de un antígeno relevante, seleccionado. Esta aplicación del método es particularmente útil en el tratamiento de un trastorno autoinmunitario donde el sistema inmunitario reacciona de forma inapropiada a antígenos específicos y estos antígenos pueden usarse para condicionar las células dendríticas. Un ejemplo es la destrucción mediada por inmunidad de mielina en esclerosis múltiple (EM). La proteína básica de mielina (MBP) y proteína proteolipídica (PLP) son proteínas hospedadoras que se cree que son los antígenos clave en la etiología de esta enfermedad autoinmunitaria (Shevac 2002).

En otra realización de la modulación de la respuesta inmunitaria, los presentes compuestos pueden usarse para suprimir la regulación negativa de respuestas inmunitarias centrales y periféricas. La proteína de Muerte Programada 1 (PD-1) está regulada positivamente de forma notable en la superficie de células T CD8+ específicas de virus agotadas en muchas infecciones víricas crónicas incluyendo infección por VHC y VIH. La dirección a las regiones de punto de unión de corte y empalme del ARN preprocesado de PD-1 usando oligómeros antisentido que contienen enlaces catiónicos, como se describe en la presente invención, proporciona un nuevo enfoque inmunoterapéutico para invertir la supresión de respuestas de células T citotóxicas asociadas con muchas infecciones víricas crónicas y cánceres.

En otra realización, la expresión del receptor de TNF (TNFR2) puede alterarse con oligómeros antisentido que contienen enlaces catiónicos, como se describe en la presente invención, para inducir la expresión de una isoforma de receptor de TNF- α 2 soluble (sTNFR2) con corte y empalme alternativo. Esta isoforma de corte y empalme alternativo de origen natural del gen de TNFR2 proporciona propiedades antiinflamatorias porque antagoniza la actividad biológica de TNF- α . La sobreexpresión de la isoforma de sTNFR2 usando oligómeros antisentido dirigidos a la región aceptora de corte y empalme del exón 7 del gen de TNFR2 humano, usando oligómeros antisentido como se describe en la presente invención, proporciona un enfoque inmunoterapéutico para inhibir la artritis inflamatoria, especialmente artritis inducida por TNF- α .

E. Tratamiento de atrofia muscular

En otra realización, puede usarse un oligómero como se describe en el presente documento en un método para tratar pérdida de masa de músculo esquelético en un sujeto humano. Las etapas en el método implican

- (a) medir los niveles en sangre o tejido de miostatina en el sujeto,
- (b) administrar al sujeto una cantidad inhibidora de la expresión de miostatina de un oligómero como se describe en el presente documento, que contiene al menos un enlace intersubunitario catiónico, y que contiene preferentemente del 20 % al 50 % de dichos enlaces catiónicos, y que tiene una secuencia de bases eficaz para hibridar con una región sensible a la expresión de transcrito de ARN de miostatina humana procesado o preprocesado, identificado, en su forma procesada, por SEQ ID NO: 225;
- (c) mediante esta administración, formar dentro de células musculares diana en el sujeto, una estructura de heterodúplex con formación de pares de bases compuesta de transcrito de ARN de miostatina humana y el compuesto antisentido y que tiene una T_m de disociación de al menos 45 °C, inhibiendo de este modo la expresión de miostatina en dichas células;
- (d) en un momento seleccionado después de la administración del compuesto antisentido, medir un nivel en sangre o tejido de miostatina en el sujeto; y
- (e) repetir la administración, usando los niveles de miostatina medidos en (d) para ajustar la dosis o el programa de dosificación de la cantidad de compuesto antisentido administrada, si es necesario, para reducir los niveles

medidos de miostatina sobre los medidos inicialmente y mantener dichos niveles de miostatina medidos en la etapa (d) dentro de un intervalo determinado para individuos sanos, normales.

5 Cuando el oligómero antisentido es eficaz para hibridar con un sitio de corte y empalme de transcrito de miostatina humana preprocesado, este tiene una secuencia de bases que es complementaria de al menos 12 bases contiguas de un sitio de corte y empalme en un transcrito de miostatina humana preprocesado, y la formación del heterodúplex en la etapa (c) es eficaz para bloquear el procesamiento de un transcrito de miostatina preprocesado para producir un transcrito de miostatina procesado, de longitud completa. El sitio de corte y empalme en el transcrito de miostatina preprocesado puede tener una de las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 226-229. Son
10 secuencias antisentido ejemplares las identificadas por SEQ ID NO: 230-233.

F. Aplicaciones adicionales de la dirección antisentido a región de corte y empalme

15 Los oligómeros de la invención pueden usarse en composiciones terapéuticas y métodos para inhibir la expresión de proteínas de longitud completa en células, y en particular a composiciones antisentido dirigidas contra una secuencia de ARNm que tiene su extremo 5' de 1 a aproximadamente 25 pares de bases cadena abajo de un punto de unión aceptor de corte y empalme normal en un ARNm preprocesado. Dicha dirección es eficaz para inhibir el procesamiento de corte y empalme de ARNm natural y producir ARNm variantes de corte y empalme. (Véase, por ejemplo, Publicación de PCT N.º WO/2001/083740 o Publicación de Solicitud de Estados Unidos N.º 20060287268).

20 Las proteínas diana adecuadas incluyen, por ejemplo, factores de transcripción, particularmente proteínas oncogénicas o proto-oncogénicas tales como *myc*, *myb*, *rel*, *fos*, *jun*, *abl*, *bcl* y *p53*; proteínas de la matriz, tales como integrinas y catedrinas; otras proteínas expresadas en tumores, tales como hCG; telomerasas; proteínas receptoras; proteínas víricas, tales como las expresadas a partir de los ARNm de corte y empalme subgenómico de VIH, virus del papiloma humano y parvovirus humano B19; y proteínas inmunomoduladoras tales como, por ejemplo, CTLA-4, B7-2, PD-1, Foxp3, TGF-beta y receptor de TNF. Se aprecia que la inhibición o la expresión de formas modificadas de dichas proteínas tienen numerosas aplicaciones terapéuticas. Estas incluyen, pero sin limitación, terapia antitumoral, por ejemplo por dirección a proteínas, tales como factores de transcripción, implicados en diversos aspectos de la división celular y regulación del ciclo celular; terapia antivírica, dirigiéndose a proteínas
25 esenciales para la replicación u otras funciones vitales del agente infeccioso; inhibición de la reestenosis u otros trastornos proliferativos, inhibiendo las proteínas que soportan la proliferación celular en el sitio; e inmunomodulación para suprimir una respuesta inmunitaria asociada con diversas enfermedades autoinmunitarias o para potenciar una respuesta inmunitaria como en el caso de infecciones víricas crónicas.

35 Los factores de transcripción son típicamente proteínas multidominio, que tienen una región de unión a ADN y una región de unión de proteína-proteína. La interferencia con una de estas regiones puede producir una proteína negativa dominante, que contrarresta la actividad de la proteína nativa conservando una actividad (tal como unión a proteínas) mientras que inhibe otra actividad crítica para la función apropiada de la proteína (tal como unión a ADN y activación de la transcripción; o viceversa).

40 Como se ha observado anteriormente, se han estudiado exhaustivamente y se han presentado en la bibliografía dominios funcionales de muchas de las proteínas diana observadas anteriormente. Pueden encontrarse secuencias de pre-ARNm, incluyendo localizaciones de intrones, exones y codones de inicio AUG, en la base de datos de secuencias de GenBank u otras fuentes publicadas fácilmente disponibles para los expertos en la materia.

45 Se han presentado anteriormente ejemplos de dirección antisentido cadena abajo de dominios aceptores de corte y empalme, por ejemplo, para métodos de manipulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto mamífero, es decir, dirigiéndose a la expresión de CTLA-4 o CD86.

50 En otra realización, los presentes compuestos pueden usarse para suprimir la regulación negativa de respuestas inmunitarias centrales y periféricas. La proteína de Muerte Programada 1 (PD-1) está regulada positivamente de forma notable en la superficie de células T CD8+ específicas de virus agotadas en muchas infecciones víricas crónicas incluyendo infección por VHC y VIH. La dirección a las regiones de punto de unión de corte y empalme de ARN preprocesado de PD-1 usando oligómeros antisentido intercalados con enlaces catiónicos, como se describe en la presente invención, proporciona un nuevo enfoque inmunoterapéutico para invertir la supresión de respuestas
55 de células T citotóxicas asociadas con muchas infecciones víricas crónicas y cánceres.

60 En otra realización, la expresión del receptor de TNF (TNFR2) puede alterarse con oligómeros antisentido intercalados con enlaces catiónicos, como se describe en la presente invención, para inducir la expresión de una isoforma de receptor de TNF- α 2 soluble (sTNFR2) con corte y empalme alternativo. Esta isoforma de corte y empalme alternativo de origen natural del gen de TNFR2 proporciona propiedades antiinflamatoria porque antagoniza la actividad biológica de TNF-alfa. La sobreexpresión de la isoforma sTNFR2 usando oligómeros antisentido dirigidos a la región aceptora de corte y empalme de exón 7 del gen de TNFR2 humano, usando oligómeros antisentido como se describe en la presente invención, proporciona un enfoque inmunoterapéutico para
65 inhibir la artritis inflamatoria, específicamente la artritis inducida por TNF-alfa.

G. Farmacocinética mejorada de diversos fármacos después del tratamiento con oligómeros antisentido que se dirigen a CYP3A4

En otra realización, los oligómeros de la presente invención pueden usarse para mejorar la farmacocinética de diversos fármacos en pacientes administrando un oligómero antisentido dirigido a CYP3A4, un gen que codifica una enzima metabolizadora de fármacos que reduce la semivida del fármaco. El oligómero antisentido es eficaz para reducir la producción de la enzima CYP3A4 en el sujeto, extendiendo la semivida del fármaco y su eficacia y reduciendo la toxicidad de los fármacos. (Véase por ejemplo Publicación de PCT N.º WO/2001/087286 o Publicación de Solicitud de Estados Unidos N.º 20040229829).

Las composiciones de la invención comprenden oligómeros antisentido de CYP3A4 intercalados con enlaces catiónicos, como se describe en la presente invención, que se dirigen a la región de codón de inicio AUG en el ARNm o sitios de corte y empalme en el ARN preprocesado del gen de CYP3A4. Oligómeros antisentido preferidos ejemplares tienen una secuencia presentada como el grupo que consiste en SEQ ID NO: 290-292.

EXPERIMENTAL

Materiales y métodos (subunidades)

A no ser que se indique de otro modo, todos los productos químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich-Fluka. Se obtuvieron benzoil adenosina, benzoil citidina y fenilacetil guanosina de Carbosynth Limited, Reino Unido.

A no ser que se indique de otro modo, las mezclas de disolventes son de volumen frente a volumen (v/v). La Densidad Óptica se mide a 260 nm en agua. La nomenclatura de materiales oligoméricos en esta sección usa el siguiente formato, donde + indica el enlace b1 (piperazina); GuX indica el enlace de 6-guanidinohexanoilpiperazina de tipo b1; R es arginina; B es beta alanina; Ahx es 6-aminohexanoilo; GuAhx es 6-guanidinohexanoilo; Ahxpip es el enlace 6-aminohexanoilpiperazina de tipo b1; EG3 es la Cola; GuBu es 4-guanidinobutanoilo; GuBupip es el enlace de 4-guanidinobutanoilpiperazina de tipo b1; Ac es acetilo; TFApip es el enlace de trifluoroacetilpiperazina de tipo b1; Gupip es el enlace de guanilpiperazina de tipo b1; Gu es un grupo guanilo (-C(NH)NH₂); Mepip es un enlace de 4-metilpiperazina de tipo b1. Los péptidos se escriben de N a C, pero se unen por sus extremos C con el extremo 3' terminal del oligómero. Ejemplos:

5'-(grupo)-NNNNNNNNNNN-3'-(grupo): Cadena principal sin carga con enlaces de tipo a

5'-(EG₃)-NN+NNN+N+NNNNNN-3'-(H): Cadena principal con carga con enlaces b1 (piperazina), un resto de Cola 5' y no sustituido en 3'.

5'-(EG₃)-NN+NNN+N+NNNNNN-3'-(Ac(RAhxR)₄AhxB-): Cadena principal con carga con enlaces b1 (piperazina), una Cola 5' y un péptido en el extremo 3', unidos por el resto de beta-alanina.

5'-(GuAhx)-NN(GuX)NNN(GuX)N(GuX)NNNNNN-3'-(GuAhx): Cadena principal con carga con enlaces b1 (6-guanidinohexanoilpiperazina) y grupos GuAhx en ambos extremos. Aunque se escribe de forma diferente, todas las posiciones con carga contienen un resto de 6-guanidinohexanoilo.

Ejemplo 1: Subunidades de morfolino (Véase Fig. 2B)

Preparación general de sales de morfolino 3a-d,f; A una mezcla enfriada de metanol (5-10 ml/g de ribonucleósidos 2) se añadió una solución acuosa caliente de meta-peryodato sódico (1,05 eq.). En este estadio, la composición de la mezcla de reacción será de agua/metanol 15-40 % (v:v). A esta mezcla se añadió, en partes, sólido **1a-d,f**. Tras completar la reacción (1-2 h), se retiró el producto secundario de pastilla de yodato sódico por filtración y se resuspendió con agua/metanol para recuperar cualquier producto intermedio. A los filtrados agrupados se añadió bborato de amonio (14-2,0 eq). Después de agitar a 20 °C durante 45-120 min, la mezcla se enfrió, y se añadió borano-trietilamina (1,5-2,0 eq). Esta mezcla se ajustó a pH 3,5-4,0 con una solución metanólica de ácido *p*-toluenosulfónico (3b, c, d, f) o ácido clorhídrico (3a) (4-5 eq). La mezcla se mantuvo a pH 3,5-4,0 durante 7-14 h a < 10 °C. Las sales de ácido *p*-toluenosulfónico de 3b, c, d, f se aislaron por filtración y se purificaron por recristalización/resuspensión.

La mezcla que contiene **3a** se neutralizó a pH 7. La solución se concentró por destilación para retirar metanol, y el producto se extrajo en 1-butanol. Esta solución se ajustó a pH 4 con una solución metanólica de ácido oxálico (0,5 eq). La sal de ácido oxálico de **3a** se aisló por filtración y se purificó por resuspensión. Rendimientos para **3a-d,f** = 30-75 %.

Preparación General de **1a-d,f**: El compuesto **3a-d,f** se disolvió/suspendió en N,N-dimetilformamida (4-6 ml/g 3). A esta mezcla se añadió trietilamina (2,7-3,5 eq) y cloruro de trifenilmetilo (trilito) (1,1-1,5 eq). Tras completar la reacción, el cloruro de trilito en exceso se inactivó con dietilamina (0,5 eq). Los productos en bruto se aislaron por precipitación directa de acetato de etilo y agua o mediante un trabajo de extracción (agua y después acetato de etilo o diclorometano) y precipitación. Los productos se purificaron por cristalización de tolueno. Rendimientos = 75-90 %.

Preparación de **1e**: El compuesto **1f** se suspendió en diclorometano (8 ml/g de **1f**). A esta suspensión se añadió imidazol (1,3 eq) y *t*-butildimetilclorosilano (1,2 eq). Tras la completar la reacción (1-2 h), la solución se lavó sucesivamente con tampón de citrato de pH 3 y agua. La solución resultante se concentró para proporcionar una espuma, que se disolvió en tetrahidrofurano (8 ml/g de **1f**). A esta solución se añadió carbonato potásico (2,0 eq) y pivalato de clorometilo (1,5 eq) y la mezcla se calentó a reflujo. Tras completar la reacción (16 h), la mezcla se enfrió y se diluyó con diclorometano. La mezcla se lavó sucesivamente con solución de KH_2PO_4 (pH 4,5) y agua. La solución resultante se concentró para proporcionar una espuma. La espuma se disolvió en tetrahidrofurano (4 ml/g de **1f**) y se añadió trifluorhidrato de trietilamina (2,0 eq). Tras completar la reacción (16 h), la solución se lavó sucesivamente con NaHCO_3 acuoso saturado y agua. El producto se aisló por intercambio de disolvente en tolueno y precipitación en heptano. Rendimiento = 80 % de **1e**.

Ejemplo 2: Subunidades de morfolino con enlace de tipo (a) (Véase Fig. 2C)

Preparación General de **5a-e**: El compuesto **1a-e** se disolvió en diclorometano (6 ml/g de **1**) y se enfrió hasta $< 5\text{ }^\circ\text{C}$. A esta solución se añadieron 2,6-lutidina (1,6 eq), N-metilimidazol (0,3 eq) y N,N-dimetilfosforamidodocloridato 4 (1,6 eq). Tras completar la reacción (6-12 h), esta mezcla se lavó con un tampón de citrato de pH 3. El producto en bruto se aisló por precipitación en heptano. El producto final se purificó por cromatografía de gel de sílice (gradiente de acetato de etilo/heptano). Las fracciones agrupadas que contenían producto se combinaron, se evaporaron hasta un volumen más pequeño y se aislaron por precipitación de heptano. Rendimientos = 40-60 %. Durante la cromatografía de la subunidad **5e**, así como otras subunidades derivadas de esta base heterocíclica, después de la elución de acetato de etilo/heptano de las impurezas no polares, se usó un gradiente de (isopropanol/acetato de etilo 5 %) en diclorometano para eluir el producto.

Ejemplo 3: Subunidades de morfolino con enlaces pro-catiónicos de tipo (b1) (Véase Fig. D)

Preparación de N-tritil piperazina, sal de succinato (**11**): A una solución enfriada de piperazina (10 eq) en tolueno/metanol (tolueno/metanol 5:1 (v:v); piperazina 5 ml/g) se añadió lentamente una solución de cloruro de tritilo 10 (1,0 eq) en tolueno (5 ml/g de cloruro de tritilo). Tras completar la reacción (1-2 h), esta solución se lavó cuatro veces con agua. A la solución orgánica resultante se añadió una solución acuosa de ácido succínico (1,1 eq; 13 ml de agua/g de ácido succínico). Esta mezcla se agitó durante 90 min, y el producto sólido se recogió por filtración. El sólido en bruto se purificó por dos resuspensiones en acetona. Rendimiento = 70 %.

Preparación de 1-trifluoroacetil-4-tritil piperazina (**14**): A una suspensión de 3,0 kg de **11** en 18 l de metanol (6 ml/g de **11**) se añadieron 3,51 l de diisopropiletilamina (3,0 eq) y 1,038 l de trifluoroacetato de etilo **13a** (1,3 eq). Después de agitar durante una noche, la mezcla orgánica se destiló hasta su sequedad. El aceite resultante se disolvió en 15 l de diclorometano (5 ml/g de **11**) y se lavó dos veces con 15 l de KH_2PO_4 1 M y dos veces con 15 l de agua desionizada. Esta solución se procesó a través de un tapón de sílice de 3,0 kg (1:1 sílice:11), y se lavó con 9 l de diclorometano (3 ml/g de **11**), después se concentró para proporcionar una espuma blanca. Para **14a**: Rendimiento = 2,9964 kg, 105 %. ^{19}F NMR (CDCl_3) δ -68,7 (s).

Para la preparación de amidas de 2,2-difluoropropionilo y hexafluoroisobutirilo, se hizo reaccionar succinato de tritil piperazina **11** en diclorometano con una solución acuosa de carbonato potásico para retirar ácido succínico. El diclorometano se evaporó y la base libre de tritilpiperazina **12** se trató con 2 eq del éster de **13c** o **13d** (ambos obtenidos de Synquest, Alachua, FL, Estados Unidos) sin disolvente en presencia de diisopropiletilamina (1,0 eq). La mezcla se calentó a $40\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su compleción. La mezcla se disolvió en diclorometano y se pasó a través de un tapón de gel de sílice, eluyendo con mezclas de acetato de etilo y heptano para proporcionar las amidas de tritil piperazina puras.

Preparación de N-trifluoroacetil piperazina, sal de HCl (**15**): A una solución de 1,431 kg de **14** en 7,16 l de diclorometano (5 ml/g de **14**) se añadió en gotas una solución de 3,37 l de $\text{HCl}/\text{Et}_2\text{O}$ 2,0 M (2,0 eq). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h, y el producto se recogió por filtración. La pastilla de filtrado se lavó con 2,0 l de diclorometano. Los sólidos se secaron a $40\text{ }^\circ\text{C}$ en un horno de vacío durante 24 h. Para **15a**: Rendimiento = 724,2 g, 98,3 %. ^{19}F NMR (CDCl_3) δ -68,2 (s); punto de fusión = $140\text{ }^\circ\text{C}$. La recrystalización de una muestra pequeña de etanol elevó el punto de fusión a $154 - 156\text{ }^\circ\text{C}$.

Preparación de Agente Activante (**6**): A una suspensión enfriada de **15** (1,0 eq) en tolueno (10 ml/g de **15**) se añadió diisopropiletilamina (4,0 eq). La mezcla se agitó en un baño de hielo durante 1 h y las sales se retiraron por filtración. La pastilla de filtrado se lavó dos veces con tolueno (1,5 ml/g). La solución de tolueno de la base libre **15** (13 ml/g) se añadió lentamente a una solución enfriada en hielo de POCl_3 (1,2 eq) en tolueno. La mezcla de reacción se agitó en un baño de hielo durante 1 h, después se lavó dos veces con KH_2PO_4 1 M (13 ml/g) y una vez con agua desionizada (13 ml/g). Esta solución se secó sobre Na_2SO_4 y se destiló hasta su sequedad. El sólido amorfo resultante se disolvió en diclorometano (2 ml/g de **15**) y de nuevo se destiló hasta su sequedad. Para un lote de 200 g de **15a** el rendimiento de **6a** fue de 226,9, 75 %. ^{19}F NMR (CDCl_3) δ -68,85 (s); ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 15,4 (s).

Preparación de Subunidades Activadas (**7**) (Véase Fig. 2C): A una solución enfriada/suspensión de subunidad de morfolino **1a-e** (1,0 eq) en diclorometano (5 ml/g de subunidad) se añadió sucesivamente 2,6-lutidina (1,6 eq), N-

metilimidazol (0,3 eq) y **6a-d** (1,6 eq) en diclorometano (2 ml/g de 6). Se permitió que la solución se calentara a temperatura ambiente. Después de 3 h, la solución se lavó con ácido cítrico 1 M (pH 3). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, los disolventes se retiraron por destilación y se añadió tolueno (5 ml/g). El producto se precipitó por adición en gotas de la solución a heptanos (20 ml/g de subunidad) y después se recogió por filtración. El producto en bruto se purificó por cromatografía de gel de sílice (gradiente de acetato de etilo/heptano). Los disolventes se concentraron y se reemplazaron con tolueno o etil benceno (5 ml/g de subunidad). El producto amorfo se precipitó en heptano (20 ml/g de subunidad) y después se recogió por filtración. Rendimiento = 50-70 %. ¹⁹F NMR (CDCl₃) muestra uno o dos picos con desplazamientos químicos a aproximadamente δ -68,8 (s); ³¹P NMR (CDCl₃) típicamente muestra dos picos singletes con desplazamientos químicos a 13,0 hasta 13,4.

Ejemplo 4: Subunidades de morfolino con enlaces pro-catiónicos de tipo (b2) (Véase Fig. 2C)

Cadena lateral que contiene amina primaria:

Se disolvió hexametilendiamina (100 g, 1 eq) en metanol (1 l) y se trató en gotas con una solución de trifluoroacetato de etilo (103 ml, 1 eq) en 150 ml de metanol. Se produce calentamiento muy ligero de la solución. La reacción se agitó durante 30 min a temperatura ambiente después de la adición. TLC usando cloroformo/metanol/amoníaco conc (8:3:1) muestra la presencia de amina. Los disolventes se retiraron por evaporación rotatoria, y el residuo disuelto en tolueno/acetato de etilo (1:3, 1 l) se lavó después cuatro veces con solución de cloruro sódico acuosa saturada al 10 % para efectuar la retirada completa de diamina en exceso. La evaporación produce 117 g de amina en bruto que se usó en la reacción de activación como para el ejemplo de piperazina anterior. El bruto **8a** se hizo reaccionar con **1a** usando las condiciones anteriores para proporcionar **9a**. La reacción correspondiente con las otras subunidades produce **9b-e**. Las aminas protegidas con amida alternativas se prepararon y se usaron de la misma manera que los ejemplos previos, con amidas de ésteres **13c,d** formadas por reacción de la amina con éster puro.

Cadena lateral que contiene amina secundaria:

Se mezcló N,N'-dimentiletilendiamina (36,3 ml, 3 eq.) con cloruro de tritilo (31,8 g, 1 eq.) en diclorometano (300 ml). Después de 30 min se retiró el disolvente por evaporación y se añadieron 300 ml de tolueno. La solución se lavó tres veces con 300 ml de agua y finalmente con un volumen igual de cloruro de sodio acuoso saturado. La espuma formada tras evaporación se usó sin purificación.

La espuma se disolvió en 400 ml de metanol y 100 ml de diclorometano. Se añadió trifluoroacetato de etilo (17,5 ml). Después de 30 min, la mezcla se evaporó hasta su sequedad, se añadieron 300 ml de diclorometano, y la solución se lavó tres veces con volumen igual de agua, y después una vez con cloruro sódico acuoso saturado. Después de secar sobre sulfato sódico, la capa orgánica se evaporó hasta su sequedad. El producto se purificó por cromatografía de sílice usando heptano de acetato de etilo al 10 % que contenía lutidina al 1 % para proporcionar 24,8 g de amida de tritilo pura.

La amida de tritilo se disolvió en diclorometano (180 ml) y se trató en gotas con HCl 2 M en éter (85 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. El sólido precipitado se filtró y se secó durante una noche con alto vacío. El producto recuperado (10,06 g) se suspendió en 100 ml de diclorometano y se trató con diisopropiletilamina (25,0 ml), momento en el cual se formó una solución. Esta mezcla se añadió a oxicluro de fósforo (4,6 ml) en tolueno (100 ml) con agitación a 0 °C en un baño de hielo. La reacción se continuó durante 12 h a temperatura ambiente. En ese momento, la reacción se lavó dos veces con KH₂PO₄ 1 M (100 ml) y se secó sobre sulfato de sodio. Después de filtración y evaporación se obtuvo un sólido marrón que se usó directamente.

El sólido marrón se disolvió en 20 ml de diclorometano y se añadió a una solución de **1d** (13,6 g) en diclorometano (40 ml) que contenía 2,6-lutidina (5,24 ml) y N-metilimidazol (0,672 ml). Después de cuatro h a temperatura ambiente, la reacción se lavó dos veces con ácido cítrico 1 M a pH=3. La solución se evaporó hasta su sequedad y el producto se purificó por cromatografía en sílice usando un gradiente de acetato de etilo/heptano. Reacciones similares proporcionan las subunidades activadas N-metil-N-metilaminoetil sustituidas protegidas correspondientes.

Ejemplo 5. Subunidades de morfolino con enlaces pro-catiónicos de tipo (b3) (Véase Fig. 2E)

Oxidación de 1: Todo el material de vidrio se secó en un horno durante una noche y se enfrió al vacío o con una corriente de N₂. Todas las soluciones se prepararon y se transfirieron con N₂. El alcohol de partida (1) se secó al vacío a 50 °C durante 24 h antes de su uso.

Se añadió una solución de 1 (1 eq; 25 mmol) en DMSO/diclorometano (DMSO/diclorometano 1:2 (v:v); 5 ml/g de 1) en gotas durante 15 min al reactivo Swem (preparado añadiendo DMSO (2,2 eq) a una solución de cloruro de oxalilo (1,1 eq) en diclorometano (21 ml/g) a -60 °C y agitando durante 10 min). Después de agitar a -60 °C durante 25 min, se añadió trietilamina (5 eq) durante 10 min tiempo durante el cual se formó un precipitado blanco. Se añadió diclorometano adicional (5 ml/g de 1) y la mezcla de reacción se agitó en un baño de agua durante 25 min.

La mezcla de reacción se diluyó con isopropanol/diclorometano (isopropanol/diclorometano 1:15 (v:v); 15 ml/g de 1) y se lavó dos veces con agua/salmuera 1:1 (v:v) (20 ml/g de 1). La solución se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró para proporcionar los aldehídos **16a-e** como espumas amarillas claras que se usaron sin purificación adicional. Rendimiento = > 100 %.

5 Aminación reductora de **16**:

10 Se añadió una solución de acetato de metilamina (10 eq; solución 1,16 M en metanol) a una solución de **16a-e** (1 eq; 25 mmol) en metanol (8 ml/mmol de **16**). Después del ajuste a pH 8 con ácido acético glacial, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y se añadió BH₃ piridina (2 eq). Después de agitar durante 1 h más, la mezcla de reacción se concentró hasta un aceite viscoso.

15 Al producto en bruto disuelto en diclorometano (10 ml/mmol de **16**) se añadió cloroformato de 9-fluorenilmetilo (cloruro de FMOC) (1,5 eq) seguido de diisopropiletilamina (2,5 eq.) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (8 ml/mmol) y se lavó dos veces con agua/salmuera 1:1 (v:v) (20 ml/mmol de **16**). La solución se secó sobre Na₂SO₄, el disolvente se retiró y el producto en bruto se purificó mediante cromatografía de gel de sílice (gradiente de acetona/cloroformo). Rendimiento = 40-60 % de **18a-e**.

20 Se agitó una solución de **18** (1 eq; 2,8 mmol) en 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU)/N,N-dimetilformamida 1 % (5 ml/g de **18**) a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla de reacción se diluyó con cloroformo (15 ml/g de **18**) y se lavó con agua/salmuera 1:1 (v:v) (10 ml/g de **18**). La fase acuosa se volvió a extraer una vez con cloroformo (10 ml/g de **18**), las soluciones orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y el disolvente se retiró. El resto se disolvió en N,N-dimetilformamida (15 ml/g de **18**), se lavó seis veces con hexanos (15 ml/g de **18**) para retirar/reducir el producto secundario de dibenzofulveno y el disolvente se retiró para proporcionar el producto **17a-e** como un sólido blanquecino. Rendimiento = 85 %.

30 Se añadió en gotas fosforodichloridato de etilo recién destilado (3 eq) durante 3 min a una solución de **17** (1 eq; 2,3 mmol) y diisopropiletilamina (3 eq) en diclorometano seco (40 ml/g de **17**) con N₂ a 0 °C. El baño de enfriamiento se retiró y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta completar por TLC (30 min). Después de retirada del disolvente, el producto en bruto se purificó directamente por cromatografía de gel de sílice (gradiente de acetato de etilo/hexano). Rendimiento = 50-60 %. Esta subunidad es útil para la introducción de enlaces sin carga de tipo (a). Este método general se aplicó posteriormente para la introducción de enlaces con cargas de tipo (b3).

35 Aminación reductora con una diamina etérea de cadena larga con la subunidad T:

40 Se disolvió cloruro de 4-metoxitrietilmetilo (15,4 g, 50 mmol) en tolueno y se añadió en gotas a una solución agitada de 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanoamina (150 mmol) en diclorometano que contenía 50 mmol de trietilamina. La compleción de la reacción se siguió convenientemente de TLC que se eluía con etanol/amoniaco conc (4:1 v/v) y se visualizó con ninhidrina o UV. Cuando se realizó la reacción, la solución se lavó con agua para retirar la amina libre. El disolvente se retiró por evaporación y el producto en bruto se usó sin purificación en la siguiente etapa.

45 Se añadió trifluoroacetato de etilo (1,5 eq) a una solución de amina metoxitritilada (1 eq; 25 mmol) y trietilamina (1,5 eq) en diclorometano (12 ml/g de amina) a 0 °C, el baño de enfriamiento se retiró y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. Tras completar la reacción (TLC), la mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (12 ml/g de amina), se lavó dos veces con agua/salmuera 1:1 (v:v) (20 ml/g de 1), se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró hasta un aceite amarillo claro viscoso. El producto de amida metoxitritilado en bruto se purificó por cromatografía de gel de sílice (gradiente de acetato de etilo/cloroformo). Rendimiento = 60-70 %.

50 Se añadió ácido *p*-toluenosulfónico (1,5 eq) a una solución de amida metoxitritilada (3 eq; 7,5 mmol) en metanol/trifluoroetanol/diclorometano (1:10:89 (v:v:v); 5 ml/g de 2) y la solución amarilla-naranja se agitó a temperatura ambiente durante 30 min cuando se completó la reacción (TLC). La mezcla de reacción se neutralizó a pH 7 con trietilamina y se evaporó. El producto en bruto se redisolvió en metanol (5 ml/g de amida metoxitritilada), el pH se ajustó a pH 7 si fue necesario y se reevaporó. La adición de metanol y la evaporación se repitieron una vez más y la amina en bruto se usó sin purificación adicional.

60 El aldehído **16d** (1 eq; 2,5 mmol) se añadió a una solución de la amina en bruto en metanol (5 ml/g de amina en bruto; 12,5 ml/g de **16d**) y el pH se ajustó a pH 8 con ácido acético. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y se añadió borano-piridina (2 eq). Se ajustó el pH, si fue necesario, para mantener el pH de partida y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h o hasta su compleción por TLC. La mezcla de reacción se evaporó, el resto se disolvió en diclorometano (12,5 ml/g de **16d**) y se añadió 9-fluorenilmetil cloroformato (2 eq) y diisopropiletilamina (3 eq) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 45 min. La mezcla de reacción se dividió entre diclorometano y agua/salmuera 1:1 (v:v) (12,5 ml/g de **16d** de cada uno) y la fase acuosa se volvió a extraer con diclorometano (12,5 ml/g de **16d**). Los productos orgánicos combinados se lavaron con cloruro sódico acuoso saturado (25 ml/g de **16d**), se secaron sobre Na₂SO₄ y se retiró el disolvente. El producto en

65

bruto se purificó por cromatografía de gel de sílice (gradiente de metanol/cloroformo) para proporcionar el producto **21d** como una espuma blanca. Rendimiento = 40 %.

Desprotección:

5 Se calentó una solución de **21d** en bruto (1 eq; 0,9 mmol) en trietilamina/N,N-dimetilformamida al 20 % (15 ml/mmol de **21d**) a 50 °C durante 30 min cuando no quedó **21d** por TLC. La mezcla de reacción enfriada se extrajo cuatro veces con hexanos (30 ml/mmol de **21d**) para retirar el producto secundario dibenzofulveno y se retiró el disolvente: El resto se disolvió en isopropanol (15 ml/mmol de **21d**), se evaporó hasta una espuma, después se disolvió en un volumen mínimo de diclorometano y se precipitó de los hexanos (150 ml/g de **21d**) para proporcionar el producto **20d** como un sólido blanquecino. Rendimiento = 90 %.

Activación:

15 Se preparó una solución de **20d** (1 eq; 0,78 mmol) y diisopropiletilamina (3 eq) en diclorometano seco (20 ml/g de **20d**) con nitrógeno y se añadió en gotas durante ~3 min a una solución de fosforodichloridato de etilo (3 eq) en diclorometano seco (20 ml/g de **20d**) con N₂ a 0 °C. El baño de enfriamiento se retiró y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta su compleción por TLC (20 min). La solución se concentró hasta aproximadamente ½ de volumen y se purificó directamente por cromatografía de gel de sílice (gradiente de acetona/cloroformo). Rendimiento = 40-50 % de **22d**.

Aminación reductora con una diamina etérea de cadena larga con la subunidad C:

25 La subunidad **1b** se oxidó por un método alternativo. La subunidad (5 g, 1 eq) se añadió a una solución formada por la adición de piridina (9,15 eq), y después ácido trifluoroacético (4,58 eq). La solución se colocó en un baño de agua a temperatura ambiente y se agitó. Cuando la solución era transparente, se añadió diisopropilcarbodiimida (7,23 eq) lentamente. Después de dos h, la solución se añadió a 800 ml de solución de cloruro sódico acuosa saturada. Después de agitar durante 20 min, se filtró la mezcla. El producto se disolvió en acetona y se precipitó en agua desionizada. El producto filtrado se secó al vacío. El rendimiento fue del 70-80 %. La subunidad oxidada puede usarse tal cual, pero puede purificarse por cromatografía en sílice usando mezclas de acetato de etilo/diclorometano.

35 La diamina 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanoamina (33 g, 1 eq) se disolvió en 150 ml de dietil éter, se enfrió a 0 °C y la solución se trató lentamente con una solución de trifluoroacetato de etilo (32 g, 1,5 eq) en 50 ml de éter. TLC indica la compleción de la reacción con solamente trazas de diamina restantes.

40 Se añadió una parte de esta solución (45 ml, 3 eq de amina en relación con aldehído) a una solución agitada de 3,42 g de **16b** en 20 ml de metanol. Después de cinco min se añadió *p*-nitrofenol (2,52 g) y después de 20 min se añadió cianoborohidruro de sodio (3,2 g, 8 eq). Después de 160 min a temperatura ambiente se añadieron cianoborohidruro de sodio (1,2 g) y nitrofenol (0,8 g) adicionales. La solución se vertió en 800 ml de agua a temperatura ambiente, proporcionando una suspensión de sólidos y aceite viscoso. El agua se retiró por decantación y el producto se secó al vacío. El producto completo se disolvió en acetato de etilo y se aplicó a 250 ml de gel de sílice envasado en el mismo disolvente. La columna se lavó con trietilamina/acetato de etilo 2 % y el producto se eluyó con una solución al 1 % de trietilamina en mezcla de acetato de etilo:etanol 6:1 a 10:1. Las fracciones que contenían el producto se evaporaron y se secaron al vacío para producir 1,95 g, 37 % de la amina **20b**.

45 La subunidad C amino 5' activada con la amina de cadena lateral etérea de cadena larga se preparó como se ha descrito anteriormente para el compuesto T.

Ejemplo 6: Subunidades de morfolino con enlaces pro-catiónicos de tipo (b3) por alquilación (Véase Fig. 2F):

50 Se disolvió hexametildiamina (100 g) en metanol (1 l) y se trató en gotas con una solución de trifluoroacetato de etilo (103 ml) en 150 ml de metanol. Se produce un calentamiento muy ligero de la solución. La reacción se agitó durante 30 min a temperatura ambiente después de la adición. TLC usando cloroformo/metanol/amoníaco conc (8:3:1) muestra la presencia de amina. Los disolventes se retiraron por evaporación rotatoria, el resto se disolvió en tolueno/acetato de etilo (1:3, 1 l), después se lavó cuatro veces con solución de cloruro sódico acuosa saturada al 10 % para efectuar la retirada al completo de diamina en exceso. La evaporación produce 117 g de amina en bruto que se usó directamente con la subunidad tosilada formada posteriormente.

60 La subunidad **1b** (20 g) disuelta en diclorometano (200 ml) se trató con N-metilimidazol (11 ml) y la mezcla se enfrió en un baño de hielo. Se añadió cloruro de *p*-toluenosulfonilo (8 g) en una etapa, la solución se agitó durante 10 min, y el matraz se colocó a 4 °C durante 16 h. TLC (metanol al 2 % en diclorometano) indica la compleción de la reacción. La reacción se preparó por la adición de 300 ml de diclorometano y lavando con tres veces 300 ml de cloruro sódico acuoso saturado al 10 % y evaporando hasta producir **23b** como una espuma.

65 El tosilado **23b** (17 g) y la amina monoprotectada (46,5 g, que contiene algo de diamina bis acilada) se mezclaron en acetonitrilo (200 ml) junto con trietilamina (15 ml). Después de 16 h a 45 °C, la mezcla se evaporó y el resto se

resuspendió en N,N-dimetilformamida (200 ml). La mezcla se hizo homogénea a 45 °C. La solución se calentó durante 5 días, momento en el cual se enfrió hasta temperatura ambiente, y se mezcló con 1 l de cloruro sódico acuoso saturado al 10 % y 800 ml de acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con 1 l de cloruro sódico acuoso saturado al 20 %, se agitó con sulfato de sodio, se filtró y se evaporó hasta 48 g de producto de alquilación, que contiene una mezcla de base heterocíclica benzoilada y desbenzoilada.

Un parte del producto bruto anterior (9 g) se suspendió en diclorometano, se enfrió a 0 °C, y se trató con una solución de N-(9-fluorenilmetoxicarbonilo)succinimida (Fmoc-OSu) (Chemical Abstracts número 82911-69-1) en 40 ml de diclorometano. La reacción se completó después de 20 minutos. A la solución se añadieron 3,3 ml de N-metilimidazol y después 1,9 ml de cloruro de benzoilo para volver a proteger especies desbenzoiladas. Después de 10 min más a 0 °C, se permitió que la reacción se calentara a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con 150 ml de diclorometano, se lavó con 250 ml de tampón de fosfato de pH=7, se lavó dos veces con 250 ml de cloruro sódico acuoso saturado al 10 %, se secó sobre sulfato sódico y se evaporó. El resto se cargó en 500 ml de sílice usando diclorometano (3 l) y se eluyó con mezclas de acetato de etilo en diclorometano (1 l de cada uno de 5 %, 10 %, 15 %, 2 l de 20 %, 2 l de 40 %). El último eluyente proporcionó 2,9 g de subunidad amino 5' protegida por Fmoc benzoilado puro **24b**. El lavado de la columna con 2 l de metanol/diclorometano 5 % permitió la recuperación de 5,4 g de la subunidad amino 5' protegida por Fmoc desbenzoilado.

El grupo Fmoc se retiró del producto anterior (7,1 g) mediante tratamiento con piperidina (28 ml) en DMF (140 ml). Después de 5 min a temperatura ambiente, la reacción se dividió entre diclorometano (400 ml) y agua (30 ml). La capa orgánica se lavó tres veces con 400 ml de cloruro sódico acuoso saturado al 10 %. La evaporación proporcionó 8,8 g de amina libre en bruto, purificada por cromatografía en sílice (360 ml), usando diclorometano (1 l), acetato de etilo/diclorometano al 30 % (2 l) y metanol/diclorometano al 5 % (3 l) para proporcionar 2,5 g de producto de amina.

Un gramo de esta amina se disolvió en diclorometano (10 ml) a 0 °C y se trató sucesivamente con N-etilmorfolina (500 ml), después fosforodichloridato de etilo (230 ml). Se añadió trietilamina (227 ml) y la mezcla se hizo homogénea. La reacción se completó después de 4 h. Después de la preparación acuosa habitual el producto se purificó por cromatografía de sílice (60 ml) usando mezclas de acetato de etilo/heptano 10-50 % para proporcionar 800 mg de la subunidad activada **25b**.

Se usó el mismo proceso para preparar la subunidad T activada con cadena lateral de hexametilén diamina protegida en la posición 5'. La subunidad **1d** (50 g) se hizo reaccionar con cloruro de *p*-toluenosulfonilo (23,7 g) en diclorometano (500 ml) y N-metilimidazol (16,5 ml). Después de una h a 0 °C y 4 h a temperatura ambiente, la reacción se diluyó con 400 ml de diclorometano y se lavó tres veces con 1 l de cloruro sódico acuoso saturado al 10 %. Después de secar sobre sulfato de sodio y evaporación el residuo pesaba 57 g. El residuo (15 g) y 40 g de la hexametilendiamina mono(trifluoro-acetilada) en bruto se hicieron reaccionar a reflujo durante una noche en 100 ml de acetonitrilo. El residuo después de la evaporación se disolvió en metanol/diclorometano 2 % y se aplicó a sílice. La columna se eluyó con diclorometano, acetato de etilo/diclorometano 50 %, acetato de etilo, acetato de etilo/diclorometano 80 % y finalmente metanol/diclorometano 5 % para eluir el producto en >98 % de pureza. Se activó un gramo de este producto y se purificó como anteriormente para producir 300 mg (25 %) de la subunidad activada **25d**.

De una manera similar, se hicieron reaccionar **1a-e** con 3,3'-diamino-N-metildipropilamina, **26** que proporciona una cadena lateral con dos sitios catiónicos como en **27a-e**.

Ejemplo 7: Subunidades de morfolino con enlaces de sulfamida pro-catiónicos (Véase Fig. 2G)

La subunidad de 5'-metilamino **17a-e** (1 eq) en dimetilformamida (10 ml/g) se trató con trióxido de azufre/piridina (4 eq), piridina (8 eq) seguido de trietilamina (6 eq). Después de 16 h, la reacción se añadió a cloruro sódico acuoso saturado y el precipitado seco se sometió a cromatografía en sílice usando metanol/cloroformo 5 % y que contenía trietilamina 2 %. La sal de trietilamonio del ácido sulfónico **28a-e** aislada de este modo se disolvió en diclorometano (20 ml/g). Se añadió piridina (3,2 eq) y la mezcla se enfrió con nitrógeno en un lote de acetona con hielo seco. La solución se trató en gotas con 1,1 eq de fosgeno en solución de tolueno. Después de 25 min, se permitió que la solución se calentara a temperatura ambiente durante 20 min. La solución se evaporó por rotación a un aceite que se disolvió en cloroformo y se sometió a cromatografía directamente en sílice usando acetato de etilo 40 % y hexano. El producto **29a-e** obtenido en 50 % de rendimiento, se usó para la introducción de enlaces de sulfamida de tipo (a). La subunidad de amino 5' de hexametilén diamina (**24a-e**) se desprotegió, se sulfató y se activó de una manera similar para proporcionar **30a-e**.

Ejemplo 8: Preparación de anclaje de disulfuro (Véase Fig. 2H)

Preparación de disulfuro simétrico **32**: Se suspendió 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) (12,402 g; 2,2 eq) en diclorometano (5,25 ml/g) y se enfrió en un baño de agua. Se disolvió disulfuro de hidroxietilo 31 (5,36 g; 1 eq) en diclorometano (10 ml/g) y tetrahidrofurano (1 ml/g). La solución de diol se añadió a CDI lentamente de modo que la temperatura de la mezcla se mantuvo por debajo de 4 °C durante el transcurso de la reacción. Tras completarse la reacción (una vez que se completó la adición), se añadió agua desionizada (93,8 µl, 0,15 eq) para detener la

reacción. De forma independiente, se disolvió **11** (32,59 g; 2,1 eq.) en tolueno (8 ml/g de **11**), diclorometano (2 ml/g de **11**) y metanol (2 ml/g de **11**). Se disolvió K₂CO₃ (22,09 g; 4,6 eq.) en agua desionizada (10 ml/g). La solución de K₂CO₃ se añadió a la solución de **11**; la mezcla se agitó y después se separó en dos capas. La capa orgánica turbia se destiló para retirar 90 gramos; las gotas de agua resultantes se separaron y se añadió acetona (8 ml/g de **11**) a la

5 capa orgánica. Se añadió la solución de disulfuro diol activado por CDI a la solución de base libre **12** y se concentró hasta 225 ml. Se añadió acetona (10 ml/g de **11**) y la mezcla se concentró hasta 225 ml. La mezcla se calentó a reflujo y el sólido comenzó a cristalizar a partir de la solución. Tras completarse, la mezcla de reacción se enfrió y el sólido (**32**) se aisló por filtración. Rendimiento: 27,92 g; 93,1 % (basándose en el ensayo basado en peso).

10 Preparación de alcohol disulfuro **33**: se suspendió **32** (36,00 g; 32,1 mmol; 1 eq.) en acetona (2,8 ml/g de **32**). Se añadió disulfuro de hidroxietilo (78,51 ml; 20 eq.) seguido de acetona (1,7 ml/g de **32**). Se añadió NaOH/metanol al 5 % (2,85 ml; 0,1 eq.); el pH de la mezcla se midió como 10 mediante un papel indicador de pH. Se añadió

15 trifenilfosfina (8,42 g; 1 eq.) seguido de acetona (1,1 ml/g de **32**). Todos los sólidos se pusieron en solución y después el producto comenzó a cristalizar. Después de dieciséis h, la mezcla de reacción se neutralizó con ácido acético (2,4 g; 0,2 eq.). El producto en bruto se aisló mediante filtración. El sólido en bruto **33** se sometió a dos resuspensiones de acetona por reflujo (5 ml/g).

Después de la filtración el producto en bruto se suspendió en diclorometano (7,25 ml/g de **32**). La mezcla se calentó hasta que se formó una solución transparente (35 °C). La solución se extrajo cinco veces con un volumen igual de

20 agua desionizada y la capa orgánica final se concentró hasta 155 ml. Se añadió diclorometano (4,3 ml/g de **32**) y la solución se concentró de nuevo hasta 155 ml. Se añadió CDI (9,17 g; 1,1 eq.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. Tras completar la reacción (~20 min) la mezcla de reacción se lavó dos veces con un volumen igual de agua desionizada, y después se añadió etilbenceno (2,1 ml/g de **32**). La solución se concentró hasta 65,2 g, reduciendo el diclorometano en la solución hasta 0,17 % y se agitó en un baño de hielo para cristalizar el producto.

25 El producto **34** se aisló por filtración. Rendimiento: 44 %.

Ejemplo 9: Cola de trietilenglicol (Véase Fig. 21)

Preparación de carbamato de tritil piperazina fenilo **35**: A una suspensión enfriada de compuesto **11** en

30 diclorometano (6 ml/g de **11**) se añadió una solución de carbonato potásico (3,2 eq) en agua (4 ml/g de carbonato potásico). A esta mezcla de dos fases se añadió lentamente una solución de cloroformato de fenilo (1,03 eq) en diclorometano (2 g/g de cloroformato de fenilo). La mezcla de reacción se calentó hasta 20 °C. Tras completar la reacción (1-2 h), las capas se separaron. La capa orgánica se lavó con agua, y se secó sobre carbonato potásico anhídrido. El producto **35** se aisló por cristalización de acetonitrilo. Rendimiento = 80 %.

Preparación de alcohol de carbamato **36**: Se suspendió hidruro sódico (1,2 eq) en 1-metil-2-pirrolidinona (32 ml/g de hidruro sódico). A esta suspensión se añadieron trietilenglicol (10,0 eq) y compuesto **35** (1,0 eq). La suspensión resultante se calentó hasta 95 °C. Tras completar la reacción (1-2 h), la mezcla se enfrió hasta 20 °C. A esta mezcla se añadió diclorometano/metil *tert*-butil éter al 30 % (v:v) y agua. La capa orgánica que contenía producto se lavó

40 sucesivamente con NaOH acuoso, ácido succínico acuoso, y cloruro sódico acuoso saturado. El producto **36** se aisló por cristalización a partir de diclorometano/metil *tert*-butil éter/heptano. Rendimiento = 90 %.

Preparación de ácido de Cola **37**: A una solución del compuesto **36** en tetrahidrofurano (7 ml/g de **36**) se añadió anhídrido succínico (2,0 eq) y DMAP (0,5 eq). La mezcla se calentó hasta 50 °C. Tras completar la reacción (5 h), la

45 mezcla se enfrió hasta 20 °C y se ajustó a pH 8,5 con NaHCO₃ acuoso. Se añadió metil *tert*-butil éter y el producto se extrajo a la capa acuosa. Se añadió diclorometano, y la mezcla se ajustó hasta pH 3 con ácido cítrico acuoso. La capa orgánica que contiene producto se lavó con una mezcla de tampón de citrato de pH = 3 y cloruro sódico acuoso saturado. Esta solución de diclorometano de **37** se usó sin aislamiento en la preparación del compuesto **38**.

Preparación de **38**. A la solución del compuesto **37** se añadió imida de ácido N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboxílico (HONB) (1,02 eq), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (0,34 eq) y después clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) (1,1 eq). La mezcla se calentó hasta 55 °C. Tras completar la reacción (4-5 h), la mezcla se enfrió hasta 20 °C y se lavó sucesivamente con ácido cítrico/salmuera 0,2 M y salmuera 1:1. La

50 solución de diclorometano se sometió a intercambio de disolvente a acetona y después a N,N-dimetilformamida, y el producto se aisló por precipitación de acetona/N,N-dimetilformamida a cloruro sódico acuoso saturado. El producto en bruto se resuspendió varias veces en agua para retirar N,N-dimetilformamida residual y sales. Rendimiento = 70 % de **38** del compuesto **36**. Se realizó introducción de la "Cola" activada en la resina de anclaje de disulfuro en NMP por el procedimiento usado para incorporación de las subunidades durante la síntesis de fase sólida.

60 Ejemplo 10: Preparación del soporte sólido para síntesis de oligómeros morfolino

Ejemplo 10a: Preparación de resina de aminometilpoliestireno-disulfuro

Este procedimiento se realizó en un vaso de péptidos revestido, silanizado (preparado a petición por ChemGlass, NK, Estados Unidos) con una frita de vidrio de porosidad gruesa (40-60 µm), agitador superior y válvula de Teflón de

65

3 vías para permitir que N₂ burbujee a través de la frita o una extracción de vacío. Se consiguió control de la temperatura en el vaso de reacción mediante un baño de agua en circulación.

Las etapas de tratamiento/lavado de resina en el siguiente procedimiento consisten en dos operaciones básicas: fluidificación de resina y extracción de disolvente/solución. Para fluidificación de resina, la válvula se situó para permitir que N₂ fluyera hacia arriba a través de la frita y se añadió tratamiento/lavado de resina especificado al reactor y se permitió que permeara y humedeciera completamente la resina. Después se inició la mezcla y la suspensión de resina se mezcló durante el tiempo especificado. Para extracción de disolvente/solución, se detuvieron el mezclado y el flujo de N₂ y se inició la bomba de vacío y después se situó la válvula para permitir la evaluación del tratamiento/lavado de resina a residuos. Todos los volúmenes de tratamiento/lavado de resina fueron de 15ml/g de resina a no ser que se indique de otro modo.

A resina de aminometilpoliestireno (malla de 100-200; sustitución de N₂ de ~1,0 mmol/g; 75 g, 1 eq, Polymer Labs, Reino Unido parte n.º 1464-X799) en un vaso de péptidos revestido, silanizado, se añadió 1-metil-2-pirrolidinona (NMP; 20 ml/g de resina) y se permitió que la resina se hinchara con mezclado durante 1-2 h. Después de evacuación del disolvente de hinchado, la resina se lavó con diclorometano (2 x 1-2 min), diisopropiltilamina 5 % en isopropanol/diclorometano 25 % (2 x 3-4 min) y diclorometano (2 x 1-2 min). Después de la evacuación del lavado final, la resina se fluidificó con una solución de anclaje de disulfuro 34 en 1-metil-2-pirrolidinona (0,17 M; resina 15 ml/g, ~2,5 eq) y la mezcla de resina/reactivo se calentó a 45 °C durante 60 h. Tras completar la reacción, se detuvo el calentamiento y la solución de anclaje se evacuó y la resina se lavó con 1-metil-2-pirrolidinona (4 x 3-4 min) y diclorometano (6 x 1-2 min). La resina se trató con una solución de dicarbonato de dietilo al 10 % (v/v) en diclorometano (16 ml/g; 2 x 5-6 min) y después se lavó con diclorometano (6 x 1,2 min). La resina 39 se secó con una corriente de N₂ durante 1-3 h y después al vacío a peso constante (\pm 2 %). Rendimiento: 110-150 % del peso de la resina original.

Ejemplo 10b: Determinación de la carga de resina de aminometilpoliestireno-disulfuro

La carga de la resina (número de sitios reactivos potencialmente disponibles) se determina por un ensayo espectrométrico con respecto al número de grupos de trifenilmetilo (trilito) por gramo de resina.

Se transfiere un peso conocido de resina seca (25 ± 3 mg) a un matraz volumétrico de 25 ml silanizado y se añaden ~5 ml de ácido trifluoroacético 2 % (v/v) en diclorometano. Los contenidos se mezclan por agitación suave y después se permite que reposen durante 30 min. El volumen se lleva hasta 25 ml con ácido trifluoroacético 2 % (v/v) adicional en diclorometano y los contenidos se mezclan exhaustivamente. Usando una pipeta de desplazamiento positivo, se transfiere una alícuota de la solución que contiene trilito (500 μ l) a un matraz volumétrico de 10 ml y el volumen se lleva hasta 10 ml con ácido metanosulfónico.

El contenido de cationes de trilito en la solución final se mide por absorbancia de UV a 431,7 nm y la carga de resina se calcula en grupos de trilito por gramo de resina (μ mol/g) usando los volúmenes, las diluciones, el coeficiente de extinción (ϵ : 41 μ mol⁻¹cm⁻¹) y el peso de resina apropiados. El ensayo se realiza por triplicado y se calcula una carga promedio.

El procedimiento de carga de resina en este ejemplo proporcionará resina con una carga de aproximadamente 500 μ mol/g. Se obtuvo una carga de 300-400 μ mol/g si la etapa de incorporación de anclaje de disulfuro se realizó durante 24 h a temperatura ambiente.

Ejemplo 10c: Carga de cola

Usando la misma preparación y los mismos volúmenes que para la preparación de resina de aminometilpoliestireno-disulfuro, la Cola puede introducirse en la molécula. Para la etapa de acoplamiento, se usó una solución de 38 (0,2 M) en NMP que contenía 4-etilmorfolina (NEM, 0,4 M) en lugar de la solución de anclaje de disulfuro. Después de 2 h a 45 °C, la resina 39 se lavó dos veces con diisopropiltilamina 5 % en isopropanol/diclorometano 25 % y una vez con DCM. A la resina se añadió una solución de anhídrido benzoico (0,4 M) y NEM (0,4 M). Después de 25 min, se enfrió la camisa del reactor hasta temperatura ambiente, y la resina se lavó dos veces con diisopropiltilamina al 5 % en isopropanol/diclorometano 25 % y ocho veces con DCM. La resina 40 se filtró y se secó con alto vacío. La carga para la resina 40 se define como la carga de la resina de aminometilpoliestireno-disulfuro original 39 usada en la carga de Cola.

Ejemplo 11: Preparación de oligómeros morfolino en un sintetizador automático

Ejemplo 11a: Síntesis de fase sólida

Se prepararon oligómeros morfolino en un Sintetizador de Péptidos Automático Gilson AMS-422 en columnas de reacción de polipropileno Gilson de 2 ml (Parte n.º 3980270). Se colocó un bloque de aluminio con canales para flujo de agua alrededor de las columnas como estaban situadas en el sintetizador. El AMS-422 añadirá alternativamente soluciones de reactivo/lavado, se mantendrá durante un tiempo especificado y evacuará las columnas usando vacío.

Para oligómeros en el intervalo de hasta 25 subunidades de longitud, se prefiere la resina de aminometilpoliestireno disulfuro con carga cerca de 500 µmol/g de resina. Para oligómeros mayores, se prefiere resina de aminometilpoliestireno-disulfuro con carga de 300-400 µmol/g. Si se desea una molécula con Cola 5', se elige la resina que se ha cargado con Cola con las mismas directrices de carga.

5 Se prepararon las siguientes soluciones de reactivo:
 Solución de destritilación: Ácido Cianoacético 10 % (p/v) en diclorometano/acetoniitrilo 4:1; Solución de Neutralización: Diisopropiletilamina 5 % en diclorometano/isopropanol 3:1; Solución de Acoplamiento: Subunidad de Morfolino activada 0,18 M (o 0,24 M para oligómeros que han crecido hasta más de 20 subunidades) de la base y el tipo de enlace deseados y N-etil-morfolina 0,4 M en 1,3-dimetilimidazolidinona. Se usó diclorometano (DCM) como un lavado de transición que separa los diferentes lavados de solución de reactivo.

15 En el sintetizador, con el bloque ajustado a 42 °C, a cada columna que contenía 30 mg de resina de aminometilpoliestireno-disulfuro (o resina de Cola) se añadieron 2 ml de 1-metil-2-pirrolidinona y se permitió que reposara a temperatura ambiente durante 30 min. Después de lavar con 2 veces 2 ml de diclorometano, se empleó el siguiente ciclo de síntesis:

Etapa	Volumen	Suministro	Tiempo de mantenimiento
Destritilación	1,5 ml	Colector	15 segundos
Destritilación	1,5 ml	Colector	15 segundos
Destritilación	1,5 ml	Colector	15 segundos
Destritilación	1,5 ml	Colector	15 segundos
Destritilación	1,5 ml	Colector	15 segundos
Destritilación	1,5 ml	Colector	15 segundos
Destritilación	1,5 ml	Colector	15 segundos
DCM	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
DCM	1,5 ml	Colector	30 segundos
Acoplamiento	350 µl – 500 µl	Jeringa	40 minutos
DCM	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
DCM	1,5 ml	Colector	30 segundos
DCM	1,5 ml	Colector	30 segundos
DCM	1,5 ml	Colector	30 segundos

20 Las secuencias de los oligómeros individuales se programaron en el sintetizador de modo que cada columna recibe la solución de acoplamiento apropiada (A,C,G,T,I) en la secuencia apropiada. Cuando el oligómero en una columna había completado la incorporación de su subunidad final, la columna se retiró del bloque y se realizó un ciclo final manualmente con una solución de acoplamiento comprendida por cloruro de 4-metoxitriphenilmetilo (0,32 M en DMI) que contenía 4-etilmorfolina 0,89 M.

25 Ejemplo 11b: Escisión de la resina y retirada de bases y grupos protectores de cadena principal

Después de la metoxitritilación, la resina se lavó 8 veces con 2 ml de 1-metil-2-pirrolidinona. Se añadió 1 ml de una solución de escisión que consistía en 1,4-ditiotreitol (DTT) 0,1 M y trietilamina 0,73 M en 1-metil-2-pirrolidinona, la columna se tapó y se permitió que reposara a temperatura ambiente durante 30 min. Después de ese tiempo, la solución se extrajo a un vial Wheaton de 12 ml. La resina muy encogida se lavó dos veces con 300 µl de solución de escisión. A la solución se añadieron 4,0 ml de amoníaco acuoso conc (almacenado a -20 °C), el vial se tapó estrechamente (con tapón de rosca recubierto con Teflón) y la mezcla se agitó para mezclar la solución. El vial se colocó en un horno a 45 °C durante 16-24 h para efectuar la escisión de bases y grupos protectores de cadena principal.

35 Ejemplo 11c: Aislamiento de oligómero inicial

La solución de amonólisis en viales se retiró del horno y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La solución se diluyó con 20 ml de amoníaco acuoso al 0,28 % y se pasó a través de una columna de 2,5x10 cm que contenía resina Macrorep HQ (BioRad). Se usó un gradiente salino (A: amoníaco 0,28 % con B: cloruro sódico 1 M en

amoníaco 0,28 %; B 0-100 % en 60 min) para eluir el pico que contiene metoxitritilo. Las fracciones combinadas se agruparon y se procesaron adicionalmente dependiendo del producto deseado.

Ejemplo 11d: Desmetoxitritilación de oligómeros morfolinos: Oligómeros sin metoxitritilo

Las fracciones agrupadas de la purificación de Macroprep se trataron con H₃PO₄ 1 M para reducir el pH hasta 2,5. Después de la mezcla inicial, las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 4 min, momento en el cual se neutralizan hasta pH 10-11 con amoníaco/agua 2,8 %. Los productos se purificaron por extracción de fase sólida (SPE).

Se envasó Amberchrome CG-300M (Rohm y Haas; Filadelfia, PA) (3 ml) en columnas con fritas de 20 ml (Columnas de Cromatografía Econo-Pac de BioRad (732-1011)) y la resina se aclaró con 3 ml de lo siguiente: NH₄OH 0,28 %/acetonitrilo 80 %; NaOH 0,5 M/etanol 20 %; agua; H₃PO₄ 50 mM/acetonitrilo 80 %; agua; NaOH 0,5/etanol 20 %; agua; NH₄OH 0,28 %.

La solución de la desmetoxitritilación se cargó en la columna y la resina se aclaró tres veces con 3-6 ml de amoníaco acuoso 0,28 %. Se colocó un vial Wheaton (12 ml) bajo la columna y el producto se eluyó por dos lavados con 2 ml de acetonitrilo 45 % en amoníaco acuoso 0,28 %. Las soluciones se congelaron en hielo seco y los viales se colocaron en un liofilizador para producir un polvo blanco suave. Las muestras se disolvieron en agua, se filtraron a través de un filtro de 0,22 micrómetros (Pall Life Sciences, filtro de jeringa de 25 mm Acrodisc, con una membrana de HT Tuffryn de 0,2 micrómetros) usando una jeringa y se midió la Densidad Óptica (DO) en un espectrofotómetro UV para determinar las unidades de DO de un oligómero presente, así como distribuir la muestra para análisis. Las soluciones se colocaron después de vuelta en viales Wheaton para liofilización.

Ejemplo 11e: Análisis de Oligómeros morfolino:

Se usó espectrometría de masas MALDI-TOF para determinar la composición de fracciones en purificaciones así como proporcionar pruebas para la identidad (el peso molecular) de los oligómeros. Las muestras se procesaron después de dilución con solución de ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido sinapínico), 3,4,5-trihidroxiacetofenona (THAP) o ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) como matrices.

Se realizó HPLC de intercambio catiónico (SCX) usando una columna Dionex ProPac SCx-10 de 4x250 mm (Dionex Corporation; Sunnyvale, CA) usando acetato sódico pH=5 25 mM acetonitrilo 25 % (Tampón A) y acetato sódico pH=5 25 mM acetonitrilo 25 % cloruro potásico 1,5 M (tampón B) (Gradiente 10-100 % de B en 15 min) o KH₂PO₄ 25 mM acetonitrilo 25 % a pH=3,5 (tampón A) y KH₂PO₄ 25 mM acetonitrilo 25 % a pH=3,5 con cloruro potásico 1,5 M (tampón B) (Gradiente 0-35 % de B en 15 min). El primer sistema se usó para oligómeros con carga positiva que no tenían un péptido unido, mientras que el último se usó para conjugados peptídicos.

Ejemplo 11f: Purificación de oligómeros morfolino por cromatografía de intercambio catiónico

La muestra se disuelve en acetato sódico 20 mM, pH=4,5 (tampón A) y se aplica a una columna de resina de intercambio catiónico Source 30 (GE Healthcare) y se eluye con un gradiente de cloruro sódico 0,5 M en acetato sódico 20 mM y acetonitrilo 40 %, pH=4,5 (tampón B). Las fracciones agrupadas que contienen producto se neutralizan con amoníaco acuoso conc y se aplican a una columna SPE Amberchrome. El producto se eluye, se congela y se liofiliza como anteriormente.

Los siguientes oligómeros ejemplifican este método:

5'-(EG3) - G+TGC+TCA+TGG+TGCACGG+TC - 3'-(H), [M+H]⁺ calculado = 6860,9 daltons, [M+H]⁺ hallado = 6861,7 daltons, útil para VHC

5'-(EG3) - GCC+ATGGT+TTT+TTC+TC+AGG -3'-(H), [M+H]⁺ calculado = 6825,9 daltons, [M+H]⁺ hallado = 6827,1 daltons, útil para Ébola

5'-(EG3) - +TGGGT+ATG+TTGT+AGCC+AT -3'-(H), [M+H]⁺ calculado = 7245,2 daltons, [M+H]⁺ hallado = 7246,8 daltons, útil para Ébola

5'-(EG3) - CC+TGCCC+TTTGT+TCT+AGT+TG -3'-(H), [M+H]⁺ calculado = 7092,2 daltons, [M+H]⁺ hallado = 7093,8 daltons, útil para Ébola

Ejemplo 11g: Oligómeros morfolino de 3'-metoxitritilo y 3'-tritrilo

Los oligómeros purificados de Macroprep se aplicaron directamente a las columnas de extracción de fase sólida, y los oligómeros 3'-metoxitritilados se aislaron y cuantificaron de la misma manera que las especies desmetoxitritiladas.

Ejemplo 12: Síntesis de morfolino G N2,O6-protégido (DPG) para síntesis de oligómero a gran escala

- Preparación de **41**: A una solución enfriada de **1c** e imidazol (1,3 eq) en diclorometano (8 ml/g de **1**) se añadió una solución de *tert*-butildimetilclorosilano (1,2 eq) en diclorometano. Después de la adición, la solución se calentó hasta 20 °C. Tras completar la reacción (1 – 3 horas), esta solución se lavó sucesivamente con tampón de citrato 1 M (ajustado a pH 3 con NaOH) y agua. La solución orgánica resultante se destiló para retirar de forma azeotrópica agua y se usó directamente la siguiente etapa.
- Preparación de **42**: A una solución enfriada a 0 °C de **41** en diclorometano se añadieron sucesivamente trietilamina (1,2 eq), 4-dimetilaminopiridina (0,1 eq) y cloruro de triisopropilbencenosulfonilo (1,1 eq). La solución se calentó hasta 20 °C. Tras completar la reacción (3-9 horas), la solución se lavó sucesivamente con KH₂PO₄ 1 M y agua. La solución orgánica resultante se destiló para retirar de forma azeotrópica agua y se usó directamente en la preparación del compuesto **44**.
- Preparación de **43**: A una solución de 4-hidroxibenzaldehído (1,0 eq) y N-metilimidazol (0,2 eq) en tolueno se añadió una solución de KHCO₃ (2,0 eq) en agua. A la mezcla de dos fases resultantes se añadió cloruro de trimetilacetilo (1,4 eq.). Tras completar la reacción (1-2 horas), se añadió metanol (1,0 eq) y la mezcla se agitó durante 1 hora. Después de separación de capas, la capa orgánica se lavó sucesivamente con KH₂PO₄ 1 M y agua. La solución orgánica resultante se destiló para retirar de forma azeotrópica agua y se diluyó con THF. A esta solución se añadió catalizador de Pd/C 5 % (0,004 eq, Johnson Matthey, West Deptford, NJ, Estados Unidos) y la mezcla se hidrogenó con 34,47-206,84 kPa de H₂. Tras completar la reacción (4-8 horas), la mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite y se lavó con tampón de fosfato de pH 6,5. El producto se cristalizó a partir de tolueno/heptano. Rendimiento = 80 %.
- Preparación de **44**: A una solución enfriada de **3** en diclorometano se añadió N-metilpirrolidina (2,0 eq). Después de 10 minutos, se añadió **3a** (1,2 eq), seguido de DBU (1,2 eq). Después de adición del reactivo, la solución se calentó hasta 20 °C. Tras completar la reacción (1-9 horas), la solución se lavó sucesivamente con KH₂PO₄ 1 M y agua. La solución orgánica resultante se destiló para retirar de forma azeotrópica agua y se usó directamente en la siguiente etapa.
- Preparación de **45**: A una solución de **44** en diclorometano se añadió trifluorhidrato de trietilamina (2,0 eq). Tras completar la reacción (4-20 horas), la solución se lavó sucesivamente con solución de bicarbonato sódico, tampón de fosfato de pH 6,5 y agua. La solución resultante se destiló para retirar diclorometano y el producto se cristalizó a partir de THF/agua. Rendimiento = 70 % de **1c**.
- Preparación de **46**: El compuesto **45** se disolvió en diclorometano (6 ml/g de **45**) y se enfrió hasta < 5 °C. A esta solución se añadieron 2,6-lutidina (1,6 eq), N-metilimidazol (0,3 eq) y N,N-dimetilfosforamidodichlorhidrato (1,6 eq). La solución se calentó hasta 20 °C. Tras completar la reacción (6-12 horas), esta mezcla se lavó con un tampón de citrato de pH 3. El producto en bruto se aisló por precipitación/resuspensión. El producto **46** doblemente protegido (DPG) se purificó por cromatografía en gel de sílice (gradiente de acetato de etilo/heptano) y se aisló por precipitación en heptano. Rendimiento = 40 – 60 %.

Ejemplo 13: Síntesis a gran escala de oligómeros morfolino

- El diseño de reactor para la carga de anclaje y Cola en resina de aminometilpoliestireno se usa para síntesis a mayor escala de oligómeros morfolino. Las directrices de carga de resina son iguales que para la síntesis a menor escala.

Ejemplo 13a: Síntesis de fase sólida

- Se prepararon oligómeros protegidos manualmente por síntesis de oligómero de fase sólida en resina de aminometilpoliestireno-disulfuro (~500 μmol/g de carga) a una escala de 10 g (peso de resina de partida). Las soluciones usadas fueron las siguientes: solución de destrilación: trifluoroacetato de 4-cianopirindio (CYFTA) 2 % (p/v) en trifluoroetanol/diclorometano 20 % con etanol 1 %; solución de neutralización: diisopropilamina 5 % en isopropanol/diclorometano 25 %; solución de acoplamiento: Subunidad de Morfolino activada 0,165 M (para **46** (DPG) y **5d** u otras subunidades T) o 0,18 M (para **5a** y **5b** u otras subunidades A/C) y N-etilmorfolina 0,4 M en 1,3-dimetilimidazolidinona (DMI).
- Después de la transferencia de la resina al reactor de síntesis y antes de iniciar los ciclos de síntesis, se añadió 1-metil-2-pirrolidinona (NMP, 20 ml/g de resina) y se permitió que reposara durante 1-2 h. Después de lavar 2 veces con diclorometano (10 ml/g de resina), se usó el siguiente ciclo de síntesis con la adición de la solución de acoplamiento apropiada de Subunidad de Morfolino activada de la base deseada y el tipo de enlace deseado en cada ciclo para proporcionar la secuencia apropiada.

Etapa	Volumen (ml/g de resina de partida)*	Tiempo (min)
DCM	10-30	1-2
DCM	10-30	1-2
Destritilación A	10-30	2-3
Neutralización A	10-30	3-4
DCM	10-30	1-2
DCM	10-30	1-2
Acoplamiento	7-12**	90
Neutralización A	10-30	1-2
DCM	10-30	1-2
*Los volúmenes de lavado se aumentaron para compensar el hinchamiento de la resina; el volumen es 10 ml/g del volumen de resina real en cada ciclo		
**Los volúmenes de acoplamiento son suficientes para mantener una buena mezcla y se aumenta para compensar el hinchamiento de resina		

Después de la incorporación de la subunidad final, se realizó un ciclo final (metoxitritilación) con cloruro de 4-metoxitritilfenilmetilo 0,32 M y N-etilmorfolina 0,4 M en DMI. Después de la metoxitritilación, la resina se lavó 8 veces con NMP y se trató entonces con solución de escisión que consistía en 1,4-ditiotreitol (DTT) 0,1 M y trietilamina 0,73 M en NMP (27 ml/g de resina de partida) durante 30 min. Después de recoger la solución de oligómero protegida, la resina (con volumen significativamente reducido) se lavó con dos partes adicionales de solución de escisión (13 ml/g de resina de partida durante 15 min cada una) y los lavados se combinaron con la solución a granel. A la solución de oligómero protegida en un frasco de presión de tamaño apropiado con tapón de Teflón (Ace Glass, NJ, Estados Unidos) se añadió amoníaco acuoso concentrado (106 ml/g de resina de partida, previamente enfriada a -20 °C), el frasco se selló y los contenidos se mezclaron por agitación. El frasco se colocó en un horno a 45 °C durante 16-20 h para retirar la base y los grupos protectores de cadena principal.

Después de la amonólisis, la solución de oligómero en bruto se enfría a temperatura ambiente y después se diafiltra frente a amoníaco acuoso 0,28 % usando una membrana de Celulosa Regenerada PLBC 3kd (Millipore) para retirar disolventes y moléculas pequeñas antes de la cromatografía de intercambio iónico.

Ejemplo 13b: Purificación de oligómeros morfolino mediante cromatografía de intercambio aniónico

La solución de oligómero en bruto obtenida de diafiltración se ajusta a pH 11-11,5 y se carga en una columna de resina de intercambio aniónico Super-Q 650S ToyoPearl (Tosoh Bioscience). El oligómero metoxitritilado se eluyó con un gradiente de 5-35 % de B sobre 17 volúmenes de columna (Tampón A: hidróxido sódico 10 mM; Tampón B: cloruro sódico 1 M en hidróxido sódico 10 mM) y se agruparon las fracciones de pureza aceptable (HPLC de intercambio aniónico y espec de masas).

Ejemplo 13c: Desmetoxitritilación de oligómeros morfolino

A las fracciones agrupadas de cromatografía de intercambio aniónico se añadió acetonitrilo (10 % en volumen) seguido de H₃PO₄ 2 M para ajustar el pH a 3. La solución se mezcló durante 45 min y después se neutralizó con amoníaco acuoso concentrado hasta pH 7. La solución de oligómero se diafiltró frente a acetato sódico 20 mM usando una membrana de Celulosa Regenerada PLBC 3kd (Millipore) para intercambiar tampones antes de la cromatografía de intercambio catiónico.

Ejemplo 13d: Purificación de oligómeros morfolino por cromatografía de intercambio catiónico

La solución de oligómero se ajustó a pH 4,5 con ácido acético y se cargó en una columna de resina de intercambio catiónico Source 30S (GE Healthcare). El oligómero se eluyó con un gradiente de 0-35 % de B sobre 17 volúmenes de columna (Tampón A: acetato de sodio 20 mM, acetonitrilo 25 %, pH 4,5; Tampón B: cloruro sódico 0,5 M, acetato de sodio 20 mM, acetonitrilo 25 %, pH 4,5) y se agruparon fracciones de pureza aceptable (HPLC de intercambio catiónico y espec de masas).

Ejemplo 13e: Aislamiento de oligómeros morfolino

La solución de oligómero purificada se diafiltró frente a amoníaco acuoso 0,028 % usando una membrana de Celulosa Regenerada PLBC 3kd (Millipore) para retirar sal y generar la base libre de oligómero. Después la solución de oligómero desalinizada se congeló y se liofilizó para proporcionar el oligómero como un polvo blanco suave (~12 % de contenido de agua). Por este método se prepararon compuestos útiles en el tratamiento del Ébola:

5'- (EG3) - GCC+ATGGT+TTT+TTC+TC+AGG - 3'-(H), 8,4 g
 5'- (EG3) - CC+TGCCC+TTTGT+TCT+AGT+TG - 3'-(H), 10,0 g
 Idénticos a los compuestos preparados a pequeña escala.

Ejemplo 13f: Análisis de oligómeros morfolino por HPLC de intercambio aniónico

Se realizó HPLC de intercambio aniónico (SAX) usando una columna Dionex DNAPac, de 4x250 mm (Dionex Corporation; Sunnyvale, CA) usando cloruro sódico 20 mM, 10 mmol de hidróxido sódico (Tampón A) y cloruro sódico 1 M, 10 mmol de hidróxido sódico (tampón B), (Gradiente 10-35 % de B en 20 min).

Ejemplo 14: Introducción de un grupo de guanidinio en un oligómero morfolinoEjemplo 14a: Mediante guanilación directa de aminas:

Se disolvieron 10 µmol de un oligómero morfolino, cuya cadena principal contenía tres aminas secundarias de piperazina en Na₂CO₃ 0,5 M a 75 mg/ml. Se añadieron 700 µmol de 1-*H*-pirazol-1-carboxamidina HCl a la solución de Oligómero Morfolino y la reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de haber transcurrido tres horas, la reacción se diluyó con agua y se purificó por extracción de fase sólida (SPE) usando una columna Amberchrom CG300M (Rohm y Haas; Filadelfia, PA). La purificación por SPE implicaba cargar la muestra en la columna a 20 mg/ml, lavar la columna con 4 volúmenes de columna de NaCl 1 M y después 3 volúmenes de columna de agua. El producto se eluyó lavando la columna con 3 volúmenes de columna de acetonitrilo/agua (1:1 v/v). El producto, como la sal de HCl, se liofilizó después.

Puede conseguirse purificación de intercambio catiónico fuerte (SCX) a pH = 9 de oligómeros morfolino que contienen restos de cadena principal de guanidina cuando el oligómero contiene al menos tres grupos de guanidina en la cadena principal y/o los extremos terminales. Antes de la liofilización, la solución desalada anterior se purificó por SCX a pH 9 para separar el producto modificado por guanidina de cualquier precursor de piperazina no derivatizado restante. La columna de cromatografía líquida tenía dimensiones de 10 x 62 mm (Bio-Chem Valve / Omnifit, Cambridge, Reino Unido) y contenía medio de intercambio catiónico fuerte Source 15S (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ). Las composiciones de fase móvil fueron A) Tris HCl 25 mM, acetonitrilo 25 % (v/v); pH 9,0 y B) cloruro sódico 1,0 M, Tris HCl 25 mM, acetonitrilo 25 % (v/v); pH 9,0. Se usó una velocidad lineal de 342 cm/h. Después de equilibrado de la columna con cuatro volúmenes de columna de fase móvil A, la muestra de oligómero se cargó en fase móvil A a una concentración de aproximadamente 5 mg/ml. La columna se lavó después durante dos minutos con fase móvil A, después de lo cual se inició la recogida de fracciones simultáneamente con un gradiente lineal de 0-20 % de fase móvil B durante veintidós minutos. Las fracciones se analizaron individualmente por EM MALDI-TOF. Las fracciones seleccionadas se agruparon y se desalaron mediante extracción de fase sólida. El grupo de fracciones se diluyó 5 veces con agua y se cargó en una columna Amberchrom CG300M. La desalación de SPE implicaba la carga de la muestra en la columna a 20 mg/ml y el lavado de la columna con 3 volúmenes de columna de agua. El producto se eluyó después lavando la columna con 3 volúmenes de columna de acetonitrilo/agua (1:1 v/v). El producto se liofilizó y se analizó por EM MALDI-TOF y HPLC SCX.

Los siguientes oligómeros ejemplifican este método:

5'- (EG3) - CTGGG+ATG+AG+ATCC+ATC+ACT -3'-(H) se preparó usando resina con Cola. Una muestra (DO 1000) se convirtió por los métodos anteriores en:

5'- (EG3) - CTGGG(Gupip)ATG(Gupip)AG(Gupip)ATCC(Gupip)ATC(Gupip)ACT -3'-(Gu) [M+H]⁺ calculado = 7421,5 daltons. El producto en bruto (DO 907) se recuperó después de SPE, [M+H]⁺ hallado = 7422,6 daltons, se purificó en intercambio iónico SCX a pH = 9 para proporcionar un producto de DO 378, [M+H]⁺ hallado = 7420,9.

Ejemplo 14b: Introducción de grupos de guanidinio por reacción con sales de trifluoroacetato de aminoácido Guanidino

Preparación de sales de trifluoroacetato de ácido de guanidino.

El ácido de guanidino se disolvió en ácido trifluoroacético a una concentración de 330 mg/ml con calentamiento suave y agitación. Una vez completamente disuelta, la solución se añadió en gotas a un exceso volumétrico décuplo de dietil éter para precipitar la sal de trifluoroacetato del ácido de guanidino. La suspensión se centrifugó, el

sobrenadante se decantó y el sólido se trituró en una parte nueva de dietil éter. La suspensión se centrifugó de nuevo, el sobrenadante se decantó y el sólido se secó al vacío.

Conjugación de ácidos de guanidino (generales) con aminas de un oligómero morfolino

El oligómero morfolino, que contiene grupos amino libres en la cadena principal y/o los extremos terminales, se disolvió en DMSO a 75 mg/ml. Por separado, se preparó una solución de ácido de guanidino activado disolviendo la sal de trifluoroacetato o clorhidrato del ácido de guanidino (2 equivalentes con respecto a aminas de Oligómero Morfolino) y HBTU (1,95 equivalentes con respecto a aminas) en NMP a 100 mg/ml (con respecto a ácido de guanidino). Después se añadió DIEA (3 equivalentes con respecto a ácido de guanidino) a la solución de ácido de guanidino. La solución de ácido de guanidino activado se mezcló brevemente y se añadió inmediatamente a la solución de Oligómero Morfolino. Después de tres horas a temperatura ambiente, la reacción se diluyó 2,33 veces con hidróxido de amonio concentrado frío. Según se requería, TFE se añadió lentamente con calentamiento suave y mezclado para redissolver el sólido precipitado. La reacción se calentó después a 45 °C en un vaso sellado durante 18 horas, después de lo cual se diluyó 15 veces con agua y se purificó por SPE usando una columna Amberchrom CG300M (Rohm y Haas; Filadelfia, PA). La purificación por SPE implicó la carga de la muestra en la columna a 20 mg/ml, lavar la columna con 4 volúmenes de columna de NaCl 1 M y después 3 volúmenes de columna de agua. El producto se eluyó lavando la columna con 3 volúmenes de columna de acetonitrilo/agua (1:1 v/v). El conjugado se liofilizó y se analizó por EM MALDI-TOF y HPLC SCX.

Los siguientes oligómeros ejemplifican este método:

5'-(H) - C+TTCGA+TAG+TG -3'-(H) se preparó a partir del uso de resina sin Cola. Una muestra (DO 970) se convirtió con ácido 4-guanidinobutanoico por los métodos anteriores en: 5'-(GuBu) - C(GuBupip)TTCGA(GuBupip)TAG(GuBupip) TG -3'-(GuBu), $[M+H]^+$ calculado = 4541,2 daltons. El producto en bruto (DO 820) recuperado después de SPE, $[M+H]^+$ hallado = 4541,9 daltons, se purificó en intercambio iónico SCX a pH = 9 para proporcionar producto de DO 356, $[M+H]^+$ hallado = 4542,1.

Conjugación de ácido 6-guanidinohexanoico con aminas secundarias de un oligómero morfolino

Se obtuvo ácido 6-guanidinohexanoico de AlzChem; Trostberg, Alemania. El oligómero morfolino (20 μ mol), un 18mero con ocho aminas secundarias incorporadas en la cadena principal (160 μ mol de grupos amina), se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) a 75 mg/ml. Por separado, se preparó una solución de ácido 6-guanidinohexanoico activada disolviendo 320 μ mol (2 equivalentes molares con respecto a amina) de la sal de trifluoroacetato de ácido 6-guanidinohexanoico y 312 μ mol de hexafluorofosfato de 2-(1-*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio (HBTU) en 920 μ l de 1-metil-2-pirrolidinona (NMP) y añadiendo 960 μ l de N,N-diisopropiletilamina (DIEA). Inmediatamente después de la adición de DIEA, la solución de ácido de guanidino activada se añadió a la solución de oligómero de morfolino. Después de agitar con nitrógeno a temperatura ambiente durante tres horas, se añadieron 4 ml de hidróxido de amonio concentrado a la reacción. Se añadieron 7 ml de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) con calentamiento suave y mezclado para redissolver el sólido precipitado y la solución calentada a 45 °C durante 18 horas. La solución se diluyó después hasta 200 ml con agua y se purificó por extracción en fase sólida (SPE) usando una columna de Amberchrom CG300M como se ha detallado anteriormente. El conjugado se liofilizó y se analizó por EM MALDI-TOF y HPLC SCX.

Los siguientes oligómeros ejemplifican este método:

5'-(H) - C+TTCGA+TAG+TG -3'-(H) se preparó usando resina sin Cola. Una muestra (DO 635) se convirtió por los métodos anteriores en:

5'-(GuAhx) - C(GuX)TTCGA(GuX)TAG(GuX)TG -3'-(GuAhx), $[M+H]^+$ calculado = 4681,4 daltons. El producto en bruto (DO 563) recuperado después de SPE, $[M+H]^+$ hallado = 4681,2 daltons, se purificó en intercambio iónico de SCX a pH = 6,5 para proporcionar un producto de DO 427 de 93,3 % de pureza por HPLC SCX, $[M+H]^+$ hallado = 4682,4.

5'-(EG3) - CTGGG+ATG+AG+ATCC+ATC+ACT -3'-(H) se preparó usando resina con Cola. Una muestra (DO 1500) se convirtió por los métodos anteriores en:

5'-(EG3) - CTGGG(GuX)ATG(GuX)AG(GuX)ATCC(GuX)ATC(GuX)ACT -3'-(GuAhx), $[M+H]^+$ calculado = 8100,5 daltons. El producto en bruto (DO 1486) recuperado después de SPE, $[M+H]^+$ hallado = 8100,4 daltons, se purificó en intercambio iónico SCX a pH = 9 para proporcionar producto de DO 700, $[M+H]^+$ hallado = 8100,6.

Este método también se usó para añadir ácidos peptídicos tales como AcRAhxRAhxB (escrito más expansivamente como AcNHRAhxRAhxB-OH en la Figura 2O) a las aminas de cadena principal.

Ejemplo 14c: Por conjugación de ácidos aminoalcanoicos a aminas de un oligómero morfolino seguido de guanilación:

5 El oligómero morfolino, que contiene grupos amino libres en la cadena principal y/o los extremos terminales, se disolvió en DMSO a 75 mg/ml. Por separado, se preparó una solución de ácido aminoalcanoico-Fmoc activada disolviendo el aminoácido protegido por Fmoc (2 equivalentes con respecto a aminas de oligómero morfolino) y HBTU (1,95 equivalentes con aminas respectivas) en NMP a 100 mg/ml (con respecto a aminoácido). Después se añadió DIEA (3 equivalentes con respecto a aminoácido) a la solución de aminoácido. La solución de aminoácido activada se mezcló brevemente y se añadió inmediatamente a la solución de oligómero morfolino. Después de tres horas de agitación a temperatura ambiente, la reacción se diluyó 2,33 veces con hidróxido de amonio concentrado frío. La reacción se calentó después a 45 °C en un vaso sellado durante 18 horas, después de lo cual se diluyó 15 veces con agua y se purificó por SPE usando una columna Amberchrom CG300M (Rohm y Haas, Filadelfia, PA). La purificación de SPE implicó la carga de la muestra en la columna a 20 mg/ml, lavado de la columna con 4 volúmenes de columna de NaCl 1 M y después 3 volúmenes de columna de agua. El producto se eluyó por lavado de la columna con 3 volúmenes de columna de acetonitrilo/agua (1:1 v/v). El conjugado se liofilizó y se analizó por EM MALDI-TOF y HPLC SCX. El producto puede guanilarse y purificarse según los ejemplos previos.

Los siguientes oligómeros ejemplifican este método:

20 5'-(EG3) - CTGGG+ATG+AG+ATCC+ATC+ACT -3'-(H) se preparó usando resina con Cola. Una muestra (DO 2000) se convirtió por los métodos anteriores en:

25 5'-(EG3) - CTGGG(Ahxpip)ATG(Ahxpip)AG(Ahxpip)ATCC(G)ATC(Ahxpip)ACT -3'-(Ahx), [M+H]⁺ calculado = 7848,3 daltons. El producto en bruto (DO 1672) recuperado después de SPE, [M+H]⁺ hallado = 7847,7 daltons. Una parte de este material (DO 800) se convirtió adicionalmente por guanilación en 5'-(EG3) - CTGGG(GuX)ATG(GuX)AG(GuX)ATCC(GuX)ATC(GuX)ACT -3'-(GuAhx), [M+H]⁺ calculado = 8100,5 daltons. El producto en bruto recuperado después de SPE, [M+H]⁺ hallado = 8101,4 daltons, como se purificó por cromatografía de SCX para proporcionar DO 320 de producto final.

30 Ejemplo 15: Introducción de péptidos ricos en arginina en un oligómero morfolino

El oligómero morfolino, que contiene grupos amino libres en la cadena principal y/o los extremos terminales, se disolvió en DMSO a 75 mg/ml. Por separado, se preparó una solución de péptido activada, siendo el péptido de 1-25 restos de aminoácidos de longitud, que contiene un grupo de bloqueo N-terminal, preferentemente acetilo, y comprendido por aminoácidos con guanidinio, hidrocarburo u otras cadenas laterales no nucleófilas. El péptido (2 equivalentes con respecto a aminas de oligómero morfolino) y HBTU (1,95 equivalentes con respecto a grupos amina) se disolvieron en NMP a 100 mg/ml (con respecto al péptido). Después se añadió DIEA (2 equivalentes con respecto a péptido) a la solución del péptido. La solución de péptido activado se mezcló brevemente e inmediatamente se añadió a la solución del oligómero morfolino. Después de tres horas de agitación a temperatura ambiente, la reacción se diluyó 2,33 veces con hidróxido de amonio concentrado frío. Según se requirió, se añadió TFE lentamente con calentamiento suave y mezclado para redissolver el sólido precipitado. La reacción se calentó después a 45 °C en un vaso sellado durante 18 horas. Después de lo cual se diluyó 15 veces con agua y se purificó por SPE usando una columna Amberchrom CG300M (Rohm y Haas, Filadelfia, PA). La purificación por SPE implicó la carga de la muestra en la columna a 20 mg/ml, lavar la columna con 4 volúmenes de columna de NaCl 1 M y después 3 volúmenes de columna de agua. El producto se eluyó lavando la columna con 3 volúmenes de columna de acetonitrilo/agua (1:1 v/v). El conjugado se liofilizó y se analizó por EM MALDI-TOF y HPLC SCX. El producto puede purificarse según los ejemplos previos.

50 Ejemplo 16: Preparación de oligómeros morfolino que tienen un péptido rico en arginina y grupos de guanidinio de cadena principal

Se hicieron reaccionar oligómeros morfolino con grupos guanidinio de cadena principal, como se prepara en el Ejemplo 1.4, con péptidos ricos en arginina como en el Ejemplo 15. Los productos se purificaron en resina de intercambio catiónico SCX Source 15S como se ha descrito en el Ejemplo 13.

55 Ejemplo 17: Preparación de oligómeros morfolino que tienen un péptido rico en arginina y grupos amina de cadena principal60 Ejemplo 17a: Protección de aminas secundarias de oligómero morfolino como trifluoroacetamidas:

65 Se disolvieron 41 mg del oligómero morfolino, un 11mero con tres aminas secundarias de cadena principal y 3'-trilito o metoxitritilo, en 0,500 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). A la solución de oligómero se añadieron 8,2 µl (5 eq.) de N,N-diisopropiletilamina (DIEA) seguido de 44 µl (5 eq.) de una solución 250 mg/ml de trifluoroacetato de 4-nitrofenilo en N-metilpirrolidinona (NMP). Las adiciones de DIEA y trifluoroacetato de 4-nitrofenilo se repitieron cuatro veces más a intervalos de 90 min y la reacción se agitó después durante 15 h a temperatura ambiente. Después se retiró el grupo de 3'-trilito o metoxitritilo añadiendo 3,76 ml (20 eq.) de una solución 50 mM de trifluoroacetato de 4-cianopiridinio en

2,2,2-trifluoroetanol (TFE) y agitando durante 40 min. La reacción se diluyó después hasta 40 ml con agua y el pH se ajustó hasta 7,5 añadiendo tampón de fosfato sódico 0,5 M, pH 7,5, en gotas. El producto se aisló por extracción de fase sólida usando una columna Amberchrom CG300M de 2 ml. Después de cargar la mezcla de reacción en bruto en la columna, la columna se aclaró con dos volúmenes de columna de agua, cuatro volúmenes de columna de acetoniitrilo/agua al 15 % (v/v) y cuatro volúmenes de columna de acetoniitrilo/agua 20 % (v/v). El producto protegido por cadena principal con amina 3'-morfolino libre se eluyó después con tres volúmenes de columna de acetoniitrilo/agua 1:1 (v/v) y se liofilizó.

Ejemplo 17b: Conjugación de péptidos ricos en arginina con oligómero morfolino seguida de desenmascaramiento de aminas de cadena principal de oligómero:

Se preparó una solución de péptido activado disolviendo el ácido peptídico (22,6 μmol) y HBTU (22,3 μmol) en 300 μl de NMP y añadiendo DIEA (40,8 μmol). Inmediatamente después de la adición de DIEA, la solución de péptido se añadió a una solución del oligómero morfolino protegido por cadena principal con amina de 3'-morfolino libre en 0,550 ml de DMSO. Después de 180 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 2 ml de hidróxido de amonio concentrado a la reacción. El precipitado resultante se volvió a disolver con la adición de 4 ml de TFE y calentamiento suave y mezclado. La reacción se colocó en un horno a 45 °C durante 15 horas. Después se añadió agua, diluyendo la reacción hasta 40 ml. Después la solución se neutralizó añadiendo ácido fosfórico 2 M en gotas con agitación. El producto se aisló por extracción de fase sólida usando una columna Amberchrom CG300 M de 2 ml. Después de cargar la mezcla de reacción en bruto en la columna, la columna se aclaró con cuatro volúmenes de columna de agua. El producto se eluyó después con tres volúmenes de columna de acetoniitrilo/agua 1:1 (v/v) y se liofilizó.

Los siguientes oligómeros ejemplifican este método:

5'-(EG3) - G+TGC+TCA+TGG+TGCACGG+TC -3'-(AC(RAHXR)₄AHXB-), [M+H]⁺ calculado = 8789,3 daltons, [M+H]⁺ hallado = 8789,9 daltons útil para Ébola

5'-(EG3) - C+TTCGA+TAG+TG -3'-(trilito) se preparó usando resina con Cola. Una muestra (DO 994) se convirtió por los métodos anteriores en:

5'-(EG3) - C(TFApip)TTCGA(TFApip)TAG(TFApip)TG -3'-(H), [M+H]⁺ calculado = 4368,6 daltons. El producto en bruto recuperado después de SPE, [M+H]⁺ hallado = 4371,1 daltons. Esta muestra se convirtió adicionalmente por acilación con Ac(RAhXR)₄AhxB para proporcionar

5'-(EG3) C+TTCGA+TAG+TG -3' - (Ac(RAhXR)₄AhxB-), [M+H]⁺ calculado = 6010,0 daltons. El producto en bruto (DO 770) recuperado después de SPE, [M+H]⁺ hallado = 6011,6 daltons. Esto se purificó en intercambio iónico de SCX a pH = 6,5 para proporcionar producto de DO 478, [M+H]⁺ hallado = 6010,7 daltons, con pureza de HPLC SCX de 84,7 %.

Ejemplo 18: Metilación reductora de aminas de oligómero morfolino

Se preparó una solución de formaldehído disolviendo 0,52 g de paraformaldehído en 17 ml de tampón de borato sódico pH 8,5 200 mM con calentamiento y agitación. La solución se calentó hasta hervir suavemente, con un condensador de reflujo unido, durante 1 hora. Después se detuvo el calentamiento, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y la solución se continuó agitando durante el transcurso de la reacción de metilación.

Se preparó una solución 1 M de borohidruro de sodio enfriando 10 ml de tampón de borato sódico de pH 8,5 200 mM en un baño de hielo y disolviendo después 0,378 g de borohidruro sódico en él. La solución se mantuvo fría en hielo durante el transcurso de la reacción de metilación.

Se pesaron 33 mg (4,6 μmol) de un oligómero morfolino de 20 unidades con cinco aminas secundarias incorporadas en la cadena principal y una amina secundaria de morfolino libre en el extremo 3' terminal en un vial de vidrio. El oligómero se disolvió después en 1 ml de tampón de borato sódico de pH 8,5 200 mM y se enfrió hasta 0 °C en un baño de agua con agitación. Se añadieron 200 μl de la solución de formaldehído (~43 eq.) preparada anteriormente a la solución de oligómero morfolino con agitación. Inmediatamente después de la adición de formaldehído se añadieron 40 μl de la solución de borohidruro sódico 1 M (8,7 eq.). Las adiciones de formaldehído y borohidruro sódico se repitieron cinco veces a intervalos de 30 min. Después de las adiciones finales, la reacción se agitó durante 30 min y después se añadieron 4 mg de borohidruro sódico. La reacción se agitó después durante 2 horas. Se añadió agua para diluir la reacción hasta 5 ml y el pH se ajustó hasta 6,5 añadiendo ácido fosfórico 1 M en gotas.

El producto se aisló por extracción de fase sólida usando una columna Amberchrom CG300M de 2 ml. Después de cargar la mezcla de reacción en bruto en la columna, la columna se aclaró con cuatro volúmenes de columna de agua. El producto se eluyó después con tres volúmenes de columna de acetoniitrilo/agua 1:1 (v/v) y se liofilizó.

Los siguientes oligómeros ejemplifican este método:

5'-(EG3) - CTGGG+ATG+AG+ATCC+ATC+ACT -3'-(H) se preparó usando resina con Cola. Una muestra (DO 885) se convirtió por los métodos anteriores en:

5'-(EG3) - CTGGG(Mepip)ATG(Mepip)AG(Mepip)ATCC(Mepip)ATC(Mepip)ACT -3'-(Metilo) [M+H]⁺ calculado = 7253,5 daltons. El producto en bruto (DO 625) recuperado después de SPE, [M+H]⁺ hallado 7250,5 daltons.

Ejemplo 19: Ensayo de traducción *in vitro* sin células (método general)

La secuencia codificante de proteínas para luciferasa de luciérnaga, sin el codón de Met iniciador ATG, se subclonó en el sitio de clonación múltiple del plásmido pCiNeo (Promega). Posteriormente, oligonucleótidos complementarios para regiones de codones de inicio de VP35 (-98 a +39 bases 3020 a 3157) del virus del Ébola, (N.º de referencia de GenBank AF086833), VP24 (-84 a +43 o bases 10261 a 10390) del virus del Ébola, o L (-80 a +49 o bases 11501 a 11632) del virus del Ébola se hicieron bicatenarios y se subclonaron en sitios Nhe 1 y Sal 1. Se generó ARN a partir del promotor de T7 con Mega script T7 (Ambion, Inc., Austin, TX).

Para experimentos que se dirigen a ARNm del gen de CYP3A2, se prepararon oligonucleótidos para la región de codón de inicio del gen de CYP3A2 de rata (N.º de referencia de GenBank U09742; -25 a +22 o bases 44 a 90) y se clonaron en pCiNeo como se han descrito anteriormente. Para experimentos que se dirigen a la región de codón de inicio del virus de la hepatitis C, se prepararon oligonucleótidos que codificaban la región de codón de inicio del VHC (N.º de referencia de GenBank AF009606; -20 a +31 o bases 322 a 372) y se clonaron en pCiNeo como se ha descrito anteriormente.

Los ensayos de traducción *in vitro* sin células se llevaron a cabo mezclando diferentes concentraciones de PMO con ARN 6 nM. La mezcla se añadió después a un sistema de traducción de reticulocitos de conejo (Promega, Inc.) y se determinó la cantidad de proteína luciferasa producida mediante emisión de luz medida en luminómetro. Se generó una curva sigmoidea para determinar los valores de CE₅₀ a partir de la representación de la emisión de luz de luciferasa observada (n=3 por concentración de PMO) frente a la concentración de PMO, por ejemplo como se muestra en la Fig. 4.

Ejemplo 20: Ensayo de traducción de corrección de corte y empalme en cultivo celular (método general)

Se transfectaron de forma estable células HeLa con plásmido pLuc/705, que tiene un gen de luciferasa interrumpido por un intrón de β-globina humana mutado en el nucleótido 705, que provoca de este modo corte y empalme incorrecto. Debido a que los transcritos con corte y empalme incorrecto no producen proteínas indicadoras funcionales, no se observan señales indicadoras a no ser que se induzca corte y empalme de tipo silvestre con un oligómero corrector de corte y empalme. Un oligómero antisentido que se dirige al sitio de corte y empalme 705 (que tiene SEQ ID NO: 286), cuando se suministra eficazmente, corrige corte y empalme y permite la expresión de luciferasa.

Este ensayo mide la capacidad de los oligómeros para entrar en células y núcleos, bloquear el corte y empalme incorrecto de pre-ARNm, y provocar de este modo la expresión de un gen indicador. Debido a que los oligómeros deben entrar en células y núcleos celulares para producir una señal en el ensayo, es útil medir la captación y eficacia de restos de suministro así como la actividad antisentido de los oligómeros de unión.

La captación y actividad de diversos oligómeros y conjugados de transportador-oligómero, como se ha descrito anteriormente, en células HeLa pLuc/705 se ha estudiado por espectroscopia de fluorescencia. Los experimentos se realizaron en general por triplicado. De acuerdo con el procedimiento general, se añadió medio de cultivo que contenía la sustancia de ensayo a una concentración especificada a células HeLa pLuc/705 sembradas en una placa de 48 pocillos. Después de incubación, las células se lavaron con PBS tres veces, y se recogió el lisado celular. La cantidad de luciferasa funcional producida se determinó mezclando 30 µl de lisado celular y 50 µl de Reactivo de Ensayo de Luciferasa (LAR) (Promega, WI) y midiendo la producción de luz usando un lector de fluorescencia/luminiscencia de microplaca Fix 800 (Bio-tek, Vermont). Las unidades de luz relativas se normalizaron a µg de proteínas determinados por el método de ácido bicinconínico (BCA), siguiendo el procedimiento del fabricante (Pierce, IL).

Ejemplo 21. Actividad antisentido aumentada usando PMO con enlaces catiónicos

Se sintetizaron dos PMO usando enlaces catiónicos para un subconjunto de los enlaces de oligómero como se muestra en el Listado de Secuencias para SEQ ID NO: 9 (+T+TCAACC+T+TG AAACC+T+TGCG) y 10 (GCCA+TGG+T+T+T+ T+T+TC+TCAGG). Estos oligómeros incorporaron un enlace catiónico (fosforamido de 1-piperazino), como se muestra en la Fig. 1B, en las posiciones indicadas con un "+". Estos dos PMO se dirigen al ARNm de VP24 de EBOV. Se realizó un ensayo de traducción sin células usando el ARNm de V24:luciferasa como el ARN de entrada. Se compararon PMO con y sin enlaces catiónicos con respecto a su capacidad para inhibir la expresión de luciferasa y los resultados se muestran en la Fig. 3. En comparación con el PMO sin carga con la

misma secuencia de bases, los PMO con entre 6 y 8 enlaces catiónicos demostraron una actividad antisentido aumentada entre 10 y 100 veces en este ensayo.

Ejemplo 22: Infección por virus del Ébola de animales tratados con oligómero

5 Se obtuvieron ratones C57B1/6, de 8-10 semanas de edad de ambos sexos, del Instituto de Cáncer Nacional, Centro de Investigación y Desarrollo de Cáncer de Frederick (Frederick, MD). Se alojaron ratones en jaulas microaislantes y se les proporcionó agua esterilizada por autoclave y pienso a voluntad. Los ratones se expusieron por inyección intraperitoneal a ~1000 ufp de virus del Ébola adaptado a ratones diluido en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Bray, Davis *et al.* 1998). Los ratones se trataron con un total de 100 µg de PMO o +PMO, divididos entre dos dosis equivalentes a las 24 y 4 horas antes de la exposición a virus del Ébola. Se expusieron ratones C57B1/6 por vía intraperitoneal a 1000 unidades formadoras de placa de virus del Ébola adaptado a ratones (Bray, Davis *et al.* 1998). Los resultados se han descrito anteriormente y se presentan gráficamente en la Fig. 6.

15 Se trataron cobayas de Hartley por vía intraperitoneal con hasta 20 mg/kg de cada uno de los VP24-AUG, L-AUG y VP35 PMO o +PMO (SEQ ID NO: 1,5 y 11 o 287, 288 y 289, respectivamente) 24 horas antes o 24 o 96 horas después de la exposición subcutánea a 1000 ufp de virus del Ébola adaptado a cobaya (Connolly, Steele *et al.* 1999).

20 El modelo de primate no humano para exposición a virus del Ébola letal usó macacos rhesus hembra de 3-4 kg de peso que se expusieron a 1.000 ufp de EBOV-Zaire (cepa de 1995) mediante inyección intramuscular antes del tratamiento con PMO. Los monos se trataron desde el día 1 al día 10 mediante vías parenterales. La dosis del PMO fue de 20 mg/kg para cada uno de los dos PMO en la combinación de dos fármacos (SEQ ID NO: 288 y 289).

25

Tabla de listado de secuencias

<u>N.º de ref. de AVI</u>	<u>Nombre</u>	<u>Secuencia (5 → 3')</u>	<u>SEQ ID NO.</u>
<u>Secuencias de dirección a virus del Ébola</u>			
4539	VP35-AUG	CCTGCCCTTTGTTCTAGTTG	1
06-131	VP35-2+	CCTGCCCTTTGTTCTAG+T+TG	2
06-132	VP35-4a+	CCTGCCCTTTG+T+TCTAG+T+TG	3
06-133	VP35-4b+	CC+TGCCC+TTTGT+TCTAGT+TG	4
537	VP24-AUG	GCCATGGTTTTTCTCAGG	5
06-125	VP24-2+	GCCATGGTTTT+TC+TCAGG	6
06-126	VP24-4a+	GCCA+TGGT+TTT+TTC+TCAGG	7
06-127	VP24-4b+	GCCATGGT+TT+TT+TC+TCAGG	8
05-166	VP24 5'trm6+	+T+TCAACC+T+TGAAACC+T+TGCG	9
05-164	VP24-8+	GCCA+TGG+T+T+T+T+TC+TCAGG	10
4538	L-AUG	TGGGTATGTTGTGTAGCCAT	11
06-125	L-2+	TGGGTATGTTGTG+TAGCCA+T	12
06-126	L-4a+	+TGGGTA+TGTTGTG+TAGCCA+T	13
06-127	L-4b+	TGGGTATG+TTG+TG+TAGCCA+T	14
05-165	VP24 5'trm	TTCAACCTTGAAACCTTGCG	15
<u>Secuencias de control</u>			
183	DSscr	AGTCTCGACTTGCTACCTCA	16
542	Scr	TGTGCTTACTGTTATACTACTC	17
<u>Secuencias de dirección a virus de la hepatitis C</u>			
4065	HCV-AUG	GTGCTCATGGTGCACGGTC	18
06-0143	HCV-2a+	G+TGC+TCATGGTGCACGGTC	19
06-0144	HCV-2b+	GTGCTCATGGTGC+ACGG+TC	20
06-0145	HCV-2c+	G+TGCTCATGGTGCACGG+TC	21
06-0146	HCV-2d+	GTGCTC+ATGGTGC+ACGGTC	22
06-0147	HCV-2e+	GTGCTCA+TGG+TGCACGGTC	23
06-0148	HCV-2f+	GTGCTC+A+TGGTGCACGGTC	24
06-0149	HCV-3g+	GTGCTCATGG+TGC+ACGG+TC	25
06-0150	HCV-3h+	GTGCTC+ATGGTGC+ACGG+TC	26
06-0151	HCV-3i+	G+TGCTCATGG+TGCACGG+TC	27
06-0152	HCV-4j+	GTGCTCA+TGG+TGC+ACGG+TC	28
06-0153	HCV-4k+	G+TGCTCA+TGG+TGCACGG+TC	29
06-0154	HCV-4l+	G+TGCTC+ATGGTGC+ACGG+TC	30
06-0155	HCV-5m+	G+TGC+TCA+TGG+TGCACGG+TC	31
06-0156	HCV.5n+	G+TGCTC+ATGG+TGC+ACGG+TC	32

ES 2 645 410 T3

N.º de ref. de AVI	Nombre	Secuencia (5 → 3')	SEQ ID NO.
06-0157	HCV-6o+	G+TGC+TCA+TGG+TGC+ACGG+TC	33
06-0158	HCV-7p+	G+TGC+TC+A+TGG+TGC+ACGG+TC	34
Secuencias de dirección a CYP3A2			
4472	CYP3A2	GAGCTGAAAGCAGGTCCATCCC	35
06-0136	CYP3A2-3a+	GAGCTGAAAGCAGG+TCC+A+TCCC	36
06-0137	CYP3A2-3b+	G+AGC+TG+AAAGCAGGTCCATCCC	37
06-0138	CYP3A2-3c+	GAGCTG+AAAGC+AGGTCC+ATCCC	38
06-0139	CYP3A2-3d+	GAGC+TGAAAGCAGG+TCCA+TCCC	39
06-0140	CYP3A2-3e+	GAGCTG+A+A+AGCAGGTCCATCCC	40
06-0141	CYP3A2-4f+	G+AGCTGA+AAGC+AGGTCC+ATCCC	41
06-0142	CYP3A2-6g+	G+AGCTG+A+A+AGC+AGGTCC+ATCCC	42
4126	c-Myc	ACGTTGAGGGGCATCGTCGC	43
4SA2ex	huCTLA	GCAGGCTGGGCCACGTGCATTG	44
4SA2sj	huCTLA	CACGTGCATTGCTAGCATGG	45
4SA2bp	huCTLA	CTAGCATGGAAAAGCCAAAG	46
4SA2in	huCTLA	GGAACTCAGTGAACCTCATGC	47
AUG1	huCD86	GTTACTCAGTCCCATAAGTGCTG	48
AUG2	huCD86	CCATAGTGCTGTCACAAATG	49
AUG3	huCD86	GAATGTTACTCAGTCCCATAG	50
Ex6sa	huCD86	GAGGCTGAGGGTCCCTCAAGCT	51
Ex6sd	huCD86	CACATTTATAAGAGTTGCGAGGC	52
Ex7sa	huCD86	TCCCTCTCCATTGTGTTGGTTC	53
Ex7sd	huCD86	CTTTTCTTGGTCTGTTCACTC	54
3'32	Picornaviridae	RYGGRACCRACCTACTTTGGGTGTCCGTG TTTC	55
5'32	Picornaviridae	TCCTCCGGCCCCCTGAATGYGGCTAAYCY YAAC	56
3'-CS	Flaviviridae	CATATTGA	57
mFlav	Flaviviridae	TCCCAGGTGTCAATATGCTGTT	58
Diana de c-Myc	c-Myc humano	CGCCGCTGCCAGGACCCGTTCTCTGAA AGGCTCTCCTTGCAGCTGCTTAGACGCT GGATTTTTTTTCGGGTAGTGAAAACCAG CAGCCTCCCGCAGCATGCCCTCAACG TTAGCTTCACCAA	59
c-MycB	hu-c-Myc	GGAGGCTGCTGGTTTTCCAC	60
c-MycC	hu-c-Myc	GGCATCGTCGCGGGAGGCTC	61
PV	Poliovirus	CCTGAGCACCCATTATGATAC	62
HAV	Hepatitis A	CCTTGTCTAGACATGTTCAATTATT	63
HRV-14	Rinovirus 14	TTGAGCGCCCATGATAACAA	64
HRV-16	Rinovirus 16	TTGAGCGCCCATGATAACAA	65
HRV-1B	Rinovirus 1B	CTGGGCACCCATGATGCCAA	66
Pan-1a	Vesivirus	GAGCCATAGCTCAAATTCTC	67
Pan-1b	Vesivirus	TAGCTCAAATTCTCATTTAC	68
Pan-1b	Vesivirus	GAGCGTTTGAGCCATAGCTC	69
PEC	Calicivirus porcino	GACGGCAATTAGCCATCACG	70
NV	Norovirus	CGACGCCATCATCATTAC	71
FCV	Calicivirus felino	CAGAGTTTGAGACATTGTCTC	72
HEVa	Virus de la hepatitis C	CCTTAATAAACTGATGGGCCTCC	73
HEVb	Virus de la hepatitis C	CTGATGGGCCTCCATGGC	74
VHC	Diana de VHC	AAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTC GCGAAAGGCCCTTGTGGTACTGCCTGATA GGGTGCTTGCAGTGCCTCCGGGAGGTCT CGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATC CTAAACCTCAAAG	75
VHC-IRES	VHC	GGCCTTTCGCGACCCAACAC	76
8070			
SLEV	Virus de la Encefalitis de San Luis	AGATGTTTCGCGTCCGGTGGAGCGGAGAGGA AACAGATTTCTC	77

ES 2 645 410 T3

N.º de ref. de AVI	Nombre	Secuencia (5 → 3')	SEQ ID NO.
JEV	Virus de la Encefalitis japonesa	AGAAGTTTATCTGTGTGAACCTTCTGGC TTAGTATCGTTG	78
MVEV	Virus de la Encefalitis del Valle de Murray	AGACGTTTCATCTGCGTGAGCTTCCGATC TCAGTATTGTTT	79
WNV	Virus del Nilo Occidental	AGTAGTTCGCCTGTGTGAGCTGACAAAC TTAGTAGTGTTT	80
YFV	Virus de la fiebre amarilla	AGTAAATCCTGTGTGCTAATTGAGGTGC ATTGGTCTGCAA	81
DEN2	Dengue de Tipo 2	AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAAG ACAGATTCTTTG	82
HCV	Virus de la Hepatitis C	GCCAGCCCCCTGATGGGGCGGACACTCC ACCATGAATCAC	83
TVEV	Virus de la Encefalitis transmitida por garrapatas	AGATTTTCTTGCACGTGCATGCGTTTGC TTCGGACAGCAT	84
OHFV	Virus de la fiebre hemorrágica de Omsk	AGATTTTCTTGCACGTGCGTGCGCTTGC TTCAGACAGCAA	85
POW	Virus de Powassan	AGATTTTCTTGCACGTGTGTGCGGGTGC TTTAGTCAGTGT	86
SLEVa	Virus de la Encefalitis de San Luis	ACCGACGCGAACATCNNC	87
SLEVb	Virus de la Encefalitis de San Luis	TCCTCTCCGCTCACCGACGC	88
JEVa	Virus de la Encefalitis japonesa	TCACACAGATAAACTTCT	89
LEVY	Virus de la Encefalitis japonesa	AAGCCAAGAAGTTCACACAG	90
MVEVa	Virus de la Encefalitis del Valle de Murray	TCACGCAGATGAACGTCT	91
MVEVb	Virus de la Encefalitis del Valle de Murray	GAGATCGGAAGCTCACGCAG	92
WNVa	Virus del Nilo Occidental	GCTCACACAGGCGAACTACT	93
WNVb	Virus del Nilo Occidental	TAAGTTTGTGAGCTCACACAG	94
YFVa	Virus de la fiebre amarilla	CAATTAGCACACAGGATTTACT	95
YFVb	Virus de la fiebre amarilla	TTGCAGACCAATGCACCTCA	96
DEN2a	Dengue de Tipo 2	GTCCACGTAGACTAACAACCT	97
DEN2b	Dengue de Tipo 2	GTCTTTGTGCGTCCACGTAG	98
HCVa	Virus de la Hepatitis C	CCCATCAGGGGGCTGGC	99
HCVb	Virus de la Hepatitis C	TGGAGTGTGCCCCCATCAG	100
TVEVa	Virus de la Encefalitis transmitida por garrapatas	ATGCACGTGCAAGAAAATCT	101
TBEVb	Virus de la Encefalitis transmitida por garrapatas	ATGCTGTCCGAAGCAAACGC	102
OHFVa	Virus de la fiebre hemorrágica de Omsk	CACGCACGTGCAAGAAAATCT	103
OHFVb	Virus de la fiebre hemorrágica de Omsk	TGAAGCAAGCGCACGCAGT	104
POWa	Virus de Powassan	ACACACGTGCAAGAAAATCT	105
POWb	Virus de Powassan	ACAGTGAATAAGCACCCGC	106
PV	Poliovirus	a	107
HEV-A	Enterovirus humano A	a	108
HEV-B	Enterovirus humano B	a	109

ES 2 645 410 T3

N.º de ref. de AVI	Nombre	Secuencia (5 → 3')	SEQ ID NO.
JEV-C	Enterovirus humano C	a	110
HEV-D	Enterovirus humano D	a	111
HEV-E	Enterovirus humano E	a	112
BEV	Enterovirus bovino	a	113
HRV-89	Rinovirus humano 89	a	114
HRV-B	Rinovirus humano B	a	115
FMDV	Virus de la glosopeda	a	116
HAV	Hepatitis A	a	117
PVa	Poliovirus	GGTACAACCCAGAGCTGTTTTAA	118
PVb	Poliovirus	GTGGGCCTCTGGGGTGGGTA	119
HEV-A1	Enterovirus humano A	CAACCCACAGGCTGTTTTAA	120
HEV-A2	Enterovirus humano A	GTGGGCCCTGTGGGTGGGTA	121
HEV-B1	Enterovirus humano B	CAACCGACAGGCTGTTTTAA	122
HEV-B2	Enterovirus humano B	AATGGGCCTGTGGGTGGGAA	123
HEV-C1	Enterovirus humano C	CAACCCACAGGCTGTTTTAA	124
HEV-C2	Enterovirus humano C	GTGGGCCTCTGGGGTGGGAG	125
HEV-D1	Enterovirus humano D	CAACCCACAGGCTGTTTTAA	126
HBV-D2	Enterovirus humano D	GTGGGCCTCTGGGGTGGGAA	127
HEV-E	Enterovirus humano E	CCTGTTGGGTGGGAACACTC	128
HEV-E	Enterovirus humano E	AGAGTACAACCCAGTGGG	129
BEVa	Enterovirus bovino	CAACCCACAGGCTGTTTTAA	130
BEVb	Enterovirus bovino	GTGGGCCCCAGGGTGGGTA	131
HRV-89a	Rinovirus humano 89	CAACCCATCCAGTTTTAA	132
HRV-89b	Rinovirus humano 89	ATGGGTGGAGTGAGTGGGAA	133
HRV-B1	Rinovirus humano B	ATACCCATCCGCTGTTTTAA	134
HRV-B2	Rinovirus humano B	CCAATGGGTCTGAATGGTGGG	135
FMDVa	Virus de la glosopeda	AACCCTAGGCCCCCTTTCAA	136
FMDVb	Virus de la glosopeda	GTTGGCATGCTAGGGGTGAA	137
HAVa	Hepatitis A	TCCCGGAGACCCCTCTTGAA	138
NAVb	Hepatitis A	CCAAGAGGGACTCCGGAAAT	139
FCV	Calicivirus felino	GTAAAAGAAATTTGAGACAAATGTCTCAA ACTCTGAGCTTC	140
CaCV	Calicivirus canino	GTTAATGAGAAATGGCTTCTGCCATCGC TCTCTCGAGCTC	141
PoCV	Calicivirus entérico porcino	GTGATCGTGATGGCTAATGCCGTCGGT TGCCTATTGGGC	142
CVNB	Cepas de Calicivirus NB	GTGATTTAATTATAGAGAGATAGTGA TTCACTTTTCTT	143
NV	Virus de Norwalk	GTGAATGATGATGGCGTCAAAGACGTC GTTCTACTGCT	144
FCVa	Calicivirus felino	TTGTCTCAAATTTCTTTTAC	145
PCVb	Calicivirus felino	GAAGCTCAGAGTTTGAGACA	146
CaCVa	Calicivirus canino	AGAAGCCATTTCTCATTAAAC	147
CaCVb	Calicivirus canino	GAGCTCGAGAGAGCGATGGC	148
PoCVa	Calicivirus entérico porcino	CAATTAGGCATCACGATCAC	149
PoCVb	Calicivirus entérico porcino	GGCALACGGACGGCAATTAGC	150
CVNBa	Cepa de calicivirus NB	TCTCTCTATAATTAATCAC	151
CVNBb	Cepa de calicivirus NB	AAAGTCACTATCTCTCTATA	152
NVa	Virus de Norwalk	TTGACGCCATCATCATTAC	153
NVb	Virus de Norwalk	AGCAGTAGGAACGACGTCTT	154
HEV	Virus de la Hepatitis E	GCCATGGAGGCCCATCAGTTTATTAAGG CTCCTGGCATCA	155
HEVa	Virus de la Hepatitis E	AACTGATGGGCCTCCATGGC	156
HEVb	Virus de la Hepatitis E	TGATGCCAGGAGCCTTAATA	157
RUBV	Virus de la rubeola	ATGGAAGCTATCGGACCTCGCTTAGGAC	158

ES 2 645 410 T3

N.º de ref. de AVI	Nombre	Secuencia (5 → 3')	SEQ ID NO.
		TCCCATTCCCAT	
EEEV	Encefalitis equina oriental	ATAGGGTACGGTGTAGAGGCAACCACCC TATTTCCACCTA	159
WEEV	Encefalomiелitis equina occidental	ACCCTACAACTAATCGATCCAATATGG AAAGAATTCACG	160
VEEV	Encefalitis equina venezolana	ATGGGCGGCGCAAGAGAGAAGCCCAAAC CAATTACCTACC	161
RUBVa	Virus de la rubeola	CGAGGTCCGATAGCTTCCAT	162
RUBVb	Virus de la rubeola	ATGGGAATGGGAGTCCTAAG	163
EEEVa	Encefalitis equina oriental	GCCTCTACACCGTACCCTAT	164
EEEVb	Encefalitis equina oriental	TAGGTGGAAATAGGGTGGTT	165
WEEVa	Encefalomiелitis equina occidental	GATCGATTAGTTTGTAGGGT	166
WEEVb	Encefalomiелitis equina occidental	CGTGAATTCTTTCCATATTG	167
VEEVa	Encefalitis equina venezolana	TTCTCTTTCGCGCCGCCAT	168
VEEVb	Encefalitis equina venezolana	GGTAGGTAATTGGTTTGGGC	169
SARS-CoV	Coronavirus de SARS	ATATTAGGTTTTTACCTACCCAGGAAA GCCAACCAACCT	170
PEDV	Virus de la diarrea epidémica porcina	ACTTAAAAAGATTTTCTATCTACGGATA GTTAGCTCTTTT	171
TGEV	Gastroenteritis transmisible	ACTTTTAAAGTAAAGTGAGTGTAGCGTG GCTATATCTCTT	172
BCoV	Coronavirus bovino	GATTGCGAGCGATTTGCGTGCCTGCATC CCGCTTCACTGA	173
UCoV-229E	Coronavirus humano 229E	ACTTAAAGTACCTTATCTATCTACAGATA GAAAAGTTGCTT	174
MHV	Hepatitis murina	TATAAGAGTGATTGGCGTCCGTACGTAC CCTCTCAACTCT	175
PRRSV	Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino	ATGACGTATAGGTGTTGGCTCTATGCCT TGGCATTGTAT	176
SARS-CoVa	Coronavirus de SARS	GGTAGGTAACCACTAATAT	177
SARS-CoVb	Coronavirus de SARS	AGGTTGGTTGGCTTTTCTG	178
PEDVa	Virus de la diarrea epidémica porcina	GATAGAAAATCTTTTAAAGT	179
PEDVb	Virus de la diarrea epidémica porcina	AAAAGAGCTAACTATCCGTA	180
TGEVa	Gastroenteritis transmisible	ACTCACTTTACTTTAAAAGT	181
TGEVb	Gastroenteritis transmisible	GCCACGCTACACTCACTTA	182
BCoVa	Coronavirus bovino	CACGCAATCGCTCGCAATC	183
BCoVb	Coronavirus bovino	TCAGTGAAGCGGGATGCACG	184
HCoV-229Ea	Coronavirus humano 229E	GATAGATAAGGTACTTAAAGT	185
HCoV-229Eb	Coronavirus humano 229E	AAGCAACTTTTCTATCTGTA	186
MHVa	Hepatitis murina	CGGACGCCAATCACTCTTATA	187
MHVb	Hepatitis murina	GAGTTGAGAGGGTACGTACGGA	188
PRRSVa	Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino	CATAGAGCCAACACCTATACG	189
PRRSVb	Virus del síndrome	ATACAAATGCCAAGGCATAG	190

ES 2 645 410 T3

N.º de ref. de AVI	Nombre	Secuencia (5 → 3')	SEQ ID NO.
	reproductor y respiratorio porcino		
HAsV	Astrovirus humano	CCAAGAGGGGGTGGTATTGGCCTTTG GCTTATCAGTGT	191
EAV	Arteritis equina	GCTCGAAGTGTGTATGGTGCCATATACG GCTCACCACCAT	192
HAsVa	Astrovirus humano	AATCACCACCCCCTCTGG	193
HAsVb	Astrovirus humano	GCCAAAGGCCAATCACCACC	194
EAVa	Arteritis equina	GCACCATACACACTTCGAGC	195
EAVb	Arteritis equina	ATGGTGGTGAGCCGTATATG	196
8063			
Vif-AUGc	Diana de Vif de VIH-1	GACTATGGAAAACAGATGGCAGGTGAT GATTGT	197
TARc	Diana de TARf de VIH-1	GACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCT GGCTAAC	198
U3Rc	Diana de U3R de VIH- 1	CCTGTACTGGGTCTCTCTGG	199
Vif-AUG4	VIH-1	CCTGCCATCTGTTTTCCATAATC	200
Vif AUG56	VIH-1	CACCTGCCATCTGTTTTCCATA	201
Vif-AUG4+	VIH-1	CCTGCC+ATC+TGT+TTTCC+ATA+ATC	202
Vif AUG56+	VIH-1	CACCTGCCATCTGT+T+TTCC+A+TA	203
Tar1	VIH-1	GCTCCCAGGCTCAGATCTGGTC	204
Tar2	VIH-1	GTTAGCCAGAGAGCTCCCAGGC	205
U3R	VIH-1	CCAGAGAGACCCAGTACAGG	206
8064			
HCoV-229Ec	Diana de HCoV-229E	ICUACUUUUCUCAACUAAACGAAAU	207
HCoV-OC43c	Diana de HCoV-OC43	GAUCUUUUUGUAAUCUAAACUUUA	208
SARS-CoVc	Diana de SARS-CoV	GAUCUGUUCUCUAAACGAACUUUA	209
HCoV-229Ea	HCoV-229E TRS	ATTTCTTTAGTTGAGAAAAG	210
HCoV-229Eb	HCoV-229E TRS	GTTTAGTTGAGAAAAGTAG	211
HCoV-OC43	HCoV-OC43 TRS	TAAAGTTTAGATTACAAAAG	212
SARS-CoVa	SARS-CoV TRS	TAAAGTTCTTTAGAGAACAG	213
SARS-CoVb	SARS-CoVTRS	GTTCTTTAGAGAACAGATC	214
8065			
ARNm de CD86 I	CD86 humano	AGGAGCCTTAGGAGGTACGGGGAGCTCG	215

N.º de ref. de AVI	Nombre	Secuencia (5 → 3')	SEQ ID NO.
		CAAATACTCCTTTTGGTTTATTCTTACC ACCTTGCTTCTGTGTTCCCTGGGAATGC TGCTGTGCTTATGCATCTGGTCTCTTTT TGGAGCTACAGTGGACAGGCATTTGGA CAGCACTATGGGACTGAGTAACATTCTC TTTGTGATGGCCTTCCTGCTCTCTGGTG CTGCTCCTCTGAAGATTCAAGCTTATTT CAATGAGACTGCAGACCTGCCATGCCAA TTTGCAAACCTCTCAAACCAAAGCCTGA GTGAGCTAGTAGTATTTTGGCAGGACCA GGAAAACCTGGTTCCTGAATGAGGTATAC TTAGGCAAAGAGAAATTTGACAGTGTTT ATTCCAAGTATATGGGCCGCACAAGTTT TGATTCGGACAGTTGGACCCTGAGACTT CACAATCTTCAGATCAAGGACAAGGGCT TGTATCAATGTATCATCCATCACAAAA GCCCACAGGAATGATTTCGCATCCACCAG ATGAATCTGAACTGTCAGTGCTTGCTA ACTTCAGTCAACCTGAAATAGTACCAAT TTCTAATATAACAGAAAATGTGTACATA AATTTGACCTGCTCATCTATACACGGTT ACCCAGAACCTAAGAAGATGAGTGTTT GCTAAGAACCAAGAATTCAACTATCGAG TATGATGGTATTATGCAGAAATCTCAAG ATAATGTCACAGAAGTGTACGACGTTT CATCAGCTTGTCTGTTTCATTCCCTGAT GTTACGAGCAATATGACCATCTTCTGTA TTCTGGAAACTGACAAGACGCGGCTTTT ATCTTCACCTTTCTCTATAGAGCTTGAG GACCCCTCAGCCTCCCCCAGACCACATTC CTTGGATTACAGCTGTACTTCCAACAGT TATTATATGTGTGATGGTTTTCTGTCTA ATTCTATGGAAATGGAAGAAGAAGAAGC GGCCTCGCAACTCTTATAAATGTGGAAC CAACACAATGGAGAGGGAAGAGAGTGAA CAGACCAAGAAAAGAGAAAAAATCCATA TACCTGAAAGATCTGATGAAGCCCAGCG TGTTTTTAAAAGTTTGAAGACATCTTCA TGCGACAAAAGTGATACATGTTTTTAAT TAAAGAGTAAAGCCCATAAAGTATTCA TTTTTTCTACCCTTTCCTTTGTAAGTTC CTGGGCAACCTTTTTGATTTCTTCCAGA AGGCAAAAAGACATTACCATGAGTAATA AGGGGGCTCCAGGACTCCCTCTAAGTGG AATAGCCTCCCTGTAACCTCAGCTCTGC TCCGTATGCCAAGAGGAGACTTTAATTC TCTTACTGCTTCTTTTCACTTCAGAGCA CACTTATGGGCCAAGCCCAGCTTAATGG CTCATGACCTGGAAATAAAATTTAGGAC CAATACCTCCTCCAGATCAGATTCTTCT CTTAATTTTCATAGATTGTGTTTTTTTTT AAATAGACCTCTCAATTTCTGGAAAAC	

N.º de ref. de AVI	Nombre	Secuencia (5 → 3')	SEQ ID NO.
		<p>GCCTTTTATCTGCCAGAATTCTAAGCT GGTGCCCACTGAATCTTGTGTACCTGT GACTAAACAACCTCCTCAGTCTGGG TGGGACTTATGTATTTATGACCTTATAG TGTTAATATCTTGAAACATAGAGATCTA TGTAAGTAAATAGTGTGATTACTATGCT CTAGAGAAAAGTCTACCCCTGCTAAGGA GTTCTCATCCCTCTGTCAGGGTCAGTAA GGAAAACGGTGGCCTAGGGTACAGGCAA CAATGAGCAGACCAACCTAAATTTGGGG AAATTAGGAGAGGCAGAGATAGAACCTG GAGCCACTTCTATCTGGGCTGTTGCTAA TATTGAGGAGGCTTGCCCCACCCAACAA GCCATAGTGGAGAGAAGTGAATAAACAG GAAAATGCCAGAGCTTGTGAACCCTGTT TCTCTGAAGAAGTACTAGTGTGAGATGG CCTGGGGAAGCTGTGAAAGAACCAAAAG AGATCACAATACTCAAAGAGAGAGAGA GAGAAAAAGAGAGATCTTGATCCACAG AAATACATGAAATGTCTGGTCTGTCCAC CCCATCAACAAGTCTTGAAACAAGCAAC AGATGGATAGTCTGTCCAAATGGACATA AGACAGACAGCAGTTTCCCTGGTGGTCA GGGAGGGGTTTTGGTGATACCCAAGTTA TTGGGATGTCATCTTCCCTGGAAGCAGAG CTGGGGAGGGAGAGCCATCACCTTGATA ATGGGATGAATGGAAGGAGGCTTAGGAC TTTCCACTCCTGGCTGAGAGAGGAAGAG CTGCAACGGAATTAGGAAGACCAAGACA CAGATCACCCGGGGCTTACTTAGCCTAC AGATGTCCTACGGGAACGTGGGCTGGCC CAGCATAGGGCTAGCAAATTTGAGTTGG ATGATTGTTTTTGCTCAAGGCAACCAGA GGAACTTGCATACAGAGACAGATATAC TGGGAGAAATGACTTTGAAAACCTGGCT CTAAGGTGGGATCACTAAGGGATGGGGC AGTCTCTGCCCAAACATAAAGAGAACTC TGGGGAGCCTGAGCCACAAAATGTTCC TTTATTTTATGTAAACCCTCAAGGGTTA TAGACTGCCATGCTAGACAAGCTTGTCC ATGTAATATTCCCATGTTTTTACCCTGC CCCTGCCTTGATTAGACTCCTAGCACCT GGCTAGTTTCTAACATGTTTTGTGCAGC ACAGTTTTTAATAAATGCTTGTTACATT C</p>	

ES 2 645 410 T3

<u>N.º de ref. de AVI</u>	<u>Nombre</u>	<u>Secuencia (5 → 3')</u>	<u>SEQ ID NO.</u>
AUG de CD86	Diana de AUG de CD86 Humano	CATTTGTGACAGCACTATGGGACTGAGT AACATTCTCTTTGTGATG	216
Ex6sa	Diana de Ex6 de huCD86	AGCTTGAGGACCCTCAGCCTC	217
Ex6sd	Diana de Ex6 de huCD86	GCCTCGCAACTCTTATAAATGTG	218
Ex7sa	Diana de Ex7 de huCD86	GAACCAACACAATGGAGAGGGA	219
Ex7sd	Diana de Ex7 de huCD86	GAGTGAACAGACCAAGAAAAG	220
8071			
PB1-AUG	Diana de AUG de PB1 de FluA	AGCGAAAGCAGGCAAACCAUUUGAAUGG AUGUCAUCCGACCUUACUUU	221
NP-v3'	Diana de extremo 3' de NP de FluA	AGTGATTATCTACCCTGCTTTTGCT	222
AVI-4164	Extremo 3' de NP	AGCAAAAGCAGGGTAGATAATC	223
AVI-4235	PB1-AUG	GACATCCATTCAAATGGTTTG	224
8073			

N.º de ref. de AVI	Nombre	Secuencia (5 → 3')	SEQ ID NO.
ARN de miostatina	ARN de miostatina humana	<p>AGATTCAC TGGTGTGGCAAGTTGTCTCT CAGACTGTACATGCATTA AAAATTTTGCT TGGCATTACTCAAAGCAAAGAAAAGT AAAAGGAAGAAACAAGAACAAAGAAAA GATTATATTGATTTTAAAATCATGCAA AACTGCAACTCTGTGTTTATATTTACCT GTTTATGCTGATTGTTGCTGGTCCAGTG GATCTAAATGAGAACAGTGAGCAAAAAG AAAATGTGGAAAAGAGGGGCTGTGTAA TGCATGTACTTGGAGACAAAACACTAAA TCTTCAAGAATAGAAGCCATTAAGATAC AAATCCTCAGTAACTTCGTCTGGAAC AGCTCCTAACATCAGCAAAGATGTTATA AGACAAC TTTTACCCAAAGCTCCTCCAC TCCGGAACTGATTGATCAGTATGATGT CCAGAGGGATGACAGCAGCGATGGCTCT TTGGAAGATGACGATTATCACGCTACAA CGGAAACAATCATTACCATGCCTACAGA GTCTGATTTTCTAATGCAAGTGGATGGA AAACCCAAATGTTGCTTCTTTAAATTTA GCTCTAAAATACAATACAATAAAGTAGT AAAGGCCCAACTATGGATATATTTGAGA CCCGTCGAGACTCCTACAACAGTGT TTG TGCAAATCCTGAGACTCATCAAACCTAT GAAAGACGGTACAAGGTATACTGGAATC CGATCTCTGAACTTGACATGAACCCAG GCACTGGTATTTGGCAGAGCATTGATGT GAAGACAGTGTGCAA AATTGGCTCAA CAACCTGAATCCA ACTTAGGCATTGAAA TAAAAGCTTTAGATGAGAATGGTCATGA TCTTGCTGTAACCTTCCCAGGACCAGGA GAAGATGGGCTGAATCCGTTTTTAGAGG TCAAGGTAACAGACACACCAA AAGATC CAGAAGGGATTTTGGTCTTGACTGTGAT GAGCACTCAACAGAATCACGATGCTGTC GTTACCCTCTAACTGTGGATTTTGAAGC TTTTGGATGGGATTGGATTATCGCTCCT AAAAGATATAAGGCCAATTACTGCTCTG GAGAGTGTGAATTTGTATTTTACAAA ATATCCTCATACTCATCTGGTACACCAA GCAAACCCAGAGGTT CAGCAGGCCCTT GCTGTACTCCCACAAAGATGTCTCCAAT TAATATGCTATATTTTAAATGGCAAAGAA</p>	225

N.º de ref. de AVI	Nombre	Secuencia (5 → 3')	SEQ ID NO.
		<p>CAAATAATATATGGGAAAATTCCAGCGA TGGTAGTAGACCGCTGTGGGTGCTCATG AGATTTATATTAAGCGTTCATAACTTCC TAAAACATGGAAGGTTTTCCCTCAACA ATTTTGAAGCTGTGAAATTAAGTACCAC AGGCTATAGGCCTAGAGTATGCTACAGT CACTTAAGCATAAGCTACAGTATGTAAA CTAAAAGGGGAATATATGCAATGGTTG GCATTTAACCATCAAACAATCATACA AGAAAGTTTTATGATTTCCAGAGTTTTT GAGCTAGAAGGAGATCAAATTACATTTA TGTTCCCTATATATTACAACATCGGCGAG GAAATGAAAGCGATTCTCCTTGAGTTCT GATGAATTAAGGAGTATGCTTTAAAGT CTATTTCTTTAAAGTTTTGTTTAATATT TACAGAAAATCCACATACAGTATTGGT AAAATGCAGGATTGTTATATACCATCAT TCGAATCATCCTTAAACACTGAATTTA TATTGTATGGTAGTATACTTGGTAAGAT AAAATCCACAAAAATAGGGATGGTGCA GCATATGCAATTTCCATCCTATTATAA TTGACACAGTACATTAACAATCCATGCC AACGGTGCTAATACGATAGGCTGAATGT CTGAGGCTACCAGGTTTATCACATAAAA AACATTCAGTAAAATAGTAAGTTTCTCT TTTCTTCAGGGGCATTTTCTACACCTC CAAATGAGGAATGGATTTTCTTTAATGT AAGAAGAATCATTFTTCTAGAGGTTGGC TTTCAATTCTGTAGCATACTTGGAGAAA CTGCATTATCTTAAAAGGCAGTCAAATG GTGTTTGTTTTTATCAAATGTCAAAT AACATACTTGGAGAAGTATGTAATTTTG TCTTTGGAAAATTACAACACTGCCTTTG CAACACTGCAGTTTTTATGGTAAAATAA TAGAAATGATCGACTCTATCAATATTGT ATAAAAGACTGAAACAATGCATTTATA TAATATGTATACAATATTGTTTTGTAAA TAAGTGTCTCCTTTTTTATTTACTTTGG TATATTTTTACACTAAGGACATTTCAA TTAAGTACTAAGGCACAAAGACATGTCA TGCATCACAGAAAAGCAACTACTTATAT TTCAGAGCAAATTAGCAGATTAATAGT GGTCTTAAAACCTCCATATGTTAATGATT AGATGGTTATATTACAATCATTTTATAT TTTTTTACATGATTAACATTCACTTATG GATTCATGATGGCTGTATAAAGTGAATT TGAATTTCAATGGTTTACTGTCATTGT GTTTAAATCTCAACGTTCCATTATTTTA ATACTTGCAAAAACATTAAGTATAC CAAAATAATGACTCTATTATCTGAAAT GAAGAATAAAGTATGCTATCTCAACAA TAACTGTTACTTTTATTTTATAATTGA</p>	

N.º de ref. de AVI	Nombre	Secuencia (5 → 3')	SEQ ID NO.
		TAATGAATATATTTCTGCATTTATTTAC TTCTGTTTTGTAAATTGGGATTTTGTTA ATCAAATTTATTGTACTATGACTAAATG AAATTATTTCTTACATCTAATTTGTAGA AACAGTATAAGTTATATTAAAGTGTTTT CACATTTTTTTGAAAGACAAAA	
Diana de MSTN-SD1	Diana de miostatina SD1 humana	ACAATCATTACCATGCCTACAGAGT/GT AAGTAGTCCTATTAGTGTATATC	226
Diana de MSTN-SD2	Diana de miostatina SD2 humana	CTTTTCTTTTCTTATTCATTTATAG/CT GATTTTCTAATGCAAGTGGATGG	227
Diana de MSTN-SA2	Diana de miostatina SA2 humana	CCCAGGACCAGGAGAAGATGGGCTG/GT AAGTGATAACTGAAAATAACATT	228
Diana de MSTN-SA3	Miostatina SA3 humana	TGATTGTTCTTTCTTTTCAAACAG/AA TCCGTTTTTAGAGGTCAAGGTAA	229
MSTN-SD1	Miostatina SD1 humana	ACTCTGTAGGCATGGTAATG	230
MSTN-SD2	Miostatina SD2 humana	CAGCCCATCTTCTCCTGG	231
MSTN-SA2	Miostatina SA2 humana	CACTTGCATTAGAAAATCAG	232
MSTN-SA3	Miostatina SA3 humana	CTTGACCTCTAAAAACGGATT	233
8077 y 8078			
5'-32	Diana de 32 IRES 5'	GTTGGGRTRGCCGCATTCAGGGGCCGG AGGA	234
PV444	PMO de 32 IRES 5'	CCGCATTCAGGGGCCGGAGG.	235
PV449	PMO de 32 IRES 5'	GGATTAGCCGCATTCAGGGGCC	236
PV454	PMO de 32 IRES 5'	GTTGGGATTAGCCGCATTCAG	237
3'-37	Diana de 37 IRES 3'	AAAANGAAACACGGACACCCAAAGTAGT CGGTTCCGC	238
PV533	PMO de 32 IRES 5'	CACCCAAAGTAGTCGGTTCC	239
PV539	PMO de 32 IRES 5'	CACGGACACCCAAAGTAGTC	240
PV544	PMO de 32 IRES 5'	GGAAACACGGACACCCAAAG	241
PV548	PMO de 32 IRES 5'	AAAAGGAAACACGGACACCC	242
CVB3-548	PMO de 32 IRES 5'	ATGAAACACGGACACCCAAAG	243
EnteroX	PMO de 32 IRES 5'	GAAACACGGACACCCAAAGTAG	244
HRV14-IRES	PMO de 32 IRES 5'	GAGAAACACGGACACCCAAAGTAG	245
8079			
huCTLA-4SA2sj	Región diana de punto de unión de corte y empalme de CTLA-4 humano	GCATGAGTTCACTGAGTTCCTTTGGCT TTTCCATGCTAGCAATGCACGTGGCCCA GCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA GGCATCGCCAGCTTTG	246
TGF-β [8039]			
		GAGGGCGGCA TGGGGGAGGC	247
		GACCCATGGC AGCCCCGTC G	248
		GCAGCAGTTC TTCTCCGTGG	249
8072			
EBOV AUG	VP35-AUG Diana de VP35-AUG	AAUGAUGAAGAUUAAAACCUUCAUCAUC CUUACGUCAAUUGAAUUCUCUAGCACUC GAAGCUAAUUGUCUCAAUGUAAAAGAA AAGCUGGUCUAAACAUGACAACUAGA ACAAAGGGCAGGG	250

ES 2 645 410 T3

N.º de ref. de AVI	Nombre	Secuencia (5 → 3')	SEQ ID NO.
EBOV VP24-AUG	Diana de VP24-AUG	CGUUCCAACAAUCGAGCGCAAGGUUJCA AGGUUGAACUGAGAGUGUCUAGACAACA AAAUUUUGAUACUCCAGACACCAAGCAA GACCUGAGAAAAAACAUGGCUAAAGCU ACGGGACGAUACA	251
EBOV L-AUG	Diana de L-AUG	GUAGAUUAAGAAAAAAGCCUGAGGAAGA UUAAGAAAAACUGCUUAUUGGGUCUUUC CGUGUUUUAGAUGAAGCAGUUGAAAUUC UCCUCUUGAUUUAAAUGGCUACACAA CAUACCCAAUAC	252
MARV VP35-AUG	Diana de VP35-AUG	CUAAAAUUCGAAAGAAUUAUAAAGGUUUU CUUUAAUUAUUCAGAAAAGGUUUUUUUAU CUCUUCUUUCUUUUUGCAAACAUUUGA AAUAAUAAUUUCACAAUGUGGGACUCA UCAUUAUUGCAAC	253
MARV VP24-AUG	Diana de VP24-AUG	UUCAUUCAAACACCCCAAUUUUCUAUC AUACACAUAAUAACCAUUUAGUAGCGU UACCUUUCAAUACAAUCUAGGUGAUUGU GAAAAGACUUCCAAACAUGGCAGAAUUA UCAACGCGUUACA	254
MARV L-AUG	Diana de L-AUG	UCAUUCUCUUCGAUACACGUUAUAUCUU UAGCAAAGUAAUGAAAAUAGCCUUGUCA UGUUAGACGCCAGUUAUCCAUCUUAAGU GAAUCCUUCUUCAAUUGCAGCAUCCA ACUCAAUUCCUG	255
VP35-AUG	MARV 2932-2952	GTCCACATTGTGAAAATTAT	256
VP35+7-AUG	MARV 2950-2971	CTTGTTCATATATGATGAGTC	257
VP24+5-AUG	MARV 10209-10231	GTTGTAACGCGTTGATAATTCTG	258
L-AUG	11467-11485	GCTGCATATTGAAGAAAGG	259
L+7-AUG	11485-11506	CATCAGGATATTGAGTTGGATG	260
Arenavirus (8080)			
ARNv de Arenavirus		CGC ACM GDG GAT CCT AGG C	261
CL-trm	NC_005080	CGC CTA GGA TCC CCG GTG CG	262
Us-trim	NC_005080	TGC CTA GGA TCC CCG GTG CGC	263
SS-trm	NC_005081	GCC TAG GAT CCA CTG TGC GC	264
PanCL	N/D	GCC TAG GAT CCI CIG TGC G	265
PanLS	N/D	CGC CTA GGA TCC ICI GTG CG	266
Flavivirus (8059)	5'CS y 3'CS		
Encefalitis de San Luis; encefalitis del Valle de Murray; Nilo Occidental; Kunjin		GUCAAUAUGC UAAAACGCGG	267
Encefalitis japonesa		AUCAAUAUGCUGAAACGCGG	268
Fiebre amarilla		GUCAAUAUGGUACGACGAGG	269
Dengue de Tipo 1 Dengue de Tipo 2 Dengue de Tipo 4		CUUUCAAUAUGCUGAAACGCG	270
Dengue de Tipo 3		CUAUCAAUAUGCUGAAACGCG	271
Encefalitis		CAGCUUAGGAGAACAAGAGCUG	272

<151> 10-05-2006

<150> US 11/432.155
<151> 10-05-2006

5

<150> US 11/431.968
<151> 10-05-2006

<150> US 11/433.257
<151> 11-05-2006

10

<150> US 60/799.976
<151> 11-05-2006

<150> US 60/800.145
<151> 11-05-2006

15

<150> US 11/433.213
<151> 11-05-2006

20

<150> US 11/433.214
<151> 11-05-2006

<150> US 11/432.033
<151> 11-05-2006

25

<150> US 11/433.840
<151> 11-05-2006

<150> US 11/433.724
<151> 11-05-2006

30

<150> US 60/800.076
<151> 11-05-2006

35

<150> US 60/800.120
<151> 11-05-2006

<150> US 11/518.058
<151> 08-09-2006

40

<150> US 11/517.757
<151> 08-09-2006

<150> US 11/595.161
<151> 08-11-2006

45

<150> US 11/715.712
<151> 07-03-2007

50

<160> 302

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Virus del Ébola

55

<400> 1
cctgcccttt gttctagttg 20

60

<210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Virus del Ébola

65

ES 2 645 410 T3

	<400> 2 cctgcccttt gttctagtgtg	20
5	<210> 3 <211> 20 <212> ADN <213> Virus del Ébola	
10	<400> 3 cctgcccttt gttctagtgtg	20
15	<210> 4 <211> 20 <212> ADN <213> Virus del Ébola	
20	<400> 4 cctgcccttt gttctagtgtg	20
25	<210> 5 <211> 19 <212> ADN <213> Virus del Ébola	
30	<400> 5 gccatggttt ttctcagg	19
35	<210> 6 <211> 19 <212> ADN <213> Virus del Ébola	
40	<400> 6 gccatggttt ttctcagg	19
45	<210> 7 <211> 19 <212> ADN <213> Virus del Ébola	
50	<400> 7 gccatggttt ttctcagg	19
55	<210> 8 <211> 19 <212> ADN <213> Virus del Ébola	
60	<400> 8 gccatggttt ttctcagg	19
65	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> Virus del Ébola	
	<400> 9 tcaaccttg aaaccttgcg	20
60	<210> 10 <211> 19 <212> ADN <213> Virus del Ébola	
65	<400> 10 gccatggttt ttctcagg	19

ES 2 645 410 T3

5	<210> 11 <211> 20 <212> ADN <213> Virus del Ébola	
	<400> 11 tgggtatggt gtgtagccat	20
10	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> Virus del Ébola	
	<400> 12 tgggtatggt gtgtagccat	20
20	<210> 13 <211> 20 <212> ADN <213> Virus del Ébola	
	<400> 13 tgggtatggt gtgtagccat	20
25	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> Virus del Ébola	
	<400> 14 tgggtatggt gtgtagccat	20
35	<210> 15 <211> 20 <212> ADN <213> Virus del Ébola	
	<400> 15 ttcaaccttg aaacctgcg	20
45	<210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> Fuente <223> /nota - "Descripción de secuencia artificial: oligómero sintético" <400> 16 agtctcgact tgctacctca	20
55	<210> 17 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligómero sintético	
60	<400> 17 tgtgcttact gttatactac	22
65	<210> 18 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	

	<400> 18 gtgctcatgg tgcacggtc	19
5	<210> 19 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
10	<400> 19 gtgctcatgg tgcacggtc	19
15	<210> 20 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
20	<400> 20 gtgctcatgg tgcacggtc	19
25	<210> 21 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
30	<400> 21 gtgctcatgg tgcacggtc	19
35	<210> 22 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
40	<400> 22 gtgctcatgg tgcacggtc	19
45	<210> 23 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
50	<400> 23 gtgctcatgg tgcacggtc	19
55	<210> 24 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
60	<400> 24 gtgctcatgg tgcacggtc	19
65	<210> 25 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 25 gtgctcatgg tgcacggtc	19
60	<210> 26 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
65	<400> 26 gtgctcatgg tgcacggtc	19

ES 2 645 410 T3

5	<210> 27 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 27 gtgctcatgg tgcacggtc	19
10	<210> 28 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 28 gtgctcatgg tgcacggtc	19
15	<210> 29 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 29 gtgctcatgg tgcacggtc	19
20	<210> 30 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 30 gtgctcatgg tgcacggtc	19
25	<210> 31 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 31 gtgctcatgg tgcacggtc	19
30	<210> 32 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 32 gtgctcatgg tgcacggtc	19
35	<210> 33 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 33 gtgctcatgg tgcacggtc	19
40	<210> 34 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 34 gtgctcatgg tgcacggtc	19
45	<210> 35 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 35 gtgctcatgg tgcacggtc	19
50	<210> 36 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 36 gtgctcatgg tgcacggtc	19
55	<210> 37 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 37 gtgctcatgg tgcacggtc	19
60	<210> 38 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 38 gtgctcatgg tgcacggtc	19
65	<210> 39 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 39 gtgctcatgg tgcacggtc	19

ES 2 645 410 T3

	<210> 35	
	<211> 22	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
10	<400> 35 gagctgaaag caggtccatc cc	22
	<210> 36	
	<211> 22	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
20	<400> 36 gagctgaaag caggtccatc cc	22
	<210> 37	
25	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
30	<400> 37 gagctgaaag caggtccatc cc	22
	<210> 38	
35	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
40	<400> 38 gagctgaaag caggtccatc cc	22
	<210> 39	
45	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
50	<400> 39 gagctgaaag caggtccatc cc	22
	<210> 40	
55	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
	<400> 40 gagctgaaag caggtccatc cc	22
65		

ES 2 645 410 T3

	<210> 41	
	<211> 22	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
10	<400> 41	
	gagctgaaag caggtccatc cc	22
	<210> 42	
	<211> 22	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
20	<400> 42	
	gagctgaaag caggtccatc cc	22
	<210> 43	
25	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
30	<400> 43	
	acgttgaggg gcatcgtcgc	20
	<210> 44	
35	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Oligómero sintético	
	<400> 44	
	gcaggctggg ccacgtgcat tg	22
45	<210> 45	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
	<400> 45	
55	cacgtgcatt gctagcatgg	20
	<210> 46	
	<211> 20	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
65	<400> 46	
	ctagcatgga aaagccaaag	20

ES 2 645 410 T3

5	<210> 47 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligómero sintético	
10	<400> 47 ggaactcagt gaactcatgc	20
	<210> 48 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligómero sintético	
20	<400> 48 gttactcagt cccatagtgc tg	22
	<210> 49 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligómero sintético	
30	<400> 49 ccatagtgtc gtcacaaatg	20
	<210> 50 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligómero sintético	
40	<400> 50 gaatgttact cagtcccata g	21
	<210> 51 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligómero sintético	
50	<400> 51 gaggctgagg gtcctcaagc t	21
	<210> 52 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> .Oligómero sintético	
60	<400> 52 cacattata agagtgcca ggc	23

5
 <210> 53
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Oligómero sintético

15
 <400> 53
 tccctctcca ttgtgtggt tc 22

20
 <210> 54
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Oligómero sintético

30
 <400> 54
 cttttcttgg tctgttctact c 21

35
 <210> 55
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Región no traducida 5' de picornavirus

40
 <400> 55
 ryggraccra ctactttggg tgcctgtt tc 32

45
 <210> 56
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Región no traducida 5' de picornavirus

50
 <400> 56
 tctccggcc cctgaatgyg gctaaycyya ac 32

55
 <210> 57
 <211> 8
 <212> ADN
 <213> ARN genómico de cadena positiva de flavivirus

60
 <400> 57
 catattga 8

65
 <210> 58
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

70
 <220>
 <223> Oligómero sintético

75
 <400> 58
 tcccaggtgt caatatgctg tt 22

80
 <210> 59
 <211> 125
 <212> ADN
 <213> ARNm de c-myc humano

ES 2 645 410 T3

<400> 59

```
cgccgctgcc aggacccgct tctctgaaag gctctccttg cagctgctta gacgctggat . 60
ttttttcggg tagtggaana ccagcagcct cccgcgacga tgcccctcaa cgttagcttc 120
accaa 125
```

- 5 <210> 60
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Oligómero sintético
- 15 <400> 60
ggaggctgct ggtttcac 20
<210> 61
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> Oligómero sintético
- 25 <400> 61
ggcatcgtcg cggaggctc 20
<210> 62
<211> 21
<212> ADN
<213> Poliovirus
- 30 <400> 62
cctgagcacc cattatgata c 21
<210> 63
<211> 24
<212> ADN
<213> Virus de la hepatitis A
- 40 <400> 63
cctgtctag acatgttcat tatt 24
<210> 64
<211> 20
<212> ADN
<213> Rinovirus
- 45 <400> 64
ttgagcggcc atgataaaa 20
<210> 65
<211> 20
<212> ADN
<213> Rinovirus
- 50 <400> 65
ttgagcggcc atgataaaa 20
<210> 66
<211> 20
<212> ADN
<213> Rinovirus
- 55 <400> 65
ttgagcggcc atgataaaa 20
<210> 66
<211> 20
<212> ADN
<213> Rinovirus
- 60 <210> 66
<211> 20
<212> ADN
<213> Rinovirus

ES 2 645 410 T3

	<400> 66 ctgggcaccc atgatgcca	20
5	<210> 67 <211> 20 <212> ADN <213> Vesivirus	
10	<400> 67 gagccatagc tcaaattctc	20
15	<210> 68 <211> 20 <212> ADN <213> Vesivirus	
20	<400> 68 tagctcaaat tctcattac	20
25	<210> 69 <211> 20 <212> ADN <213> Vesivirus	
30	<400> 69 gagcgtttga gccatagctc	20
35	<210> 70 <211> 20 <212> ADN <213> Calicivirus porcino	
40	<400> 70 gacggcaatt agccatdacg	20
45	<210> 71 <211> 19 <212> ADN <213> Norovirus	
50	<400> 71 cgacgccatc atcattcac	19
55	<210> 72 <211> 21 <212> ADN <213> Calicivirus felino	
60	<400> 72 cagagtttga gacattgtct c	21
65	<210> 73 <211> 23 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 73 ccttaataaa ctgatgggcc tcc	23
	<210> 74 <211> 18 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 74 ctgatgggcc tccatggc	18

ES 2 645 410 T3

<210> 75
 <211> 125
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 5
 <400> 75

aagactgcta gccgagtagt gttgggtcgc gaaaggcctt gtggtactgc ctgatagggt 60
gcttgcgagt gccccgggag gtctcgtaga ccgtgcacca tgagcacgaa tcctaaacct 120
caaag 125

10
 <210> 76
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C

15
 <400> 76
 ggccttcgc gaccaaac 20

20
 <210> 77
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Virus de la encefalitis de San Luis

25
 <400> 77
 agatgttcgc gtcggtgagc ggagaggaaa cagatttct 40

30
 <210> 78
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Virus de la encefalitis japonesa

<400> 78
 agaagtttat ctgtgtgaac ttctggcctt agtatcgttg 40

35
 <210> 79
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Virus de la encefalitis del valle de Murray

40
 <400> 79
 agacgttcat ctgctgagc ttccgatctc agtattgttt 40

45
 <210> 80
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Virus del Nilo occidental

<400> 80
 agtagttcgc ctgtgtgagc tgacaaactt agtagtgttt 40

50
 <210> 81
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Virus de la fiebre amarilla

55
 <400> 81
 agtaaatcct gtgtgctaata tgagggtgcat tggctgcaa 40

60
 <210> 82
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Dengue de tipo 2

ES 2 645 410 T3

<400> 82
 agttgtagt ctacgtggac cgacaaagac agattcttg 40

5
 <210> 83
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C

10
 <400> 83
 gccagcccc tgatgggggc gacactccac catgaatcac 40

15
 <210> 84
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas

20
 <400> 84
 agatttctt gcacgtgcat gcgttgctt cggacagcat 40

25
 <210> 85
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Virus de la fiebre hemorrágica de Omsk

30
 <400> 85
 agatttctt gcacgtgcat gcgttgctt cagacagcaa 40

35
 <210> 86
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Virus de Powassan

40
 <400> 86
 agatttctt gcacgtgtgt gcgggtgctt tagtcagtgt 40

45
 <210> 87
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Virus de la encefalitis de San Luis

50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) ... (18)
 <223> n = A, T, C o G

55
 <400> 87
 accgacgcga acatcnc 18

60
 <210> 88
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la encefalitis de San Luis

65
 <400> 88
 tcctctccgc tcaccgacgc 20

<210> 89
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Virus de la encefalitis japonesa

<400> 89
 tcacacagat aaacttct 18

ES 2 645 410 T3

<210> 90
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la encefalitis japonesa
 5
 <400> 90
 aagccaagaa gttcacacag 20
 <210> 91
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Virus de la encefalitis del valle de Murray
 10
 <400> 91
 tcacgcagat gaacgtct 18
 <210> 92
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la encefalitis del valle de Murray
 20
 <400> 92
 gagatcggaa gctcacgcag 20
 <210> 93
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus del Nilo occidental
 25
 <400> 93
 gctcacacag gcgaactact 20
 <210> 94
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Virus del Nilo occidental
 30
 <400> 94
 taagttgtc agctcacaca g 21
 <210> 95
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Virus de la fiebre amarilla
 35
 <400> 95
 caattagcac acaggattta ct 22
 <210> 96
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la fiebre amarilla
 40
 <400> 96
 ttgcagacca atgcacctca 20
 <210> 97
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Dengue de tipo 2
 45
 <400> 97
 gtccacgtag actaacaact 20
 50
 55
 60
 65

ES 2 645 410 T3

<210> 98
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Dengue de tipo 2
 5
 <400> 98
 gtctttgtcg gtccacgtag 20
 <210> 99
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 10
 <400> 99
 cccatcaggg ggctggc 17
 <210> 100
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 20
 <400> 100
 tggagtgtcg ccccatcag 20
 <210> 101
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas
 25
 <400> 101
 atgcacgtgc aagaaaatct 20
 <210> 102
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas
 30
 <400> 102
 atgctgtccg aagcaaacgc 20
 <210> 103
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Virus de la fiebre hemorrágica de Omsk
 35
 <400> 103
 cacgcacgtg caagaaaatc t 21
 <210> 104
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la fiebre hemorrágica de Omsk
 40
 <400> 104
 tgaagcaagc gcacgcacgt 20
 <210> 105
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de Powassan
 45
 <400> 105
 acacacgtgc aagaaaatct 20
 50
 55
 60
 65

ES 2 645 410 T3

<210> 106
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de Powassan
 5
 <400> 106
 aactgacta aagcaccgc 20
 <210> 107
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Poliovirus
 10
 <400> 107
 taaaacagc tctggggtg taccacccc agaggccac 40
 15
 <210> 108
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano A
 20
 <400> 108
 taaaacagc ctgagggtg taccaccca caggccac 40
 25
 <210> 109
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano B
 30
 <400> 109
 taaaacagc ctgagggtg tccaccca caggccatt 40
 35
 <210> 110
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano C
 40
 <400> 110
 taaaacagc tctggggtg ctccacccc agaggccac 40
 45
 <210> 111
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano D
 50
 <400> 111
 taaaacagc tctggggtg ctccacccc agaggccac 40
 55
 <210> 112
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano E
 60
 <400> 112
 gagggtccc acccaacagg cccactgggt gttgtactct 40
 65
 <210> 113
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Enterovirus bovino
 <400> 113
 taaaacagc ctgggggtg taccacccc tggggccac 40

ES 2 645 410 T3

<210> 114
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Rinovirus humano 89
 5
 <400> 114
 ttaaaactgg gagtgggtg ttccactca ctccacccat 40
 <210> 115
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Rinovirus humano B
 10
 <400> 115
 ttaaaacagc ggatgggtat cccaccattc gaccattgg 40
 <210> 116
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Virus de la glosopeda
 20
 <400> 116
 ttgaaagggg gcgctagggt ttcacccta gcatgccaac 40
 25
 <210> 117
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Hepatitis A
 30
 <400> 117
 ttcaagaggg gtctcggga atttccggag tcctcttgg 40
 <210> 118
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Poliovirus
 35
 <400> 118
 ggtacaacc cagagctgt ttaa 24
 40
 <210> 119
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Poliovirus
 45
 <400> 119
 gtgggcctct ggggtggta 20
 50
 <210> 120
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano A
 55
 <400> 120
 caaccacag gctgtttaa 20
 <210> 121
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano A
 60
 <400> 121
 gtgggcctg tgggtggta 20
 65

ES 2 645 410 T3

<210> 122
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano B
 5
 <400> 122
 caaccacag gctgtttaa 20
 <210> 123
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano B
 10
 <400> 123
 aatggcctg tgggtggaa 20
 <210> 124
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano C
 20
 <400> 124
 caaccacaga gctgtttaa 20
 <210> 125
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano C
 25
 <400> 125
 gtggcctct ggggtggag 20
 <210> 126
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano D
 35
 <400> 126
 caaccacaga gctgtttaa 20
 <210> 127
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano D
 40
 <400> 127
 gtggcctct ggggtggaa 20
 <210> 128
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano E
 50
 <400> 128
 cctgttggg gggaacactc 20
 <210> 129
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano E
 60
 <400> 129
 agagtacaac acccagttggg 20
 65

ES 2 645 410 T3

	<210> 130	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Enterovirus bovino	
	<400> 130	
	caacccccag gctgttttaa	20
10	<210> 131	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Enterovirus bovino	
15	<400> 131	
	gtgggccccca ggggtgggta	20
20	<210> 132	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Rinovirus humano 89	
	<400> 132	
	caacccactc ccagttttaa	20
25	<210> 133	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Rinovirus humano 89	
30	<400> 133	
	atgggtggag tgagtgggaa	20
35	<210> 134	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Rinovirus humano B	
40	<400> 134	
	atacccatcc gctgttttaa	20
45	<210> 135	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Rinovirus humano B	
	<400> 135	
	ccaatgggtc gaatgtggg	20
50	<210> 136	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Virus de la glosopeda	
55	<400> 136	
	aaccctagcg ccccttca a	21
60	<210> 137	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Virus de la glosopeda	
	<400> 137	
	gttggcatgc taggggtgaa	20
65		

ES 2 645 410 T3

<210> 138
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Hepatitis A
 5
 <400> 138
 tcccggagac ccctcttgaa 20
 <210> 139
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Hepatitis A
 10
 <400> 139
 ccaagaggga ctccggaaat 20
 <210> 140
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Calicivirus felino
 20
 <400> 140
 gtaaaagaaa ttgagacaa tgtctcaaac tctgagcttc 40
 25
 <210> 141
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Calicivirus canino
 30
 <400> 141
 gttaatgaga aatggcttct gccatcgctc tctcgagctc 40
 <210> 142
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Calicivirus entérico porcino
 35
 <400> 142
 gtgatcgtga tggctaattg ccgtccgttg cctattgggc 40
 40
 <210> 143
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Cepa de calicivirus NB
 45
 <400> 143
 gtgattaat tatagagaga tagtgacttt cacttttctt 40
 50
 <210> 144
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Virus de Norwalk
 55
 <400> 144
 gtgaatgatg atggcgtcaa aagacgtcgt tcctactgct 40
 <210> 145
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Calicivirus felino
 60
 <400> 145
 ttgtctcaaa tttcttttac 20
 65

ES 2 645 410 T3

5	<210> 146 <211> 20 <212> ADN <213> Calicivirus felino	
	<400> 146 gaagctcaga gtttgagaca	20
10	<210> 147 <211> 20 <212> ADN <213> Calicivirus canino	
15	<400> 147 agaagccatt tctcattaac	20
20	<210> 148 <211> 20 <212> ADN <213> Calicivirus canino	
	<400> 148 gagctcgaga gagcgatggc	20
25	<210> 149 <211> 20 <212> ADN <213> Calicivirus entérico porcino	
30	<400> 149 caattagcca tcacgatcac	20
35	<210> 150 <211> 20 <212> ADN <213> Calicivirus entérico porcino	
40	<400> 150 ggcaacggac ggcaattagc	20
45	<210> 151 <211> 20 <212> ADN <213> Cepa de calicivirus NB	
	<400> 151 tctctctata attaaatcac	20
50	<210> 152 <211> 20 <212> ADN <213> Cepa de calicivirus NB	
55	<400> 152 aaagtcacta tctctctata	20
60	<210> 153 <211> 20 <212> ADN <213> Virus de Norwalk	
	<400> 153 ttgacgcat catcattcac	20
65		

ES 2 645 410 T3

5
<210> 154
<211> 20
<212> ADN
<213> Virus de Norwalk

<400> 154
agcagtagga acgacgtctt 20

10
<210> 155
<211> 40
<212> ADN
<213> Virus de la hepatitis E

15
<400> 155
gccatggagg cccatcagtt tattaaggct cctggcatca 40

20
<210> 156
<211> 20
<212> ADN
<213> Virus de la hepatitis E

25
<400> 156
aactgatggg cctccatggc 20

30
<210> 157
<211> 20
<212> ADN
<213> Virus de la hepatitis E

35
<400> 157
tgateccagg agccttaata 20

40
<210> 158
<211> 40
<212> ADN
<213> Virus de la rubeola

45
<400> 158
atggaagcta tcggacctcg ctaggactc ccattcccat 40

50
<210> 159
<211> 40
<212> ADN
<213> Encefalitis equina oriental

55
<400> 159
atagggtacg gtgtagaggc aaccacccta ttccaccta 40

60
<210> 160
<211> 40
<212> ADN
<213> Encefalomyelitis equina occidental

65
<400> 160
accctacaaa ctaatcgatc caatatggaa agaattcagc 40

70
<210> 161
<211> 40
<212> ADN
<213> Encefalitis equina venezolana

75
<400> 161
atgggcgggc caagagagaa gcccaaacca attacctacc 40

ES 2 645 410 T3

<210> 162
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la rubeola
 5
 <400> 162
 cgagggccga tagctccat 20
 <210> 163
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la rubeola
 10
 <400> 163
 atgggaatgg gagcctaag 20
 <210> 164
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Encefalitis equina oriental
 20
 <400> 164
 gcctctacac cgtaccctat 20
 25
 <210> 165
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Encefalitis equina oriental
 30
 <400> 165
 taggtgaaa taggtggtt 20
 <210> 166
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Encefalomiелitis equina occidental
 35
 <400> 166
 gatcgattag tttgtaggt 20
 40
 <210> 167
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Encefalomiелitis equina occidental
 45
 <400> 167
 cgtgaattct tccatattg 20
 50
 <210> 168
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Encefalitis equina venezolana
 55
 <400> 168
 ttctctcttg cgccgcccac 20
 <210> 169
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Encefalitis equina venezolana
 60
 <400> 169
 ggtaggtaat tggttgggc 20
 65

ES 2 645 410 T3

5
<210> 170
<211> 40
<212> ADN
<213> Coronavirus de SARS

<400> 170
atattaggtt ttacctacc caggaaaagc caaccaacct 40

10
<210> 171
<211> 40
<212> ADN
<213> Virus de la diarrea epidémica porcina

15
<400> 171
acttaaaaag atttctatc tacggatagt tagctctttt 40

20
<210> 172
<211> 40
<212> ADN
<213> Gastroenteritis transmisible

<400> 172
acttttaaag taaagtgagt gtagcgtggc tatactctt 40

25
<210> 173
<211> 40
<212> ADN
<213> Coronavirus bovino

30
<400> 173
gattgcgagc gattgcgtg cgtgcatccc gcttactga 40

35
<210> 174
<211> 40
<212> ADN
<213> Coronavirus humano 229E

40
<400> 174
acttaagtac ctatctatc tacagataga aaagtgctt 40

45
<210> 175
<211> 40
<212> ADN
<213> Hepatitis murina

<400> 175
tataagagtg attggcgtcc gtacgtacc tctcaactct 40

50
<210> 176
<211> 40
<212> ADN
<213> Virus reproductor y respiratorio porcino

55
<400> 176
atgacgtata ggtgtggct ctatgccttg gcattgtat 40

60
<210> 177
<211> 20
<212> ADN
<213> Coronavirus de SARS

<400> 177
ggtaggtaaa aacctaatat 20

65

<210> 178
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Coronavirus de SARS
 5
 <400> 178
 aggttggtg gctttcctg 20
 <210> 179
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la diarrea epidémica porcina
 10
 <400> 179
 gatagaaaat cttttaagt 20
 <210> 180
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la diarrea epidémica porcina
 20
 <400> 180
 aaaagagcta actatccgta 20
 <210> 181
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Gastroenteritis transmisible
 25
 <400> 181
 actcacttta ctttaaaagt 20
 <210> 182
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Gastroenteritis transmisible
 30
 <400> 182
 gccacgctac actcacttta 20
 <210> 183
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Coronavirus bovino
 35
 <400> 183
 cacgcaaadc gctcgcaatc 20
 <210> 184
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Coronavirus bovino
 40
 <400> 184
 tcagtgaagc gggatgcacg 20
 <210> 185
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Coronavirus humano 229E
 45
 <400> 185
 gatagataag gtacttaagt 20
 50
 55
 60
 65

ES 2 645 410 T3

	<210> 186	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Coronavirus humano 229E	
5		
	<400> 186	
	aagcaacttt tctatctgta	20
10		
	<210> 187	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Hepatitis murina	
15		
	<400> 187	
	cggacgcca tcaacttat a	21
20		
	<210> 188	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Hepatitis murina	
	<400> 188	
	gagttgagag ggtacgtacg ga	22
25		
	<210> 189	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Virus reproductor y respiratorio porcino	
30		
	<400> 189	
	catagagcca acacctatac g	21
35		
	<210> 190	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Virus reproductor y respiratorio porcino	
40		
	<400> 190	
	atacaaatgc caaggcatag	20
45		
	<210> 191	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Astrovirus humano	
	<400> 191	
	ccaagagggg ggtggtgatt ggccttggc ttatcagtgt	40
50		
	<210> 192	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Arteritis equina	
	<400> 192	
	gctcgaagtg tgtatggtgc catatacggc tcaccacat	40
55		
	<210> 193	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Astrovirus humano	
60		
	<400> 193	
	aatcaccacc ccctcttgg	20
65		

ES 2 645 410 T3

<210> 194
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Astrovirus humano
 5
 <400> 194
 gccaaaggcc aatcaccacc 20
 <210> 195
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Arteritis equina
 10
 <400> 195
 gcaccataca cacttcgagc 20
 <210> 196
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Arteritis equina
 20
 <400> 196
 atgggtgga gccgtatatg 20
 <210> 197
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Diana Vif de VIH-1
 25
 <400> 197
 gactatggaa aacagatggc aggtgatgat tgt 33
 <210> 198
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Diana TAR de VIH-1
 30
 <400> 198
 gaccagatct gagcctggga gctctctggc taac 34
 <210> 199
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Diana U3R de VIH-1
 35
 <400> 199
 cctgtactgg gtctctctgg 20
 <210> 200
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> VIH-1
 40
 <400> 200
 cctgccatct gttttccata atc 23
 <210> 201
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> VIH-1
 45
 <400> 201
 cacctgccat ctgtttcca ta 22
 50
 55
 60
 65

ES 2 645 410 T3

<210> 202
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> VIH-1
 5
 <400> 202
 cctgccatct gtttccata atc 23
 <210> 203
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> VIH-1
 10
 <400> 203
 cacctgccat ctgtttcca ta 22
 <210> 204
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> VIH-1
 20
 <400> 204
 gctcccaggc tcagatctgg tc 22
 <210> 205
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> VIH-1
 25
 <400> 205
 gttagccaga gagctcccag gc 22
 <210> 206
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> VIH-1
 35
 <400> 206
 ccagagagac ccagtacagg 20
 <210> 207
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> ARN genómico de cadena positiva de nidovirus
 45
 <400> 207
 cuacuuuuu cuacuaaacg aaau 24
 <210> 208
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> ARN genómico de cadena positiva de nidovirus
 50
 <400> 208
 gaucuuuuug uaaucuaaac uuua 24
 <210> 209
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> ARN genómico de cadena positiva de nidovirus
 60
 <400> 209
 gaucuguucu cuaaacgaac uuua 24
 65

ES 2 645 410 T3

<210> 210
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 <400> 210
 atttcgttta gttgagaaaa g 21
 <210> 211
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 <400> 211
 gtttagtga gaaaagtag 19
 <210> 212
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 <400> 212
 taaagtttag attacaaaaa g 21
 <210> 213
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 <400> 213
 taaagttcgt ttagagaaca g 21
 <210> 214
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 <400> 214
 gttcgttag agaacagatc 20
 <210> 215
 <211> 2717
 <212> ADN
 <213> Transcrito procesado de CD-86 humano
 60
 <400> 215

ES 2 645 410 T3

```

aggagcctta ggaggtacgg ggagctcgca aatactcctt ttggtttatt ottaccacct      60
tgcttctgtg ttccttgga atgctgctgt gcttatgcat ctggctcctt tttggagcta      120
cagtgagcag gcatttgtga cagcactatg ggactgagta acattctcctt tgtgatggcc      180
ttcctgctct ctgggtgctgc tcctctgaag attcaagctt atttcaatga gactgcagac      240
ctgccatgcc aatttgcaaa ctctcaaac caaagcctga gtgagctagt agtattttgg      300
caggaccagg aaaacttgggt tctgaatgag gtatacttag gcaaagagaa atttgacagt      360
gttcattcca agtatatggg ccgcacaagt tttgatcgg acagttggac cctgagactt      420
cacaatcttc agatcaagga caagggcttg tatcaatgta tcatccatca caaaaagccc      480
acaggaatga ttcgcatcca ccagatgaat tctgaactgt cagtgcctgc taacttcagt      540
caacctgaaa tagtaccaat ttctaataa acagaaaatg tgtacataaa tttgacctgc      600
tcatctatac acggttaccc agaacctaa aagatgagtg ttttgctaag aaccaagaat      660
tcaactatcg agtatgatgg tattatgcag aaatctcaag ataatgtcac agaactgtac      720
gacgtttcca tcagcttctc tgtttcattc cctgatgtta cgagcaatat gaccatcttc      780
tgtattctgg aaactgaca gacgcggctt ttatcttcac ctttctctat agagcttgag      840
gacctcagc ctccccaga ccacattcct tggattacag ctgtacttcc aacagttatt      900
atatgtgtga tggttttctg tctaattcta tggaaatgga agaagaagaa gcggcctcgc      960
aactcttata aatgtggaac caacacaatg gagagggag agagtgaaca gaccaagaaa     1020
agagaaaaaa tccatatacc tgaaagatct gatgaaagccc agcgtgtttt taaaagtctg     1080
aagacatctt catgcgaca aagtgataca tgtttttaat taaagagtaa agcccataca     1140
agtattcatt ttttctaccc tttccttctg aagttcctgg gcaacctttt tgatttcttc     1200
cagaaggcaa aaagacatta ccatgagtaa taagggggct ccaggactcc ctctaagtgg     1260
aatagcctcc ctgtaactcc agctctgctc cgtatgcaa gaggagactt taattctctt     1320
actgcttctt ttcacttcag agcacactta tgggccaaag ccagcttaat ggctcatgac     1380
ctggaaataa aatttaggac caatacctcc tccagatcag attcttctct taatttcata     1440
gattgtgttt tttttaaatt agacctctca atttctggaa aactgccttt taatcgcca     1500
gaattctaag ctgggtgcccc actgaatctt gtgtacctgt gactaaacaa ctacctctc     1560
agtctgggtg ggacttatgt atttatgacc ttatagtgtt aatatcttga aacatagaga     1620
tctatgtact gtaatagtgt gattactatg ctctagagaa aagtctaccc ctgctaagga     1680
gttctcatcc ctctgtcagg gtcagtaagg aaaacgggtg cctagggtac aggcaacaat     1740
gagcagacca acctaaattt ggggaaatta ggagaggcag agatagaacc tggagccact     1800
tctatctggg ctggtgctaa tattgaggag gcttgcccca cccaacaagc catagtggag     1860
agaactgaat aaacaggaaa atgccagagc ttgtgaaccc tgtttctctt gaagaactga     1920
ctagtgagat ggcctgggga agctgtgaaa gaacaaaaag agatcacaat actcaaaaga     1980
gagagagaga gaaaaaagag agatcttgat ccacagaaat acatgaaatg tctggctctgt     2040
ccaccccatc aacaagtctt gaaacaagca acagatggat agtctgtcca aatggacata     2100
agacagacag cagtttccct ggtggtcagg gaggggtttt ggtgatacc ccaagttattgg     2160
gatgtcatct tcctggaagc agagctgggg agggagagcc atcaccttga taatgggatg     2220
aatggaagga ggcttaggac tttccactcc tggctgagag aggaagagct gcaacggaat     2280
taggaagacc aagacacaga tcaccggggg cttacttagc ctacagatgt cctacgggaa     2340
cgtgggctgg cccagcatag ggctagcaaa tttgagttgg atgattgttt ttgctcaagg     2400
caaccagagg aaacttgcct acagagacag atatactggg agaaatgact ttgaaaacct     2460
ggctctaagg tgggatcact aagggatggg gcagtctctg cccaaacata aagagaactc     2520
tggggagcct gagccacaaa aatgttctct tattttatgt aaacctcaa gggttataga     2580
ctgccatgct agacaagctt gtccatgtaa tattcccatg tttttaccct gccctgcct     2640
tgattagact cctagcacct ggctagtttc taacatgttt tgtgcagcac agtttttaat     2700
aaatgcttgt tacattc                                     2717

```

- <210> 216
- <211> 46
- 5 <212> ADN
- <213> Transcrito procesado de CD-86 humano

- <400> 216
- 10 catttgtgac agcactatgg gactgagtaa cattctcttt gtagat 46

- <210> 217
- <211> 21
- <212> ADN
- 15 <213> Sitio de corte y empalme de transcrito preprocesado de CD-86 humano

- <400> 217
- agcttgagga cctcagcct c 21

- <210> 218
- <211> 23
- <212> ADN
- 20 <213> Sitio de corte y empalme de transcrito preprocesado de CD-86 humano

ES 2 645 410 T3

<400> 218
 gcctcgcaac tctataaat gtg 23

5 <210> 219
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Sitio de corte y empalme de transcrito preprocesado de CD-86 humano

10 <400> 219
 gaaccaacac aatggagagg ga 22

15 <210> 220
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Sitio de corte y empalme de transcrito preprocesado de CD-86 humano

20 <400> 220
 gagtgaacag accaagaaaa g 21

25 <210> 221
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Cadena positiva de la gripe A

30 <400> 221
 agcgaagca ggcaaaccou uugauggau gucaauccga ccuuacuuuu 50

35 <210> 222
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Cadena menos de la gripe A

40 <400> 222
 agtgattatc taccctgctt ttgct 25

45 <210> 223
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Oligómero sintético

55 <400> 223
 agcaaaagca gggtagataa tc 22

60 <210> 224
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Oligómero sintético

70 <400> 224
 gacatccatt caaatggtt g 21

75 <210> 225
 <211> 2823
 <212> ADN
 <213> Transcrito procesado de miostatina humana

80 <400> 225

ES 2 645 410 T3

```

agattcactg gtgtggcaag ttgtctctca gactgtacat gcattaaaat tttgcttggc 60
attactcaaa agcaaaagaa aagtaaaagg aagaaacaag aacaagaaaa aagattatat 120
tgattttaaa atcatgcaaa aactgcaact ctgtgtttat atttacctgt ttatgctgat 180
tgttgctggg ccagtggatc taaatgagaa cagtggagaa aaagaaaatg tggaaaaaga 240
ggggctgtgt aatgcatgta cttggagaca aaactctaaa tcttcaagaa tagaagccat 300
taagatacaa atcctcagta aacttcgtct ggaaacagct cctaacatca gcaaagatgt 360
tataagacaa cttttacca aagctcctcc actccgggaa ctgattgatc agtatgatgt 420
ccagagggat gacagcagcg atggctcttt ggaagatgac gattatcacg ctacaacgga 480
aacaatcatt accatgccta cagagtctga ttttctaagt caagtggatg gaaaacccaa 540
atgttgcttc tttaaattta gctctaaaat acaatacaat aaagtagtaa aggcccaact 600
atggatataat ttgagaccog tcgagactcc tacaacagtg tttgtgcaaa tcttgagact 660
catcaaacct atgaaagacg gtacaaggta tactggaatc cgatctctga aacttgacat 720
gaaccaggc actggtatct ggcagagcat tgatgtgaag acagtgttgc aaaattggct 780
caacaacct gaatccaact taggcattga aataaaagct ttagatgaga atgggcatga 840
tcttgctgta acctcccag gaccaggaga agatgggctg aatccgtttt tagagggtcaa 900
ggtaacagac acaccaaaaa gatccagaag ggattttggt cttgactgtg atgagcactc 960
aacagaatca cgatgctgtc gttaccctct aactgtggat tttgaagctt ttggatggga 1020
ttggattatc gctcctaaaa gatataaggc caattactgc tctggagagt gtgaatttgt 1080
atttttacaa aaatatcctc atactcatct ggtacaccaa gcaaacccca gaggttcagc 1140
aggcccttgc tgtactccca caaagatgtc tccaattaat atgctatatt ttaatggcaa 1200
agaacaaata atatatggga aaattccagc gatggtagta gaccgctgtg ggtgctcatg 1260
agatttatat taagcgttca taacttccta aaacatggaa ggttttcccc tcaacaattt 1320
tgaagctgtg aaattaagta ccacaggcta taggcctaga gtatgctaca gtcacttaag 1380
cataagctac agtatgtaaa ctaaaagggg gaatatatgc aatgggtggc atttaacct 1440
ccaaacaaat catacaagaa agttttatga tttccagagt ttttgagcta gaaggagatc 1500
aaattacatt tatgttccta tatattacaa catcggcgag gaaatgaaag cgattctcct 1560
tgagttctga tgaattaaag gagtatgctt taaagtctat tcttttaaag ttttgtttaa 1620
tatttacaga aaaaaccaca tacagtattg gtaaaatgca ggattgttat ataccatcat 1680
tcgaatcatc cttaaacact tgaatttata ttgtatggta gtatacttg taagataaaa 1740
ttccacaaaa atagggatgg tgcagcatat gcaatttcca ttcctattat aattgacaca 1800
gtacattaac aatccatgcc aacgggtgcta atacgatagg ctgaatgtct gagggtacca 1860
ggtttatcac ataaaaaaca ttcagtaaaa tagtaagttt ctcttttctt caggggcatt 1920
ttcctacacc tccaaatgag gaatggattt tctttaatgt aagaagaatc atttttctag 1980
aggttggctt tcaattctgt agcatacttg gagaaactgc attatcttaa aaggcagtca 2040
aatgggtgtt gttttatca aaatgtcaaa ataacatact tggagaagta tgtaattttg 2100
tctttggaaa attacaacac tgcctttgca acactgcagt ttttatggta aaataataga 2160
aatgatcgac tctatcaata ttgtataaaa agactgaaac aatgcattta tataatatgt 2220
atacaatatt gttttgtaaa taagtgtctc cttttttatt tactttggta tatttttaca 2280
ctaaggacat ttcaaattaa gtactaaggc acaaagacat gtcatgcatc acagaaaagc 2340
aactacttat atttcagagc aaattagcag attaaatagt ggtccttaaaa ctccatattg 2400
taatgattag atggttatat tacaatcatt ttatatTTTT ttacatgatt aacattcact 2460
tatggattca tgatggctgt ataaagtga tttgaaatt caatggttta ctgtcattgt 2520
gtttaaatct caacgttcca ttattttaat acttgcaaaa acattactaa gtataccaaa 2580
ataattgact ctattatctg aaatgaagaa taaactgatg ctatctcaac aataactgtt 2640
acttttattt tataatttga taatgaatat atttctgcat ttatttactt ctgttttgta 2700
aattgggatt ttgttaatca aatttattgt actatgacta aatgaaatta tttcttacct 2760
ctaatttga gaaacagtat aagttatatt aaagtgtttt cacatttttt tgaaagacaa 2820
aaa

```

5 <210> 226
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Sitio de corte y empalme de transcrito preprocesado de miostatina humana

10 <400> 226
 acaatcaita ccatgcctac agagtgaag tagtctatt agtgtatc 50

15 <210> 227
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Sitio de corte y empalme de transcrito preprocesado de miostatina humana

<400> 227
 cttttcttt cttattcatt tatagctgat ttctaatgc aagtggatgg 50

ES 2 645 410 T3

<210> 228
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Sitio de corte y empalme de transcrito preprocesado de miostatina humana
 5
 <400> 228
 cccaggacca ggagaagatg ggctggaag tgataactga aaataacatt 50
 <210> 229
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Sitio de corte y empalme de transcrito preprocesado de miostatina humana
 10
 <400> 229
 tgattgtct ttcctttca aacagaatcc gtttttagag gtcaaggtaa 50
 15
 <210> 230
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 25
 <400> 230
 actctgtagg catggaatg 20
 <210> 231
 <211> 18
 <212> ADN
 <2133> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 35
 <400> 231
 cagcccatct tctcctgg 18
 <210> 232
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 45
 <400> 232
 cactgcatt agaaatcag 20
 50
 <210> 233
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 <400> 233
 cttgacctct aaaaacggat t 21
 60
 <210> 234
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65

<220>
 <223> Oligómero sintético

 <400> 234
 5 gttggrtr gccgattca ggggccggag ga 32

 <210> 235
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligómero sintético

 15 <400> 235
 ccgattcag gggccggagg 20

 <210> 236
 <211> 22
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligómero sintético

 25 <400> 236
 ggattagccg cattcagggg cc 22

 <210> 237
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligómero sintético

 35 <400> 237
 gttgggatta gccgattca g 21

 <210> 238
 <211> 37
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligómero sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (1)...(37)
 <223> n = A, T, C o G

 <400> 238
 55 aaaangaaac acggacacc aaagtagtgc gttccgc 37

 <210> 239
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligómero sintético

 <400> 239
 65 cacccaaagt agtcggtcc 20

ES 2 645 410 T3

<210> 240
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 <400> 240
 cacggacacc caaagtagtc 20
 <210> 241
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 <400> 241
 ggaaacacgg acacccaaag 20
 <210> 242
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 <400> 242
 aaaaggaaac acggacaccc 20
 <210> 243
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 <400> 243
 atgaaacacg gacacccaaa g 21
 <210> 244
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 <400> 244
 gaaacacgga cacccaaagt ag 22
 <210> 245
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 <400> 245
 gagaaacacg gacacccaaa gtag 24

ES 2 645 410 T3

<210> 246
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Sitio de corte y empalme de transcrito preprocesado de antígeno 4 de células T humanas
 5
 <400> 246

gcatgagttc actgagttcc ctttggcttt tccatgctag caatgcacgt ggcóccagcct 60
gctgtggtac tggccagcag ccgaggcátc gccagctttg 100

10
 <210> 247
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus del Ébola

15
 <400> 247
 gagggcggca tgggggaggc 20

20
 <210> 248
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Virus del Ébola

25
 <400> 248
 gaccatggc agccccgctc g 21

30
 <210> 249
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus del Ébola

35
 <400> 249
 gcagcagttc ttctccgtg 20

40
 <210> 250
 <211> 125
 <212> ARN
 <213> Región AUG de VP35 del virus del Ébola

 <400> 250

aaugaugaag auuaaaaccu ucaucauccu uacgucaauu gaauucucua gcacucgaag 60
cuuauugucu ucaauguaaa agaaaagcug gucuaacaag augacaacua gaacaaagg 120
caggg 125

45
 <210> 251
 <211> 125
 <212> ADN
 <213> Región AUG de VP24 del virus del Ébola

50
 <400> 251

cguuccaaca aucgagcgcá agguuúcaag guugaacuga gagugucuag acaacaaaau 60
auugauacuc cagacaccaa gcaagaccug agaaaaaacc auggcuaaag cuacgggacg 120
auaca 125

55
 <210> 252
 <211> 124
 <212> ARN
 <213> Región AUG de L del virus del Ébola

ES 2 645 410 T3

	<400> 252		
	guagauuaag aaaaaagccu gaggaagauu aagaaaaacu gcuuauuggg ucuuuccgug	60	
	uuuuagauga agcaguugaa auuucuucuc uugauuuuaa auggcucac aacauacca	120	
	auac	124	
5	<210> 253 <211> 125 <212> ARN <213> Región AUG de VP35 del virus de Marburg		
10	<400> 253		
	cuaaaaaucg aagaauuuu aagguuuucu uuaauuuca gaaaagguu uuuauucucu	60	
	ucuuucuuuu ugcaaacava uugaaaauu aauuuucaca auggggacu caucauuau	120	
	gcaac	125	
15	<210> 254 <211> 125 <212> ARN <213> Región AUG de VP24 del virus de Marburg		
20	<400> 254		
	uucuucaaa caccccaau uuucaaucau acacauaau accauuuuag uagcguuacc	60	
	uuucaauaca aucuagguga uugugaaaag acuuccaac auggcagaau uaucaacgcg	120	
	uuaca	125	
25	<210> 255 <211> 125 <212> ARN <213> Región AUG de L del virus de Marburg		
	<400> 255		
	ucauucucuu cgauacacgu uauaucuuua gcaaaguuu gaaaauagcc uugucauguu	60	
	agacgccagu uauccaucuu aagugaauc uuucucaau augcagcauc caacucaau	120	
	uccug	125	
30	<210> 256 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
35	<220> <223> Oligómero sintético		
40	<400> 256 gtccacatt gtgaaaatta t 21		
45	<210> 257 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
50	<220> <223> Oligómero sintético		
	<400> 257 ctgtgcat atatgatgag tc 22		

ES 2 645 410 T3

	<210> 258	
	<211> 23	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
10	<400> 258 gttgtaacgc gttgataatt ctg	23
	<210> 259	
	<211> 19	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
20	<400> 259 . gctgcatatt gaagaaagg	19
	<210> 260	
25	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
30	<400> 260 catcaggata tgagttgga tg	22
	<210> 261	
35	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> ARNv de arenavirus	
40	<400> 261 cgcacmgdgg atcctaggc	19
	<210> 262	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
50	<400> 262 cgcctaggat ccccggtgcg	20
	<210> 263	
55	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
60	<400> 263 cgcctaggat ccccggtgcg c	21

ES 2 645 410 T3

<210> 264
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 <400> 264
 gcctaggatc cactgtgcg 20
 <210> 265
 <211> 19
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 20 <220>
 <221> modified_base
 <222> (12)...(12)
 <223> n = Inosina
 25 <220>
 <221> modified_base
 <222> (14)...(14)
 <223> n = Inosina
 30 <400> 265
 gcctaggatc cncngtgcg 19
 <210> 266
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 40 <220>
 <221> modified_base
 <222> (13)...(13)
 <223> n = Inosina
 45 <220>
 <221> modified_base
 <222> (15)...(5)
 <223> n = Inosina
 50 <400> 266
 cgcctaggat ccncngtgcg 20
 <210> 267
 <211> 20
 55 <212> ARN
 <213> ARN de cadena positiva de flavivirus
 <400> 267
 gucaauaugc uaaaacgcg 20
 <210> 268
 <211> 20
 <212> ARN
 65 <213> ARN de cadena positiva de flavivirus

ES 2 645 410 T3

<400> 268
 aucaauaugc ugaaacgcgg 20

5 <210> 269
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> ARN de cadena positiva de flavivirus

10 <400> 269
 gucaauaugg uacgacgagg 20

15 <210> 270
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> ARN de cadena positiva de flavivirus

20 <400> 270
 cuuucuuau gcugaaacgc g 21

25 <210> 271
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> ARN de cadena positiva de flavivirus

30 <400> 271
 cuaucuuau gcugaaacgc g 21

35 <210> 272
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> ARN de cadena positiva de flavivirus

40 <400> 272
 cagcuuagga gaacaagagc ug 22

45 <210> 273
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> ARN de cadena positiva de flavivirus

50 <400> 273
 ggcugucaau augcuaaaac 20

55 <210> 274
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> ARN de cadena positiva de flavivirus

60 <400> 274
 aacagcauau ugacaccugg ga 22
 <210> 275
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> ARN de cadena positiva de flavivirus

65 <400> 275
 ugggaccua uugacgccag gga 23

70 <210> 276
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> ARN de cadena positiva de flavivirus

75 <400> 276
 aaacagcaua uugacgcugg ga 22

ES 2 645 410 T3

5
<210> 277
<211> 22
<212> ADN
<213> ARN de cadena positiva de flavivirus

<400> 277
cgguucuugu ucuccugag cc 22

10
<210> 278
<211> 13.
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15
<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1) ... (13)
<223> Xaa = "ácido 6-amino hexanoico"

<400> 278

Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Xaa
1 5 10

25
<210> 279
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<223> Péptido sintético

35
<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)...(14)
<223> Xaa = "ácido 6-amino hexanoico"

<400> 279

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa
1 5 10

45
<210> 280
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Péptido sintético

55
<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)...(14)
<223> Xaa = "ácido 6-amino hexanoico"

<400> 280

Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Xaa
1 5 10

60

ES 2 645 410 T3

5
<210> 281
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

10
<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)...(13)
<223> Xaa ="ácido 6-amino hexanoico"

15
<400> 281

Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Xaa
1 5 10

20
<210> 282
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25
<220>
<223> Péptido sintético

30
<220>
<221> VARIANTE
<222> (1) ... 15)
<223> Xaa ="ácido 6-amino hexanoico"

<400> 282

Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

35
<210> 283
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40
<220>
<223> Péptido sintético

45
<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)...(11)
<223> Xaa ="ácido 6-amino hexanoico"

<400> 283

50
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa
1 5 10

55
<210> 284
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

60

ES 2 645 410 T3

	<210> 290	
	<211> 21	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
10	<400> 290	
	gtctgggatg agagccatca c	21
	<210> 291	
	<211> 19	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
20	<400> 291	
	ctgggatgag agccatcac	19
	<210> 292	
25	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
30	<400> 292	
	ctgggatgag agccatcact	20
	<210> 293	
35	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Oligómero sintético	
	<400> 293	
	tgggtatggt gtagccat	18
45	<210> 294	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
	<400> 294	
55	ctgggatgag atccatcact	20
	<210> 295	
	<211> 20	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	

5
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (5) ... (5)
 <223> Enlace de guarilpiperacina de tipo b1

10
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (8) ... (8)
 <223> Enlace de guarilpiperacina de tipo b1

15
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (10) ... (10)
 <223> Enlace de guarilpiperacina de tipo b1

20
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (14) ... (14)
 <223> Enlace de guarilpiperacina de tipo b1

25
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (17)...(17)
 <223> Enlace de guarilpiperacina de tipo b1

30
 <400> 295
 ctgggatgag atccatcact 20

35
 <210> 296
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Oligómero sintético

45
 <400> 296
 cttcgatagt g 11

50
 <210> 297
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> Oligómero sintético

60
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)...(1)
 <223> Enlace de 4-guanidinobutanoilpiperacina de tipo b1

65
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (6) ... (6)
 <223> Enlace de 4-guanidinobutanoilpiperacina de tipo b1

70
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (9)...(9)
 <223> Enlace de 4-guanidinobutanoilpiperacina de tipo b1

75
 <400> 297 cttcgatagt g 11

5
 <210> 298
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligómero sintético

10
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)...(1)
 <223> Enlace de 6-guanidinohexanoilpiperacina de tipo b1

15
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (6)...(6)
 <223> Enlace de 6-guanidinohexanoilpiperacina de tipo b1

20
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (9)...(9)
 <223> Enlace de 6-guanidinohexanoilpiperacina de tipo b1

25
 <400> 298 cttcgatagt g 11

30
 <210> 299
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligómero sintético

35
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (5)...(5)
 <223> Enlace de 6-guanidinohexanoilpiperacina de tipo b1

40
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (8) ... (8)
 <223> Enlace de 6-guanidinohexanoilpiperacina de tipo b1

45
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (10)...(10)
 <223> Enlace de 6-guanidinohexanoilpiperacina de tipo b1

50
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (14)...(14)
 <223> Enlace de 6-guanidinohexanoilpiperacina de tipo b1

55
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (17)...(17)
 <223> Enlace de 6-guanidinohexanoilpiperacina de tipo b1

60
 <400> 299
 ctgggatgag atccatcact 20

65
 <210> 300
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

- <220>
<223> Oligómero sintético
- 5 <220>
<221> modified_base
<222> (5)...(5)
<223> Enlace de 6-aminohexanoilpiperacina de tipo b1
- 10 <220>
<221> modified_base
<222> (8)...(8)
<223> Enlace de 6-aminohexanoilpiperacina de tipo b1
- 15 <220>
<221> modified_base
<222> (10)...(10)
<223> Enlace de 6-aminohexanoilpiperacina de tipo b1
- 20 <220>
<221> modified_base
<222> (18)...(18)
<223> Enlace de 6-aminohexanoilpiperacina de tipo b1
- 25 <400> 300
ctgggatgag atccgatcac t 21
- 30 <210> 301
<211> 11
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>
<223> Oligómero sintético
- 40 <220>
<221> modified_base
<222> (1)...(1)
<223> Enlace de trifluoracetilpiperacina de tipo b1
- 45 <220>
<221> modified_base
<222> (6)...(6)
<223> Enlace de trifluoracetilpiperacina de tipo b1
- 50 <220>
<221> modified_base
<222> (9)...(9)
<223> Enlace de trifluoracetilpiperacina de tipo b1
- 55 <400> 301 cttcgatagt g 11

<210> 302
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 60 <220>
<223> Oligómero sintético
- 65 <220>
<221> modified_base
<222> (5)...(5)
<223> Enlace de 4-metilpiperacina de tipo b1
- 70 <220>
<221> modified_base

ES 2 645 410 T3

<222> (8)...(8)
<223> Enlace de 4-metilpiperacina de tipo b1

5
<220>
<221> modified_base
<222> (10) ... (10)
<223> Enlace de 4-metilpiperacina de tipo b1

10
<220>
<221> modified_base
<222> (14)...(14)
<223> Enlace de 4-metilpiperacina de tipo b1

15
<220>
<221> modified_base
<222> (17)...(17)
<223> Enlace de 4-metilpiperacina de tipo b1

20
<400> 302
ctgggatgag atccatcact 20

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> AVI BIOPHARMA, INC.
- 5 <120> Análogos de oligonucleótidos que tienen enlaces intersubunitarios catiónicos
- <130> 120178.406EP1
- 10 <140> EP 13186973.7
- <141> 2013-10-01
- <150> EP 07 86 1308.0
- <151> 2007-05-10
- 15 <150> US 11/432.216
- <151> 10-05-2006
- <150> US 11/432.031
- <151> 10-05-2006
- 20 <150> US 11/432.155
- <151> 10-05-2006
- <150> US 11/431.968
- <151> 10-05-2006
- 25 <150> US 11/433.257
- <151> 11-05-2006
- 30 <150> US 60/799.976
- <151> 11-05-2006
- <150> US 60/800.145
- <151> 11-05-2006
- 35 <150> US 11/433.213
- <151> 11-05-2006
- <150> US 11/433.214
- <151> 11-05-2006
- 40 <150> US 11/432.033
- <151> 11-05-2006
- 45 <150> US 11/433.840
- <151> 11-05-2006
- <150> US 11/433.724
- <151> 11-05-2006
- 50 <150> US 60/800.076
- <151> 11-05-2006
- <150> US 60/800.120
- <151> 11-05-2006
- 55 <150> US 11/518.058
- <151> 08-09-2006
- 60 <150> US 11/517.757
- <151> 08-09-2006
- <150> US 11/595.161
- <151> 08-11-2006
- 65

<150> US 11/715.572
 <151> 07-03-2007

 <160> 302
 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

 <210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus del Ébola

 <400> 1
 cctgcccttt gttctagttg 20

 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus del Ébola

 <400> 2
 cctgcccttt gttctagttg 20

 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus del Ébola

 <400> 3
 cctgcccttt gttctagttg 20

 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus del Ébola

 <400> 4
 cctgcccttt gttctagttg 20

 <210> 5
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus del Ébola

 <400> 5
 gccatggttt ttctcagg 19

 <210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus del Ébola

 <400> 6
 gccatggttt ttctcagg 19

 <210> 7
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus del Ébola

 <400> 7
 gccatggttt ttctcagg 19

 <210> 8
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus del Ébola

ES 2 645 410 T3

	<400> 8 gccatggttt ttctcagg	19
5	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> Virus del Ébola	
10	<400> 9 ttcaaccttg aaaccttgcg	20
15	<210> 10 <211> 19 <212> ADN <213> Virus del Ébola	
20	<400> 10 gccatggttt ttctcagg	19
25	<210> 11 <211> 20 <212> ADN <213> Virus del Ébola	
30	<400> 11 tgggtatggt gtgtagccat	20
35	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> Virus del Ébola	
40	<400> 12 tgggtatggt gtgtagccat	20
45	<210> 13 <211> 20 <212> ADN <213> Virus del Ébola	
50	<400> 13 tgggtatggt gtgtagccat	20
55	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> Virus del Ébola	
60	<400> 14 tgggtatggt gtgtagccat	20
65	<210> 15 <211> 20 <212> ADN <213> Virus del Ébola	
	<400> 15 ttcaaccttg aaaccttgcg	20
	<210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> Fuente	

ES 2 645 410 T3

<223> /nota - "Descripción de secuencia artificial: oligómero sintético"

5 <400> 16
agtcctgact tgctaccta 20

10 <210> 17
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Oligómero sintético

20 <400> 17
tgtgcttact gtatactac tc 22

25 <210> 18
<211> 19
<212> ADN
<213> Virus de la hepatitis C

30 <400> 18
gtgctcatgg tgcacggtc 19

35 <210> 19
<211> 19
<212> ADN
<213> Virus de la hepatitis C

40 <400> 19
gtgctcatgg tgcacggtc 19

45 <210> 20
<211> 19
<212> ADN
<213> Virus de la hepatitis C

50 <400> 20
gtgctcatgg tgcacggtc 19

55 <210> 21
<211> 19
<212> ADN
<213> Virus de la hepatitis C

60 <400> 21
gtgctcatgg tgcacggtc 19

65 <210> 22
<211> 19
<212> ADN
<213> Virus de la hepatitis C

<400> 22
gtgctcatgg tgcacggtc 19

<210> 23
<211> 19
<212> ADN
<213> Virus de la hepatitis C

<400> 23
gtgctcatgg tgcacggtc 19

ES 2 645 410 T3

<210> 24
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 5
 <400> 24
 gtgctcatgg tgcacggtc 19
 <210> 25
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 10
 <400> 25
 gtgctcatgg tgcacggtc 19
 <210> 26
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 20
 <400> 26
 gtgctcatgg tgcacggtc 19
 <210> 27
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 25
 <400> 27
 gtgctcatgg tgcacggtc 19
 <210> 28
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 30
 <400> 28
 gtgctcatgg tgcacggtc 19
 <210> 29
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 35
 <400> 29
 gtgctcatgg tgcacggtc 19
 <210> 30
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 40
 <400> 30
 gtgctcatgg tgcacggtc 19
 <210> 31
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 45
 <400> 31
 gtgctcatgg tgcacggtc 19
 <210> 32
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 50
 <400> 32
 gtgctcatgg tgcacggtc 19
 <210> 33
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 55
 <400> 33
 gtgctcatgg tgcacggtc 19
 <210> 34
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 60
 <400> 34
 gtgctcatgg tgcacggtc 19
 <210> 35
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 65

<210> 32
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 5
 <400> 32
 gtgctcatgg tgcacggtc 19
 <210> 33
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 10
 <400> 33
 gtgctcatgg tgcacggtc 19
 <210> 34
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 20
 <400> 34
 gtgctcatgg tgcacggtc 19
 <210> 35
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 30
 <400> 35
 gagctgaaag caggccatc cc 22
 <210> 36
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 40
 <400> 36
 gagctgaaag caggccatc cc 22
 <210> 37
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 50
 <400> 37
 gagctgaaag caggccatc cc 22
 <210> 38
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 60
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 65

	<400> 38 gagctgaaag caggtccatc cc	22
5	<210> 39 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligómero sintético	
	<400> 39 gagctgaaag caggtccatc cc	22
15	<210> 40 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligómero sintético	
	<400> 40 gagctgaaag caggtccatc cc	22
25	<210> 41 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligómero sintético	
	<400> 41 gagctgaaag caggtccatc cc	22
35	<210> 42 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligómero sintético	
	<400> 42 gagctgaaag caggtccatc cc	22
45	<210> 43 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligómero sintético	
	<400> 43 acgttgaggg gcatcgtcgc	20
55	<210> 44 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligómero sintético	
65	<220> <223> Oligómero sintético	

	<400> 44 gcaggctggg ccacgtgcat tg	22
5	<210> 45 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligómero sintético	
	<400> 45 cacgtgcatt gctagcatgg	20
15	<210> 46 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligómero sintético	
	<400> 46 ctagcatgga aaagccaaag	20
25	<210> 47 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligómero sintético	
	<400> 47 ggaactcagt gaactcatgc	20
35	<210> 48 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligómero sintético	
	<400> 48 gttactcagt cccatagtgc tg	22
45	<210> 49 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligómero sintético	
	<400> 49 ccatagtgt gtcacaaatg	20
55	<210> 50 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligómero sintético	
65	<210> 50 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligómero sintético	

	<400> 50 gaatgttact cagtccata g	21
5	<210> 51 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligómero sintético	
	<400> 51 gaggctgagg gtcctcaagc t	21
15	<210> 52 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligómero sintético	
	<400> 52 cacattata agagtgcca ggc	23
25	<210> 53 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligómero sintético	
	<400> 53 tcctctcca ttgtgtgtg t	22
35	<210> 54 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligómero sintético	
	<400> 54 ctttcttg tctgttact c	21
45	<210> 55 <211> 32 <212> ADN <213> Región no traducida 5' de picornavirus	
50	<400> 55 ryggraccra ctacttggg tgcctgtt tc	32
55	<210> 56 <211> 32 <212> ADN <213> Región no traducida 5' de picornavirus	
60	<400> 56 tctccggcc cctgaatgyg gctaaycyya ac	32

ES 2 645 410 T3

5	<210> 57 <211> 8 <212> ADN <213> ARN genómico de cadena positiva de flavivirus		
	<400> 57 catattga 8		
10	<210> 58 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
15	<220> <223> Oligómero sintético		
	<400> 58 tcccaggtgt caatatgctg tt	22	
20	<210> 59 <211> 125 <212> ADN <213> ARNm de c-myc humano		
25	<400> 59		
	cgccgctgcc aggacccgct tctctgaaag gctctccttg cagctgctta gacgctggat tttttcggg tagtggaana ccagcagcct cccgcgacga tgcccctcaa cgttagcttc accaa		60 120 125
30	<210> 60 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
35	<220> <223> Oligómero sintético		
	<400> 60 ggaggctgct ggtttccac	20	
40	<210> 61 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
45	<220> <223> Oligómero sintético		
	<400> 61 ggcatgctcg cgggaggctc	20	
50	<210> 62 <211> 21 <212> ADN <213> Poliovirus		
55	<400> 62 cctgagcacc cattatgata c	21	
60	<210> 63 <211> 24 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis A		
	<400> 63 cctgtctag acatgttcat tatt	24	

ES 2 645 410 T3

	<210> 64	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Rinovirus	
5		
	<400> 64	
	ttgagcgccc atgataaca	20
10		
	<210> 65	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Rinovirus	
15		
	<400> 65	
	ttgagcgccc atgataaca	20
20		
	<210> 66	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Rinovirus	
25		
	<400> 66	
	ctgggcaccc atgatgcaa	20
30		
	<210> 67	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Vesivirus	
35		
	<400> 67	
	gagccatagc tcaaattctc	20
40		
	<210> 68	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Vesivirus	
45		
	<400> 68	
	tagctcaaat tctcattac	20
50		
	<210> 69	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Vesivirus	
55		
	<400> 69	
	gagcgttga gccatagctc	20
60		
	<210> 70	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Calicivirus porcino	
65		
	<400> 70	
	gacggcaatt agccatcacg	20
70		
	<210> 71	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Norovirus	
75		
	<400> 71	
	cgacgccatc atcattcac	19

ES 2 645 410 T3

<210> 72
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Calicivirus felino
 5
 <400> 72
 cagagttga gacattgtct c 21
 <210> 73
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 10
 <400> 73
 ccttaataaa ctgatgggcc tcc 23
 <210> 74
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 20
 <400> 74
 ctgatgggcc tccatggc 18
 <210> 75
 <211> 125
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 25
 <400> 75
 aagactgcta gccgagtagt gttgggtcgc gaaaggcctt gtggtactgc ctgatagggt 60
 gcttgcgagt gccccgggag gtctcgtaga ccgtgcacca tgagcacgaa tcctaaacct 120
 caaag 125
 <210> 76
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis C
 35
 <400> 76
 ggccttcgc gaccaaac 20
 <210> 77
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Virus de la encefalitis de San Luis
 40
 <400> 77
 agatgttcgc gtcggtgagc ggagaggaaa cagatttct 40
 <210> 78
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Virus de la encefalitis japonesa
 45
 <400> 78
 agaagttat ctgtgtgaac ttctggcct agtatcgttg 40
 <210> 79
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Virus de la encefalitis del valle de Murray
 55
 60

ES 2 645 410 T3

<400> 79
agacgttcat ctgctgagc ttccgatctc agtattgttt 40

5 <210> 80
<211> 40
<212> ADN
<213> Virus del Nilo occidental

10 <400> 80
agtagttcgc ctgctgagc tgacaaactt agtagtgttt 40

15 <210> 81
<211> 40
<212> ADN
<213> Virus de la fiebre amarilla

20 <400> 81
agtaaatcct gtgtgctaata tgaggtgcat tggctgcaa 40

25 <210> 82
<211> 40
<212> ADN
<213> Dengue de tipo 2

30 <400> 82
agttgttagt ctacgtggac cgacaaagac agattctttg 40

35 <210> 83
<211> 40
<212> ADN
<213> Virus de la hepatitis C

40 <400> 83
gccagcccc tgatgggggc gacactccac catgaatcac 40

45 <210> 84
<211> 40
<212> ADN
<213> Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas

50 <400> 84
agattttctt gcacgtgcat gcgtttgctt cggacagcat 40

55 <210> 85
<211> 40
<212> ADN
<213> Virus de la fiebre hemorrágica de Omsk

60 <400> 85
agattttctt gcacgtgcat gcgcttgctt cagacagcaa 40

65 <210> 86
<211> 40
<212> ADN
<213> Virus de Powassan

70 <400> 86
agattttctt gcacgtgtgt gcggttgctt tagtcagtgt 40

75 <210> 87
<211> 18
<212> ADN
<213> Virus de la encefalitis de San Luis

80

ES 2 645 410 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(18)
 <223> n = A, T, C o G
 5
 <400> 87
 accgacgcga acatcnc 18
 <210> 88
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la encefalitis de San Luis
 <400> 88
 15 tcctctccgc tcaccgacgc 20
 <210> 89
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Virus de la encefalitis japonesa
 <400> 89
 tcacacagat aaactct 18
 25 <210> 90
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la encefalitis japonesa
 30 <400> 90
 aagccaagaa gttcacacag 20
 <210> 91
 <211> 18
 <212> ADN
 35 <213> Virus de la encefalitis del valle de Murray
 <400> 91
 40 tcacgcagat gaacgtct 18
 <210> 92
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la encefalitis del valle de Murray
 45 <400> 92
 gagatcggaa gctcacgcag 20
 <210> 93
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus del Nilo occidental
 50 <400> 93
 gctcacacag gcgaactact 20
 <210> 94
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Virus del Nilo occidental
 60 <400> 94
 taagttgtc agctcacaca g 21
 65

ES 2 645 410 T3

5	<210> 95 <211> 22 <212> ADN <213> Virus de la fiebre amarilla	
	<400> 95 caattagcac acaggattta ct	22
10	<210> 96 <211> 20 <212> ADN <213> Virus de la fiebre amarilla	
	<400> 96 ttgcagacca atgcacctca	20
20	<210> 97 <211> 20 <212> ADN <213> Dengue de tipo 2	
	<400> 97 gtccacgtag actaacaact	20
25	<210> 98 <211> 20 <212> ADN <213> Dengue de tipo 2	
	<400> 98 gtctttgtcg gtccacgtag	20
35	<210> 99 <211> 17 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 99 cccatcaggg ggctggc	17
40	<210> 100 <211> 20 <212> ADN <213> Virus de la hepatitis C	
	<400> 100 tggagtgtcg ccccatcag	20
50	<210> 101 <211> 20 <212> ADN <213> Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas	
	<400> 101 atgcacgtgc aagaaaatct	20
60	<210> 102 <211> 20 <212> ADN <213> Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas	
	<400> 102 atgctgtccg aagcaaacgc	20
65		

ES 2 645 410 T3

<210> 103
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Virus de la fiebre hemorrágica de Omsk
 5
 <400> 103
 cacgcacgtg caagaaaatc t 21
 <210> 104
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la fiebre hemorrágica de Omsk
 10
 <400> 104
 tgaagcaagc gcacgcacgt 20
 <210> 105
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de Powassan
 20
 <400> 105
 acacacgtgc aagaaaatct 20
 <210> 106
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de Powassan
 25
 <400> 106
 aactgacta aagcaccgc 20
 <210> 107
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Poliovirus
 30
 <400> 107
 taaaacagc tctggggtg taccacccc agaggcccac 40
 <210> 108
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano A
 35
 <400> 108
 taaaacagc ctgtgggtg taccaccca caggcccac 40
 <210> 109
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano B
 40
 <400> 109
 taaaacagc ctgtgggtg tcccaccca caggcccatt 40
 <210> 110
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano C
 45
 <400> 110
 taaaacagc tctggggtg ctcccacccc agaggcccac 40
 50
 55
 60
 65

ES 2 645 410 T3

5
<210> 111
<211> 40
<212> ADN
<213> Enterovirus humano D

<400> 111
ttaaacagc tctggggtg ctcccacccc agaggccac 40

10
<210> 112
<211> 40
<212> ADN
<213> Enterovirus humano E

<400> 112
gagtggtccc acccaacagg cccactgggt gttgtactct 40

20
<210> 113
<211> 40
<212> ADN
<213> Enterovirus bovino

<400> 113
ttaaacagc ctgggggtg taccacccc tggggccac 40

25
<210> 114
<211> 40
<212> ADN
<213> Rinovirus humano 89

<400> 114
ttaaactgg gagtgggtg ttccactca ctccacccat 40

35
<210> 115
<211> 40
<212> ADN
<213> Rinovirus humano B

<400> 115
ttaaacagc ggatgggtat cccaccattc gaccattgg 40

40
<210> 116
<211> 40
<212> ADN
<213> Virus de la glosopeda

<400> 116
tgaaagggg gcgctagggt tcacccta gcatgccaac 40

50
<210> 117
<211> 40
<212> ADN
<213> Hepatitis A

<400> 117
ttcaagaggg gtctccggga atttccggag tcctcttgg 40

60
<210> 118
<211> 24
<212> ADN
<213> Poliovirus

<400> 118
ggtacaaccc cagagctgtt ttaa 24

65

ES 2 645 410 T3

<210> 119
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Poliovirus
 5
 <400> 119
 gtgggcctct ggggtgggta 20
 <210> 120
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano A
 10
 <400> 120
 caaccacag gctgtttaa 20
 <210> 121
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano A
 20
 <400> 121
 gtgggccctg tgggtgggta 20
 25
 <210> 122
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano B
 30
 <400> 122
 caaccacag gctgtttaa 20
 <210> 123
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano B
 35
 <400> 123
 aatgggcctg tgggtgggaa 20
 40
 <210> 124
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano C
 45
 <400> 124
 caaccacaga gctgtttaa 20
 50
 <210> 125
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano C
 55
 <400> 125
 gtgggcctct ggggtgggag 20
 <210> 126
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano D
 60
 <400> 126
 caaccacaga gctgtttaa 20
 65

ES 2 645 410 T3

<210> 127
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano D
 5
 <400> 127
 gtgggcctct ggggtgggaa 20
 <210> 128
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano E
 10
 <400> 128
 cctgttgggt gggaacactc 20
 <210> 129
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Enterovirus humano E
 20
 <400> 129
 agagtacaac acccagtggg 20
 <210> 130
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Enterovirus bovino
 25
 <400> 130
 caacccccag gctgttttaa 20
 <210> 131
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Enterovirus bovino
 30
 <400> 131
 gtgggcccca ggggtgggta 20
 <210> 132
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Rinovirus humano 89
 35
 <400> 132
 caaccactc ccagtttaa 20
 <210> 133
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Rinovirus humano 89
 40
 <400> 133
 atgggtggag tgagtgggaa 20
 <210> 134
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Rinovirus humano B
 45
 <400> 134
 ataccatcc gctgttttaa 20
 50
 55
 60
 65

ES 2 645 410 T3

<210> 135
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Rinovirus humano B
 5
 <400> 135
 ccaatgggtc gaatgtggg 20
 <210> 136
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Virus de la glosopeda
 10
 <400> 136
 aaccctagcg ccccttca a 21
 <210> 137
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la glosopeda
 20
 <400> 137
 gttggcatgc taggggtgaa 20
 25
 <210> 138
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Hepatitis A
 30
 <400> 138
 tcccgagac ccctttgaa 20
 <210> 139
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Hepatitis A
 35
 <400> 139
 ccaagagga ctccgaaat 20
 40
 <210> 140
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Calicivirus felino
 45
 <400> 140
 gtaaaagaaa ttgagacaa tgtctcaaac tctgagcttc 40
 50
 <210> 141
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Calicivirus canino
 55
 <400> 141
 gttaatgaga aatggcttct gccatcgctc tctcgagctc 40
 <210> 142
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Calicivirus entérico porcino
 60
 <400> 142
 gtgatcgtga tggctaattg ccgtccgttg cctattgggc 40
 65

ES 2 645 410 T3

<210> 143
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Ceba de calicivirus NB
 5
 <400> 143
 gtgatttaat tatagagaga tagtgacttt cacttttctt 40
 <210> 144
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Virus de Norwalk
 10
 <400> 144
 gtgaatgatg atggcgtcaa aagacgtcgt tcctactgct 40
 <210> 145
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Calicivirus felino
 20
 <400> 145
 ttgtctcaaa tttcttttac 20
 <210> 146
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Calicivirus felino
 25
 <400> 146
 gaagctcaga gtttgagaca 20
 <210> 147
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Calicivirus canino
 30
 <400> 147
 agaagccatt tctcattaac 20
 <210> 148
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Calicivirus canino
 35
 <400> 148
 gagctcgaga gagcgatggc 20
 <210> 149
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Calicivirus entérico porcino
 40
 <400> 149
 caattagcca tcacgatcac 20
 <210> 150
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Calicivirus entérico porcino
 45
 <400> 150
 ggcaacggac ggcaattagc 20
 50
 55
 60
 65

ES 2 645 410 T3

<210> 151
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Cepa de calicivirus NB
 5
 <400> 151
 tctctctata attaaatcac 20
 <210> 152
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Cepa de calicivirus NB
 10
 <400> 152
 aaagtcacta tctctctata 20
 <210> 153
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de Norwalk
 20
 <400> 153
 ttgacgccat catcattcac 20
 <210> 154
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de Norwalk
 25
 <400> 154
 agcagtagga acgacgtctt 20
 <210> 155
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis E
 35
 <400> 155
 gccatggagg cccatcagtt tattaaggct cctggcatca 40
 <210> 156
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis E
 45
 <400> 156
 aactgatggg cctccatggc 20
 <210> 157
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis E
 50
 <400> 157
 tgatgccagg agcottaata 20
 <210> 158
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Virus de la rubeola
 60
 <400> 158
 atggaagcta tcggacctcg ctaggactc ccattccat 40
 65

ES 2 645 410 T3

<210> 159
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Encefalitis equina oriental
 5
 <400> 159
 atagggtagc gtagtaggc aaccacccta ttccaccta 40
 <210> 160
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Encefalomyelitis equina occidntal
 10
 <400> 160
 accctacaaa ctaatcgatc caatatggaa agaattcacg 40
 <210> 161
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Encefalitis equina venezolana
 15
 <400> 161
 atgggaggcg caagagagaa gcccaaacca attacctacc 40
 <210> 162
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la rubeola
 20
 <400> 162
 cgaggtccga tagcttccat 20
 <210> 163
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la rubeola
 25
 <400> 163
 atgggaatgg gtagcctaag 20
 <210> 164
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Encefalitis equina oriental
 30
 <400> 164
 gcctctacac cgtaccctat 20
 <210> 165
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Encefalitis equina oriental
 35
 <400> 165
 taggtgaaa tagggtggt 20
 <210> 166
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Encefalomyelitis equina occidntal
 40
 <400> 166
 gatcgattag ttgtagggt 20

ES 2 645 410 T3

<210> 167
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Encefalomiелitis equina occidental
 5
 <400> 167
 cgtgaattct ttccatattg 20
 <210> 168
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Encefalitis equina venezolana
 10
 <400> 168
 ttctctcttg cgccgcccat 20
 <210> 169
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Encefalitis equina venezolana
 15
 <400> 169
 ggtaggtaat tggttgggc 20
 <210> 170
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Coronavirus de SARS
 20
 <400> 170
 atattaggtt ttacctacc caggaaaagc caaccaacct 40
 <210> 171
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Virus de la diarrea epidémica porcina
 25
 <400> 171
 acttaaaaag atttctatc tacggatagt tagctctttt 40
 <210> 172
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Gastroenteritis transmisible
 30
 <400> 172
 acttttaaag taaagtgagt gtagcgtggc tatatctctt 40
 <210> 173
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Coronavirus bovino
 35
 <400> 173
 gattgcgagc gatttgcgtg cgtgcatccc gcttactga 40
 <210> 174
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Coronavirus humano 229E
 40
 <400> 174
 acttaagtac cttatctatc tacagataga aaagttgctt 40
 45
 50
 55
 60
 65

ES 2 645 410 T3

<210> 175
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Hepatitis murina
 5
 <400> 175
 tataagagtg attggcgctcc gtacgtaccc tctcaactct 40
 <210> 176
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Virus reproductor y respiratorio porcino
 10
 <400> 176
 atgacgtata ggtgttgct ctatgccttg gcattgtat 40
 <210> 177
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Coronavirus de SARS
 20
 <400> 177
 ggtaggtaaa aacctaatat 20
 25
 <210> 178
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Coronavirus de SARS
 30
 <400> 178
 aggttggtg gctttcctg 20
 <210> 179
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la diarrea epidémica porcina
 35
 <400> 179
 gatagaaaat cttttaagt 20
 40
 <210> 180
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus de la diarrea epidémica porcina
 45
 <400> 180
 aaaagagcta actatccgta 20
 50
 <210> 181
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Gastroenteritis transmisible
 55
 <400> 181
 actcacttta ctttaaaagt 20
 <210> 182
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Gastroenteritis transmisible
 60
 <400> 182
 gccacgtac actcacttta 20
 65

ES 2 645 410 T3

5	<210> 183 <211> 20 <212> ADN <213> Coronavirus bovino	
	<400> 183 cacgcaaadc gctcgcaatc	20
10	<210> 184 <211> 20 <212> ADN <213> Coronavirus bovino	
	<400> 184 tcagtgaagc gggatgcacg	20
20	<210> 185 <211> 20 <212> ADN <213> Coronavirus humano 229E	
	<400> 185 gatagataag gtacttaagt	20
25	<210> 186 <211> 20 <212> ADN <213> Coronavirus humano 229E	
	<400> 186 aagcaacttt tctatctgta	20
35	<210> 187 <211> 21 <212> ADN <213> Hepatitis murina	
	<400> 187 cggacgcaa tcactttat a	21
40	<210> 188 <211> 22 <212> ADN <213> Hepatitis murina	
	<400> 188 gagtgagag ggtacgtacg ga	22
50	<210> 189 <211> 21 <212> ADN <213> Virus reproductor y respiratorio porcino	
	<400> 189 catagagcca acacctatac g	21
60	<210> 190 <211> 20 <212> ADN <213> Virus reproductor y respiratorio porcino	
	<400> 190 atacaaatgc caaggcatag	20
65		

ES 2 645 410 T3

<210> 191
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Astrovirus humano
 5
 <400> 191
 ccaagagggg ggtggtgatt ggccttggc ttatcagtgt 40
 <210> 192
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Arteritis equina
 10
 <400> 192
 gctcgaagtg tgtatggtgc catatacggc tcaccacat 40
 <210> 193
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Astrovirus humano
 20
 <400> 193
 aatcaccacc cccctcttgg 20
 <210> 194
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Astrovirus humano
 25
 <400> 194
 gccaaaggcc aatcaccacc 20
 <210> 195
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Arteritis equina
 30
 <400> 195
 gcaccataca cacttcgagc 20
 <210> 196
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Arteritis equina
 35
 <400> 196
 atggtggtga gccgtatag 20
 <210> 197
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Diana Vif de VIH-1
 40
 <400> 197
 gactatggaa aacagatggc aggtgatgat tgt 33
 <210> 198
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Diana TAR de VIH-1
 45
 <400> 198
 gaccagatct gagcctggga gctctctggc taac 34
 50
 55
 60
 65

ES 2 645 410 T3

	<210> 199	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Diana U3R de VIH-1	
5		
	<400> 199	
	cctgtactgg gtctctctgg	20
10		
	<210> 200	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> VIH-1	
15		
	<400> 200	
	cctgccatct gtttccata atc	23
20		
	<210> 201	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> VIH-1	
	<400> 201	
	cacctgccat ctgtttcca ta	22
25		
	<210> 202	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> VIH-1	
30		
	<400> 202	
	cctgccatct gtttccata atc	23
35		
	<210> 203	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> VIH-1	
	<400> 203	
	cacctgccat ctgtttcca ta	22
40		
	<210> 204	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> VIH-1	
45		
	<400> 204	
	gctcccaggc tcagatctgg tc	22
50		
	<210> 205	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> VIH-1	
	<400> 205	
	gtagccaga gagctcccag gc	22
55		
	<210> 206	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> VIH-1	
60		
	<400> 206	
	ccagagagac ccagtacagg	20
65		

ES 2 645 410 T3

5
 <210> 207
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> ARN genómico de cadena positiva de nidovirus

<400> 207
 cuacuuuuucu caacuaaacg aaau 24

10
 <210> 208
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> ARN genómico de cadena positiva de nidovirus

15
 <400> 208
 gaucuuuuug uaaucuaaac uuua 24

20
 <210> 209
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> ARN genómico de cadena positiva de nidovirus

<400> 209
 gaucuguucu cuaaacgaac uuua 24

25
 <210> 210
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Oligómero sintético

35
 <400> 210
 atttcgttta gttgagaaaa g 21

40
 <210> 211
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Oligómero sintético

50
 <400> 211
 gtttagttga gaaaagtag 19

55
 <210> 212
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligómero sintético

60
 <400> 212
 taaagtttag attacaaaaa g 21

65
 <210> 213
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligómero sintético

ES 2 645 410 T3

<400> 213
taaagttcgt ttagagaaca g 21

5 <210> 214
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligómero sintético

<400> 214
gttcgtttag agaacagatc 20

15 <210> 215
 <211> 2717
 <212> ADN
 <213> Transcrito procesado de CD-86 humano

20 <400> 215

ES 2 645 410 T3

```

aggagcctta ggaggtacgg ggagctcgca aatactcctt ttggtttatt cttaccacct      60
tgcttctgtg ttcoctggga atgctgctgt gcttatgcat ctggctctctt tttggagcta      120
cagtggacag gcatttgtga cagcactatg ggactgagta acattctctt tgtgatggcc      180
ttcctgctct ctggtgctgc tcctctgaag attcaagctt atttcaatga gactgcagac      240
ctgccatgcc aatttgcaaa ctctcaaaac caaagcctga gtgagctagt agtattttgg      300
caggaccagg aaacttgggt tctgaatgag gtatacttag gcaaagagaa atttgacagt      360
gttcattcca agtatatggg ccgcacaagt tttgattcgg acagttggac cctgagactt      420
cacaatcttc agatcaagga caagggttg tatcaatgta tcatccatca caaaaagccc      480
acaggaatga ttogcatcca ccagatgaat tctgaactgt cagtgcctgc taacttcagt      540
caacctgaaa tagtaccaat ttctaataata acagaaaatg tgtacataaa tttgacctgc      600
tcatctatac acggttaccc agaacctaaag aagatgagtg ttttgctaag aaccaagaat      660
tcaactatcg agtatgatgg tattatgcag aaatctcaag ataatgtcac agaactgtac      720
gacgtttcca tcagcttgtc ttttctattc cctgatgta cgagcaatat gaccatcttc      780
tgtattctgg aaactgacaa gacgctgctt ttatcttcac ctttctctat agagcttgag      840
gaccctcagc ctccccaga ccacattcct tggattacag ctgtacttcc aacagttatt      900
atatgtgaga tgggtttctg tctaattcta tggaaatgga agaagaagaa gcggcctcgc      960
aactcttata aatgtggaac caacacaatg gagagggaag agagtgaaca gaccaagaaa     1020
agagaaaaaa tccatatacc tgaagatct gatgaagccc agcgtgtttt taaaagtctg     1080
aagacatctt catgcgacaa aagtgataca tgtttttaat taaagagtaa agcccataca     1140
agtattcatt ttttctaccc tttcctttgt aagttcctgg gcaacctttt tgatttcttc     1200
cagaaggcaa aaagacatta ccatgagtaa taagggggct ccaggactcc ctctaagtgg     1260
aatagcctcc ctgtaactcc agctctgctc cgtatgcaa gaggagactt taattctctt     1320
actgcttctt tcacttcag agcacactta tgggccaagc ccagcttaat ggctcatgac     1380
ctggaaataa aatthagac caatacctcc tccagatcag attcttctct taatttcata     1440
gattgtgttt ttttttaaat agacctctca atttctggaa aactgccttt tatctgcccc     1500
gaattctaag ctggtgcccc actgaatctt gtgtactgt gactaaacaa ctacctctc     1560
agctcgggtg ggacttatgt atttatgacc ttatagtgt aatatcttga aacatagaga     1620
tctatgtact gtaatagtgt gattactatg ctctagagaa aagtctacct ctgctaagga     1680
gttctcatcc ctctgtcagg gtcagtaagg aaaacggtgg cctagggtag aggcaacaat     1740
gagcagacca acctaaattt ggggaaatta ggagaggcag agatagaacc tggagccact     1800
tctatctggg ctggttgctaa tattgaggag gcttgcccca cccaacaagc catagtggag     1860
agaactgaat aaacaggaaa atgccagagc ttgtgaaccc tgtttctctt gaagaactga     1920
ctagttagat ggcctgggga agctgtgaaa gaacaaaag agatcacaat actcaaaaga     1980
gagagagaga gaaaaaagag agatcttgat ccacagaaat acatgaaatg tctggtctgt     2040
ccaccccatc aacaagtctt gaaacaagca acagatggat agtctgtcca aatggacata     2100
agacagacag cagtttccct ggtggtcagg gagggtttt ggtgatacc aagtatttg     2160
gatgtcatct tcctggaagc agagctgggg agggagagcc atcaccttga taatgggatg     2220
aatggaagga ggcttaggac tttccactcc tggctgagag aggaagagct gcaacggaat     2280
taggaagacc aagacacaga tcacccgggg cttaacttagc ctacagatgt cctacgggaa     2340
cgtgggctgg cccagcatag ggctagcaaa tttgagttgg atgattgttt ttgctcaagg     2400
caaccagagg aaacttgcac acagagacag atatactggg agaaatgact ttgaaaacct     2460
ggctctaagg tgggatcact aagggatggg gcagtctctg cccaaacata aagagaactc     2520
tggggagcct gagccacaaa aatgttctct tattttatgt aaacctcaa gggtataga     2580
ctgcatgct agacaagctt gtccatgtaa tattcccatg tttttacctt gccctgcct     2640
tgattagact cctagcacct ggctagtttc taacatgttt tgtgcagcac agtttttaat     2700
aaatgcttgt tacattc

```

- <210> 216
- <211> 46
- 5 <212> ADN
- <213> Transcrito procesado de CD-86 humano

- <400> 216
- catttggac agcactatgg gactgagtaa cattctctt gtgatg 46
- 10 <210> 217
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Sitio de corte y empalme de transcrito preprocesado de CD-86 humano
- 15 <400> 217
- agcttgagga ccctcagcct c 21

ES 2 645 410 T3

<210> 218
<211> 23
<212> ADN
<213> Sitio de corte y empalme de transcrito preprocesado de CD-86 humano
5
<400> 218
gcctcgcaac tctataaat gtg 23
<210> 219
<211> 22
<212> ADN
<213> Sitio de corte y empalme de transcrito preprocesado de CD-86 humano
10
<400> 219
gaaccaacac aatggagagg ga 22
<210> 220
<211> 21
<212> ADN
<213> Sitio de corte y empalme de transcrito preprocesado de CD-86 humano
20
<400> 220
gagtgaacag accaagaaaa g 21
<210> 221
<211> 50
<212> ADN
<213> Cadena positiva de la gripe A
25
<400> 221
agcgaagca ggcaaccrau uugauggau gucaauccga ccuacuuuu 50
<210> 222
<211> 25
<212> ADN
<213> Cadena menos de la gripe A
35
<400> 222
agtgattatc taccctgctt ttgct 25
<210> 223
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
40
<220>
<223> Oligómero sintético
45
<400> 223
agcaaaagca ggtagataa tc 22
<210> 224
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
50
<220>
<223> Oligómero sintético
55
<400> 224
gacatccatt caaatggtt g 21
<210> 225
<211> 2823
<212> ADN
<213> Transcrito procesado de miostatina humana
60
65

ES 2 645 410 T3

<400> 225

```

agattcactg gtgtggcaag ttgtctctca gactgtacat gcattaaaaa tttgcttggc      60
attactcaaa agcaaaagaa aagtaaaagg aagaacaag aacaagaaaa aagattatat      120
tgattttaa atcatgcaaa aactgcaact ctgtgtttat atttacctgt ttatgctgat      180
tgttgctggt ccagtggatc taaatgagaa cagtgagcaa aaagaaaatg tggaaaaaga      240
ggggctgtgt aatgcatgta cttggagaca aaactactaa tcttcaagaa tagaagccat      300
taagatacaa atcctcagta aacttcgtct ggaaacagct cctaacatca gcaaagatgt      360
tataagacaa cttttaccca aagctcctcc actccgggaa ctgattgatc agtatgatgt      420
ccagagggat gacagcagcg atggctcttt ggaagatgac gattatcacg ctacaacgga      480
aacaatcatt accatgccta cagagtctga ttttctaata caagtggatg gaaaacccaa      540
atggtgcttc tttaaattta gctctaaaat acaatacaat aaagtagtaa aggcccaact      600
atggatatat ttgagaccog tcgagactcc tacaacagtg tttgtgcaaa tcctgagact      660
catcaaacct atgaaagacg gtacaaggta tactggaatc cgatctctga aacttgacat      720
gaacccagcg actgggtattt ggcagagcat tgatgtgaag acagtgttgc aaaattggct      780
caacaacact gaatccaact taggcattga aataaaagct ttagatgaga atggctatga      840
tcttgctgta accttcccag gaccaggaga agatgggctg aatccgtttt tagaggtcaa      900
ggtaacagac acaccaaaaa gatccagaag ggattttggg ctgactgtg atgagcactc      960
aacagaatca cgatgctgtc gttaccctct aactgtggat ttgaaagctt ttggatggga     1020
ttggattatc gctcctaaaa gatataaggc caattactgc tctggagagt gtgaatttgt     1080
atttttacaa aaatatcctc atactcatct ggtacaccaa gcaaacccca gaggttcagc     1140
aggcccttgc tgtactocca caaagatgtc tccaattaat atgctatatt ttaattggcaa     1200
agaacaaata atatatggga aaattccagc gatggtagta gaccgctgtg ggtgctcatg     1260
agatttatat taagcgttca taacttctta aaacatggaa ggttttcccc tcaacaattt     1320
tgaagctgtg aaattaagta ccacaggcta taggcctaga gtatgctaca gtcacttaag     1380
cataagctac agtatgtaaa ctaaaagggg gaatatatgc aatggttggc atttaacctat     1440
ccaaacaaat catacaagaa agttttatga tttccagagt ttttgagcta gaaggagatc     1500
aaattacatt tatgttccta tatattacaa catcggcgag gaaatgaaag cgattctcct     1560
tgagttctga tgaattaaag gagtatgctt taaagtctat ttctttaaag ttttgtttaa     1620
tatttacaga aaaatccaca tacagtattg gtaaaatgca ggattgttat ataccatcat     1680
tcgaatcatc cttaaacact tgaatttata ttgtatggta gtatacttgg taagataaaa     1740
ttccacaaaa atagggatgg tgcagcatat gcaatttcca ttcttattat aattgacaca     1800
gtacattaac aatccatgcc aacggtgcta atacgatagg ctgaaatgtc gaggctacca     1860
ggtttatcac ataaaaaaca ttcagtaaaa tagtaagttt ctcttttctt caggggcatt     1920
ttcctacacc tccaaatgag gaatggattt tctttaatgt aagaagaatc atttttctag     1980
aggttggctt tcaattctgt agcatacttg gagaaactgc attatcttaa aaggcagtca     2040
aatgggtgtt gtttttatca aaatgtcaaa ataacatact tggagaagta tgaattttg     2100
tctttggaat attacaacac tgcctttgca acactgcagt ttttatggta aaataataga     2160
aatgatcgac tctatcaata ttgtataaaa agactgaaac aatgcattta tataatatgt     2220
atacaatatt gttttgtaaa taagtgtctc cttttttatt tactttggta tttttttaca     2280
ctaaggacat ttcaaattaa gtactaaggc acaaagacat gtcattgcat acagaaaagc     2340
aactacttat atttcagagc aaattagcag attaaatagt ggtcttaaaa ctccatagt     2400
taatgattag atggttatat tacaatcatt ttatatTTTT ttacatgatt aacattcact     2460
tatggattca tgatggctgt ataaagttaa tttgaaattt caatggttta ctgtcattgt     2520
gtttaaatct caacgttcca ttattttaat acttgcaaaa acattactaa gtataccaaa     2580
ataattgact ctattatctg aaatgaagaa taaactgatg ctatctcaac aataactgtt     2640
acttttattt tataatttga taatgaatat atttctgcat ttatttactt ctgttttgta     2700
aattgggatt ttgttaatca aatttattgt actatgacta aatgaaatta tttcttacct     2760
ctaatttgta gaaacagtat aagttatatt aaagtgtttt cacatttttt tgaagacaaa     2820
aaa

```

5 <210> 226
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Sitio de corte y empalme de transcrito preprocesado de miostatina humana

10 <400> 226
 acaatcatta ccagcctac agagtgaag tagtctatt agtgtatc 50

<210> 227
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Sitio de corte y empalme de transcrito preprocesado de miostatina humana

<400> 227
 cttttcttt cttattcatt tatagctgat ttctaatgc aagtggatgg 50

ES 2 645 410 T3

<210> 228
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Sitio de corte y empalme de transcrito preprocesado de miostatina humana
 5
 <400> 228
 cccaggacca ggagaagatg ggctggaag tgataactga aaataacatt 50
 <210> 229
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Sitio de corte y empalme de transcrito preprocesado de miostatina humana
 10
 <400> 229
 tgattgtct ttcctttca aacagaatcc gtttttagag gtcaaggtaa 50
 15
 <210> 230
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 25
 <400> 230
 actctgtagg catggaatg 20
 <210> 231
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 35
 <400> 231
 cagcccatct tctcctgg 18
 <210> 232
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 45
 <400> 232
 cactgcatt agaaatcag 20
 50
 <210> 233
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 <400> 233
 cttgacctct aaaaacggat t 21
 60
 <210> 234
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65

<220>
 <223> Oligómero sintético

5 <400> 234
 gttggrtr gccgattca ggggccggag ga 32

10 <210> 235
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligómero sintético

<400> 235
 ccgattcag gggccggagg 20

20 <210> 236
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Oligómero sintético

<400> 236
 ggattagccg cattcagggg cc 22

30 <210> 237
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Oligómero sintético

<400> 237
 gttgggatta gccgattca g 21

40 <210> 238
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligómero sintético

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(37)
 <223> n = A, T, C o G

55 <400> 238
 aaaangaaac acggacacc aaagtagtgc gttccgc 37

60 <210> 239
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Oligómero sintético

<400> 239
 cacccaaagt agtcggtcc 20

ES 2 645 410 T3

5	<210> 240 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligómero sintético	
10	<400> 240 cacggacacc caaagtagtc	20
	<210> 241 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligómero sintético	
20	<400> 241 ggaaacacgg acacccaaag	20
	<210> 242 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligómero sintético	
30	<400> 242 aaaaggaaac acggacaccc	20
	<210> 243 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligómero sintético	
40	<400> 243 atgaaacacg gacacccaaa g	21
	<210> 244 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligómero sintético	
50	<400> 244 gaaacacgga cacccaaagt ag	22
	<210> 245 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligómero sintético	
60	<400> 245 gagaaacacg gacacccaaa gtag	24

ES 2 645 410 T3

<210> 246
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Sitio de corte y empalme de transcrito preprocesado de antígeno 4 de células T humanas
 5
 <400> 246
 gcatgagttc actgagttcc ctttggcttt tccatgctag caatgcacgt ggcccagcct 60
 gctgtggtac tggccagcag ccgaggcatc gccagctttg 100

<210> 247
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus del Ébola
 10
 <400> 247
 gagggcgca tgggggaggc 20
 <210> 248
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Virus del Ébola
 15
 <400> 248
 gacctatggc agccccgctc g 21
 20
 <210> 249
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus del Ébola
 25
 <400> 249
 gcagcagttc ttctccgtgg 20
 30
 <210> 250
 <211> 125
 <212> ARN
 <213> Región AUG de VP35 del virus del Ébola
 35
 <400> 250
 aaugaugaag auuaaaaccu ucaucauccu uacgucaauu gaauucucua gcacucgaag 60
 cuuauugucu ucaauguaaa agaaaagcug gucuaacaag augacaacua gaacaaaggg 120
 40
 caggg 125
 <210> 251
 <211> 125
 <212> ADN
 <213> Región AUG de VP24 del virus del Ébola
 45
 <400> 251
 cguuccaaca aucgagcgca agguuucag guugaacuga gagugucuag acaacaaaau 60
 auugauacuc cagacaccaa gcaagaccug agaaaaaacc auggcuaaag cuacgggacg 120
 50
 auaca 125
 <210> 252
 <211> 124
 <212> ARN
 <213> Región AUG de L del virus del Ébola
 55
 <400> 252
 guagauuaag aaaaaagccu gaggaagauu aagaaaaacu gcuuauuggg ucuuuccgug 60
 uuuuagauga agcaguugaa auucuuccuc uugauuuuaa auggcuaacac aacauaccca 120
 auac 124

ES 2 645 410 T3

	<210> 253		
	<211> 125		
	<212> ARN		
5	<213> Región AUG de VP35 del virus de Marburg		
	<400> 253		
	cuaaaaaucg aagaauaua aagguuuucu uuaauauca gaaaagguuu uuuauucucu		60
	ucuuucuuuu ugcaacaaua uugaaaauau aauuuucaca augugggacu caucauauau		120
	gcaac		125
10	<210> 254		
	<211> 125		
	<212> ARN		
	<213> Región AUG de VP24 del virus de Marburg		
15	<400> 254		
	uucauucaaa caccccaau uucaaucau acacauaaua accauuuuag uagcguuacc		60
	uuucaauaca aucuagguga uugugaaaag acuuccaaac auggcagaau uaucaacgcg		120
	uuaca		125
20	<210> 255		
	<211> 125		
	<212> ARN		
	<213> Región AUG de L del virus de Marburg		
25	<400> 255		
	ucauucucuu cgauacacgu uauaucuuua gcaaaguaau gaaaauagcc uugucauguu		60
	agacgcagcu uauccaucuu aagugaaucc uuucucaau augcagcauc caacucaaua		120
	uccug		125
30	<210> 256		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> Oligómero sintético		
	<400> 256		
	gtccacatt gtgaaaatta t	21	
40	<210> 257		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Oligómero sintético		
	<400> 257		
	ctgtgcat atatgatgag tc	22	
50	<210> 258		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> Oligómero sintético		
	<400> 258		
	gttgtaacgc gttgataatt ctg	23	

ES 2 645 410 T3

	<210> 259	
	<211> 19	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
10	<400> 259	
	gctgcatatt gaagaaagg	19
	<210> 260	
	<211> 22	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
20	<400> 260	
	catcaggata ttgagttgga tg	22
	<210> 261	
25	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> ARNv de arenavirus	
	<400> 261	
30	cgcacmgdgg atcctaggc	19
	<210> 262	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
40	<400> 262	
	cgcttaggat ccccggtgcg	20
	<210> 263	
45	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
50	<400> 263	
	cgcttaggat ccccggtgcg c	21
	<210> 264	
55	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligómero sintético	
60	<400> 264	
	gccttaggatc cactgtgcg	20

5	<p><210> 265 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Oligómero sintético</p>	
10	<p><220> <221> modified_base <222> (12)...(12) <223> n = Inosina</p>	
15	<p><220> <221> modified_base <222> (14)...(14) <223> n = Inosina</p>	
20	<p><400> 265 gcctaggatc cncngtgcg</p>	19
25	<p><210> 266 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Oligómero sintético</p>	
30	<p><220> <221> modified_base <222> (13)...(13) <223> n = Inosina</p>	
35	<p><220> <221> modified_base <222> (15)...(5) <223> n = Inosina</p>	
40	<p><400> 266 cgcctaggat ccncngtgcg</p>	20
45	<p><210> 267 <211> 20 <212> ARN <213> ARN de cadena positiva de flavivirus</p>	
50	<p><400> 267 gucaauaugc uaaaacgcgg</p>	20
55	<p><210> 268 <211> 20 <212> ARN <213> ARN de cadena positiva de flavivirus</p>	
	<p><400> 268 aucaauaugc ugaaacgcgg</p>	20
60	<p><210> 269 <211> 20 <212> ADN <213> ARN de cadena positiva de flavivirus</p>	
65	<p><400> 269 gucaauaugg uacgacgagg</p>	20

ES 2 645 410 T3

5
<210> 270
<211> 21
<212> ADN
<213> ARN de cadena positiva de flavivirus

<400> 270
cuuucuuau gcugaaacgc g 21

10
<210> 271
<211> 21
<212> ADN
<213> ARN de cadena positiva de flavivirus

<400> 271
cuaucuuau gcugaaacgc g 21

20
<210> 272
<211> 22
<212> ADN
<213> ARN de cadena positiva de flavivirus

<400> 272
cagcuuagga gaacaagagc ug 22

25
<210> 273
<211> 20
<212> ADN
<213> ARN de cadena positiva de flavivirus

<400> 273
ggcugucaau augcuaaaac 20

35
<210> 274
<211> 22
<212> ADN
<213> ARN de cadena positiva de flavivirus

<400> 274
aacagcauau ugacaccugg ga 22

40
<210> 275
<211> 23
<212> ADN
<213> ARN de cadena positiva de flavivirus

<400> 275
ugggaccua uugacgccag gga 23

50
<210> 276
<211> 22
<212> ADN
<213> ARN de cadena positiva de flavivirus

<400> 276
aaacagcaua uugacgcugg ga 22

60
<210> 277
<211> 22
<212> ADN
<213> ARN de cadena positiva de flavivirus

<400> 277
cgguucuugu ucuccugag cc 22

65

ES 2 645 410 T3

5
 <210> 278
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(13)
 <223> Xaa =“ácido 6-amino hexanoico”

15
 <400> 278

Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Xaa
 1 5 10

20
 <210> 279
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

25
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(14)
 <223> Xaa =“ácido 6-amino hexanoico”

30
 <400> 279

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa
 1 5 10

35
 <210> 280
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Péptido sintético

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(14)
 <223> Xaa=“ácido 6-amino hexanoico”

45
 <400> 280

Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Xaa
 1 5 10

50
 <210> 281
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

60

ES 2 645 410 T3

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(13)
 <223> Xaa ="ácido 6-amino hexanoico"
 5
 <400> 281

 Arg Xaa Xaa
 1 5 10
 10
 <210> 282
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido sintético

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(15)
 <223> Xaa ="ácido 6-amino hexanoico"
 20
 <400> 282

 Arg Xaa Xaa
 1 5 10 15
 25
 <210> 283
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Péptido sintético
 35
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(11)
 <223> Xaa ="ácido 6-amino hexanoico"
 40
 <400> 283

 Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa
 1 5 10
 45
 <210> 284
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Péptido sintético

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(14)
 <223> Xaa ="ácido 6-amino hexanoico"
 55
 <400> 284

 Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Xaa
 1 5 10
 60

<210> 285
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(17)
 <223> Xaa = "ácido 6-amino hexanoico"
 10
 <400> 285
 15

Arg	Xaa														
1				5				10						15	
Xaa															

 <210> 286
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 25
 <400> 286
 cctcttacct cagttaca 18
 <210> 287
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus del Ébola
 30
 <400> 287
 tgggtatggt gtgtagccat 20
 <210> 288
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus del Ébola
 40
 <400> 288
 cctgcccttt gttctagttg 20
 <210> 289
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus del Ébola
 45
 <400> 289
 gccatggttt ttctcagg 19
 <210> 290
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Oligómero sintético
 60
 <400> 290
 gtctgggatg agagccatca c 21

5
 <210> 291
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligómero sintético

10
 <400> 291
 ctgggatgag agccatcac 19

15
 <210> 292
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligómero sintético

20
 <400> 292
 ctgggatgag agccatcact 20

25
 <210> 293
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligómero sintético

30
 <400> 293
 tgggtatgtt gtagccat 18

35
 <210> 294
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Oligómero sintético

45
 <400> 294
 ctgggatgag atccatcact 20

50
 <210> 295
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligómero sintético

55
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (5)...(5)
 <223> Enlace de guarilpiperacina de tipo b1

60
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (8)...(8)
 <223> Enlace de guarilpiperacina de tipo b1

65
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (10)...(10)
 <223> Enlace de guarilpiperacina de tipo b1

<220>
 <221> modified_base
 <222> (14)...(14)
 <223> Enlace de guarilpiperacina de tipo b1
 5

<220>
 <221> modified_base
 <222> (17)...(17)
 <223> Enlace de guarilpiperacina de tipo b1
 10

<400> 295
 ctgggatgag atccatcact 20

<210> 296
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15

<220>
 <223> Oligómero sintético
 20

<400> 296
 cttcgatagt g 11

<210> 297
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25

<220>
 <223> Oligómero sintético
 30

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)...(1)
 <223> Enlace de 4-guanidinobutanoilpiperacina de tipo b1
 35

<220>
 <221> modified_base
 <222> (6) . . . (6)
 <223> Enlace de 4-guanidinobutanoilpiperacina de tipo b1
 40

<220>
 <221> modified_base
 <222> (9) . . . (9)
 <223> Enlace de 4-guanidinobutanoilpiperacina de tipo b1
 45

<400> 297
 cttcgatagt g 11
 50

<210> 298
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55

<220>
 <223> Oligómero sintético
 60

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)...(1)
 <223> Enlace de 6-guanidinohexanoilpiperacina de tipo b1

5
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (6) . . . (6)
 <223> Enlace de 6-guanidinohexanoilpiperacina de tipo b1

10
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (9) . . . (9)
 <223> Enlace de 6-guanidinohexanoilpiperacina de tipo b1

15
 <400> 298
 cttcgatagt g 11

20
 <210> 299
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Oligómero sintético

30
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (5)...(5)
 <223> Enlace de 6-guanidinohexanoilpiperacina de tipo b1

35
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (8)...(8)
 <223> Enlace de 6-guanidinohexanoilpiperacina de tipo b1

40
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (10)...(10)
 <223> Enlace de 6-guanidinohexanoilpiperacina de tipo b1

45
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (14)...(14)
 <223> Enlace de 6-guanidinohexanoilpiperacina de tipo b1

50
 <400> 299
 ctgggatgag atccatcact 20

55
 <210> 300
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <223> Oligómero sintético

65
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (5)...(5)
 <223> Enlace de 6-aminohexanoilpiperacina de tipo b1

<220>
 <221> modified_base

<222> (8)...(8)
 <223> Enlace de 6-aminohexanoilpiperacina de tipo b1

 5 <220>
 <221> modified_base
 <222> (10)...(10)
 <223> Enlace de 6-aminohexanoilpiperacina de tipo b1

 10 <220>
 <221> modified_base
 <222> (18)...(18)
 <223> Enlace de 6-aminohexanoilpiperacina de tipo b1

 15 <400> 300
 ctgggatgag atccgatcac t 21

 20 <210> 301
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Oligómero sintético

 30 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)...(1)
 <223> Enlace de trifluoracetilpiperacina de tipo b1

 35 <220>
 <221> modified_base
 <222> (6) . . . (6)
 <223> Enlace de trifluoracetilpiperacina de tipo b1

 40 <220>
 <221> modified_base
 <222> (9) . . . (9)
 <223> Enlace de trifluoracetilpiperacina de tipo b1

 45 <400> 301
 cttcgatagt g 11

 50 <210> 302
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> Oligómero sintético

 60 <220>
 <221> modified_base
 <222> (5)...(5)
 <223> Enlace de 4-metilpiperacina de tipo b1

 65 <220>
 <221> modified_base
 <222> (8)...(8)
 <223> Enlace de 4-metilpiperacina de tipo b1

 70 <220>
 <221> modified_base
 <222> (10)...(10)
 <223> Enlace de 4-metilpiperacina de tipo b1

ES 2 645 410 T3

<220>
<221> modified_base
<222> (14)...(14)
<223> Enlace de 4-metilpiperacina de tipo b1

5

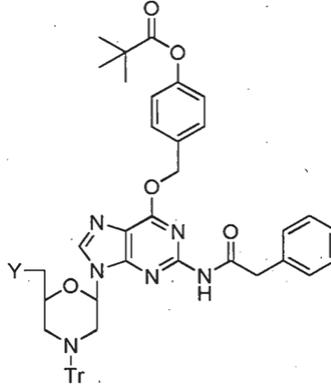
<220>
<221> modified_base
<222> (17)...(17)
<223> Enlace de 4-metilpiperacina de tipo b1

10

<400> 302
ctgggatgag atccatcact 20

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la siguiente estructura:

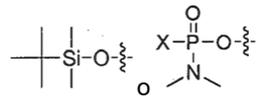


5

en la que:

Y es -OH,

10

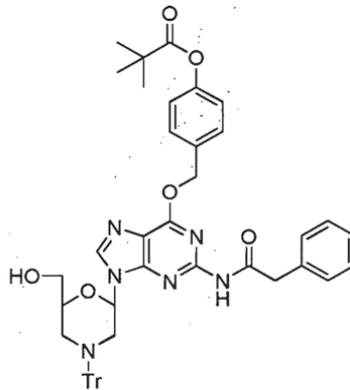


en la que X es Cl, el nitrógeno de anillo de morfolino de una subunidad de morfolino en un oligómero morfolino o un enlace con un soporte sólido; y

15

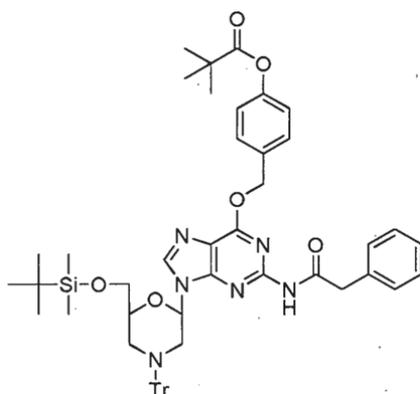
Tr es tritilo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la siguiente estructura:

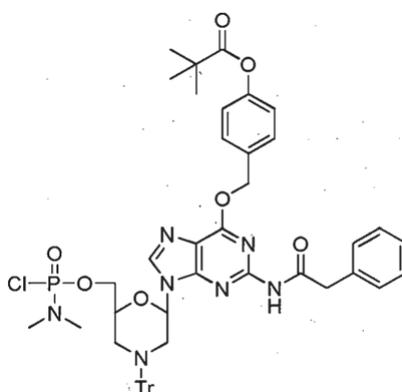


20

3. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la siguiente estructura:



4. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la siguiente estructura:



- 5
5. El compuesto de la reivindicación 1, en el que X es un enlace con un soporte sólido.
6. El compuesto de la reivindicación 1, en el que X es el nitrógeno de anillo de una subunidad de morfolino en un oligómero morfolino.
7. Uso del compuesto de la reivindicación 2 o 3 en un método para la preparación del compuesto de la reivindicación 4 o 5.
8. Uso del compuesto de la reivindicación 4 o 5 para síntesis de un oligómero morfolino.
9. Un método para la preparación de un oligómero morfolino, comprendiendo el método hacer reaccionar el compuesto de la reivindicación 5 con una subunidad de morfolino activada.
10. Un método para la preparación de un oligómero morfolino, comprendiendo el método hacer reaccionar una subunidad de morfolino con soporte de fase sólida, que tiene un nitrógeno de anillo desprotegido con el compuesto de la reivindicación 4.
11. Un método para destilación de un oligómero morfolino, comprendiendo el método poner el oligómero morfolino obtenido por el método de la reivindicación 9 o 10 con una solución que comprende trifluoroacetato de 4-cianopiridinio y trifluoroetanol.
12. El método de la reivindicación 11, en el que la solución comprende trifluoroacetato de 4-cianopiridinio 2 % (p/v) en trifluoroetanol/diclorometano 20 % con etanol 1 %.

30

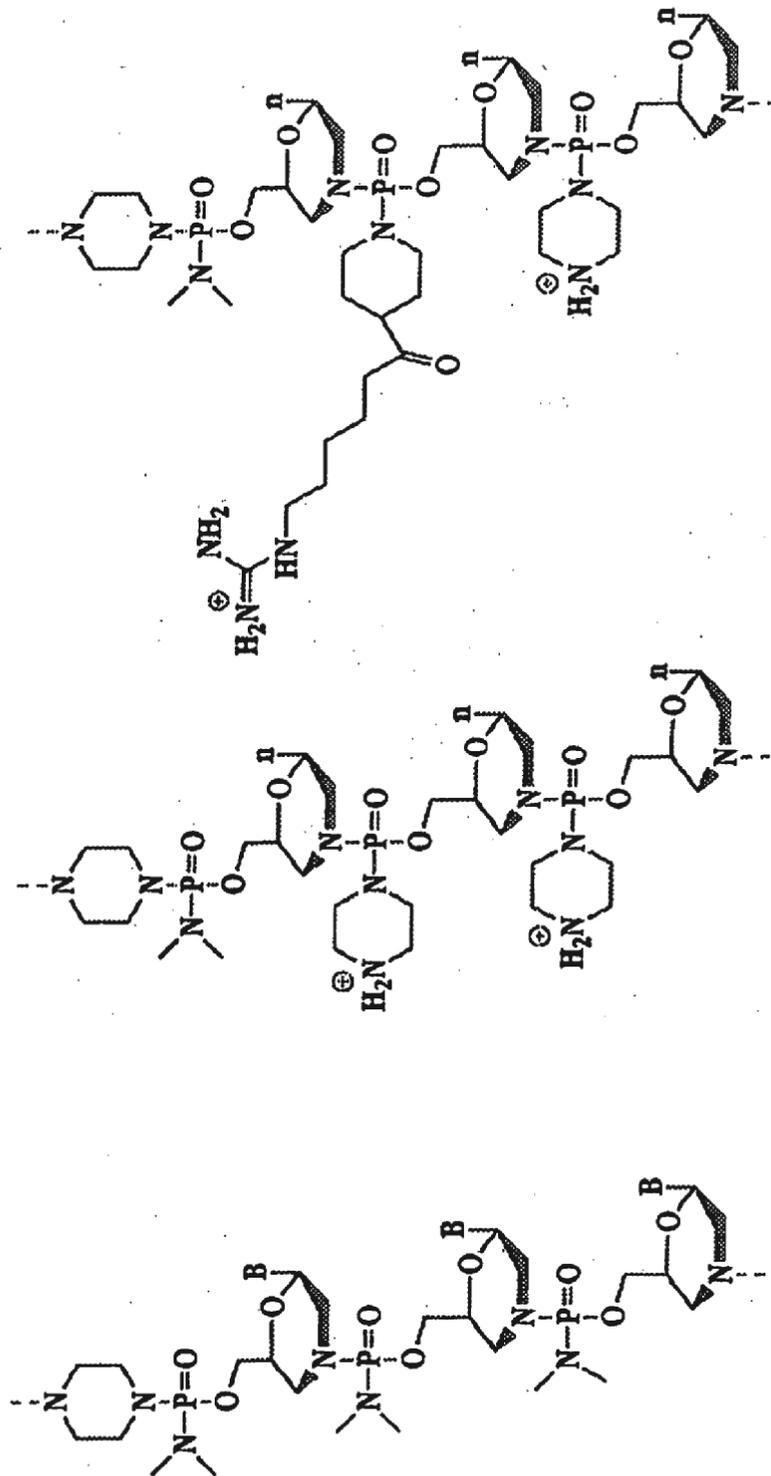


Fig. 1C

Fig. 1B

Fig. 1A

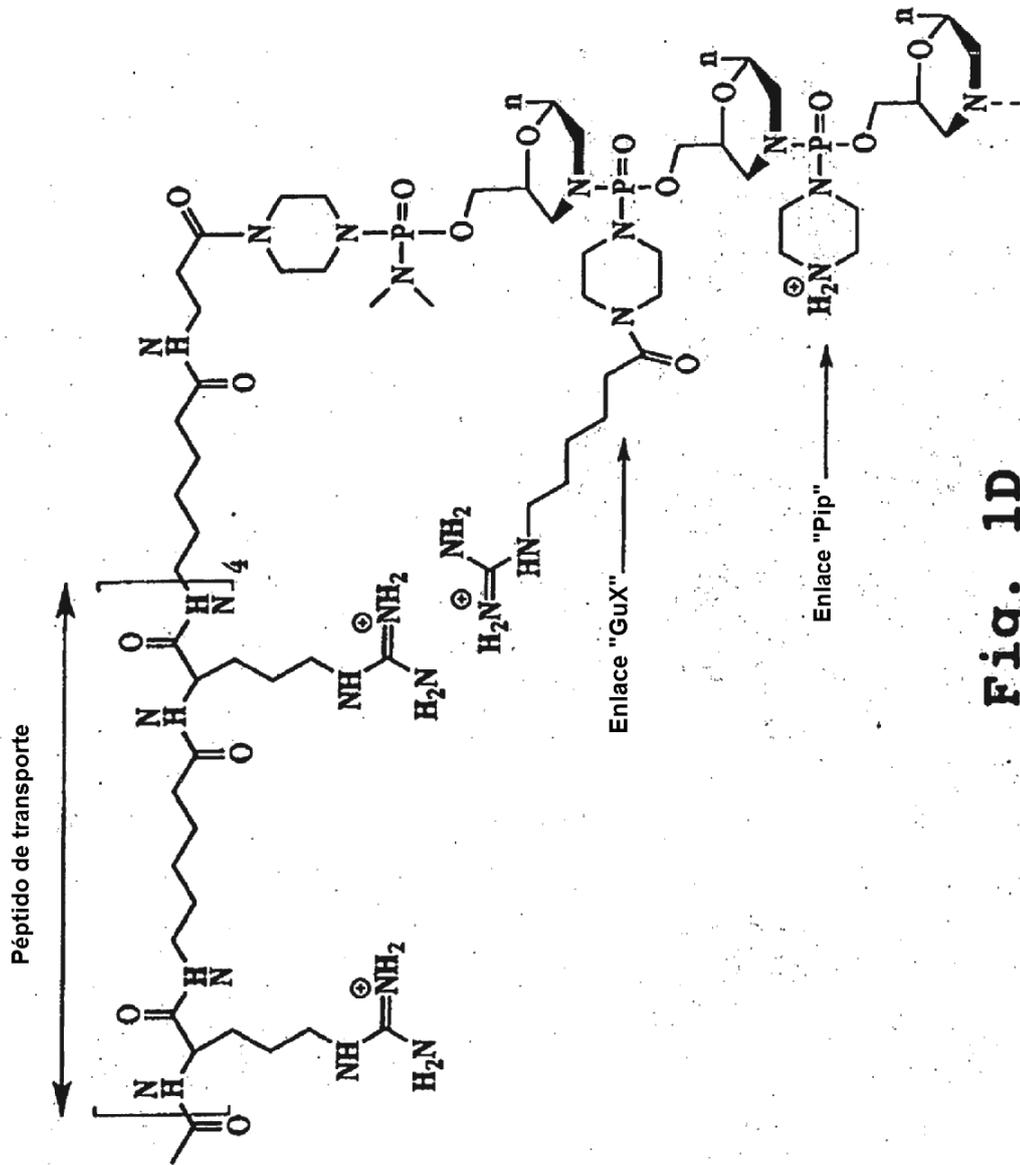
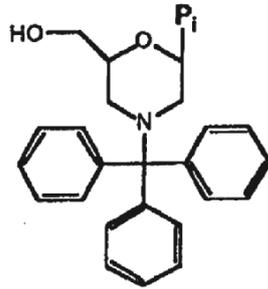


Fig. 1D



1a-e, donde P₁ =

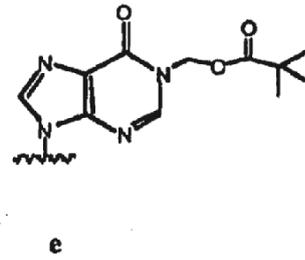
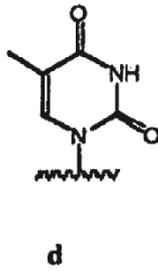
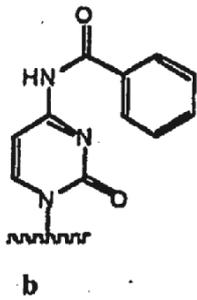
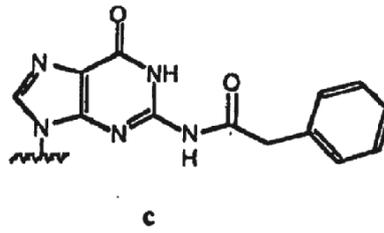
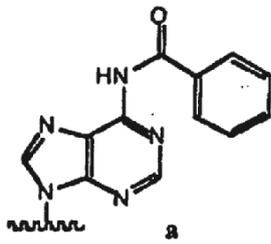


Fig. 2A

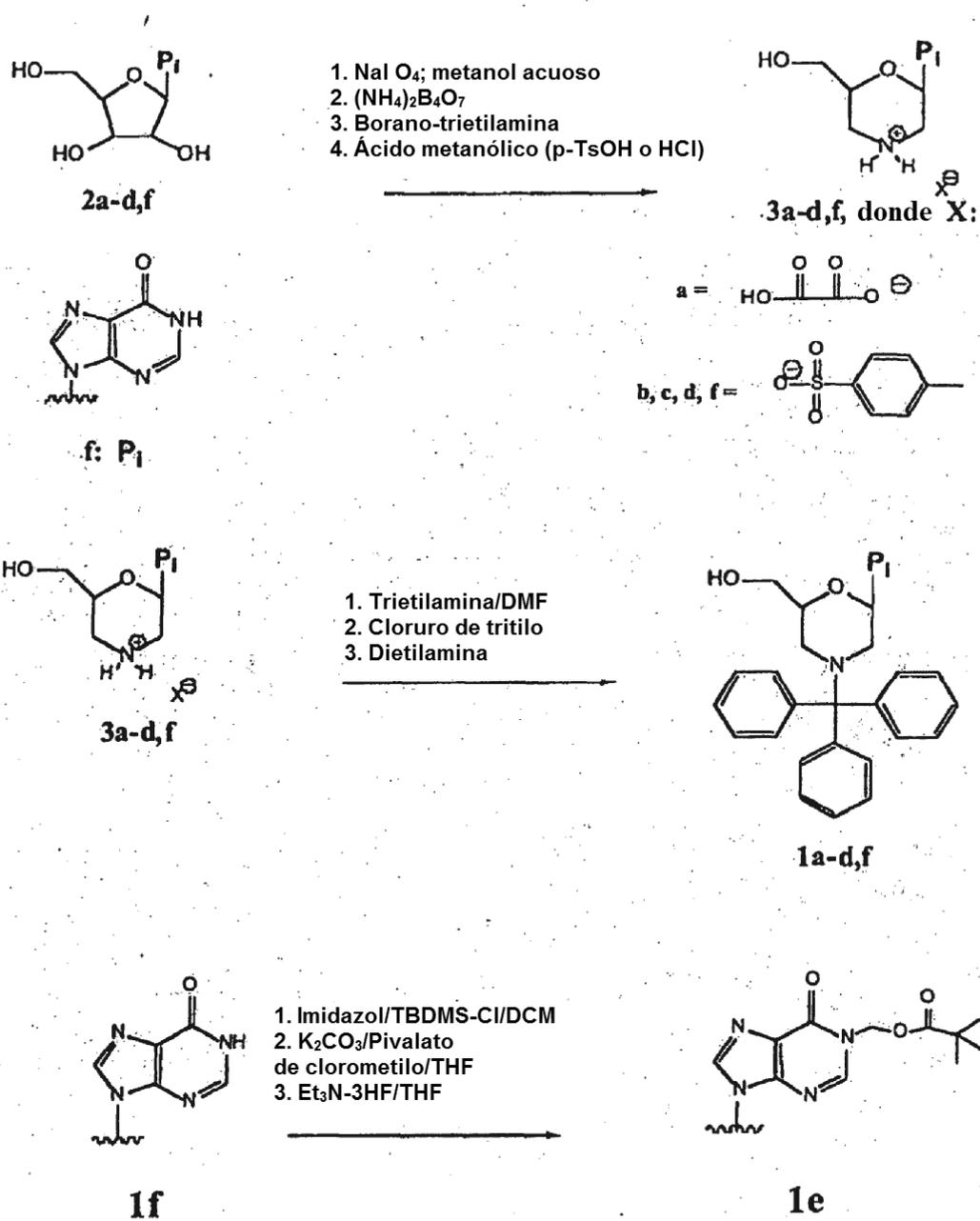


Fig. 2B

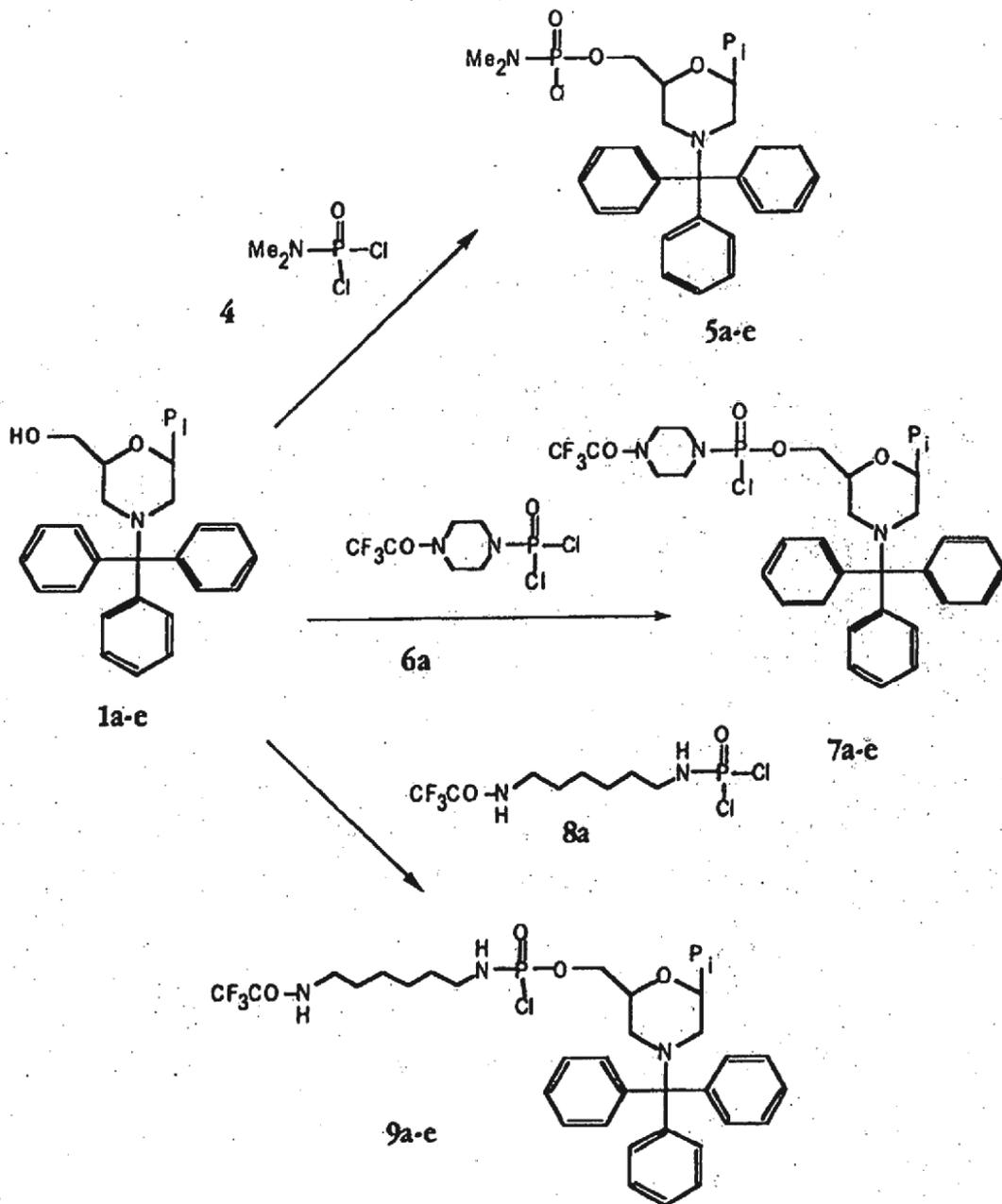


Fig. 2C

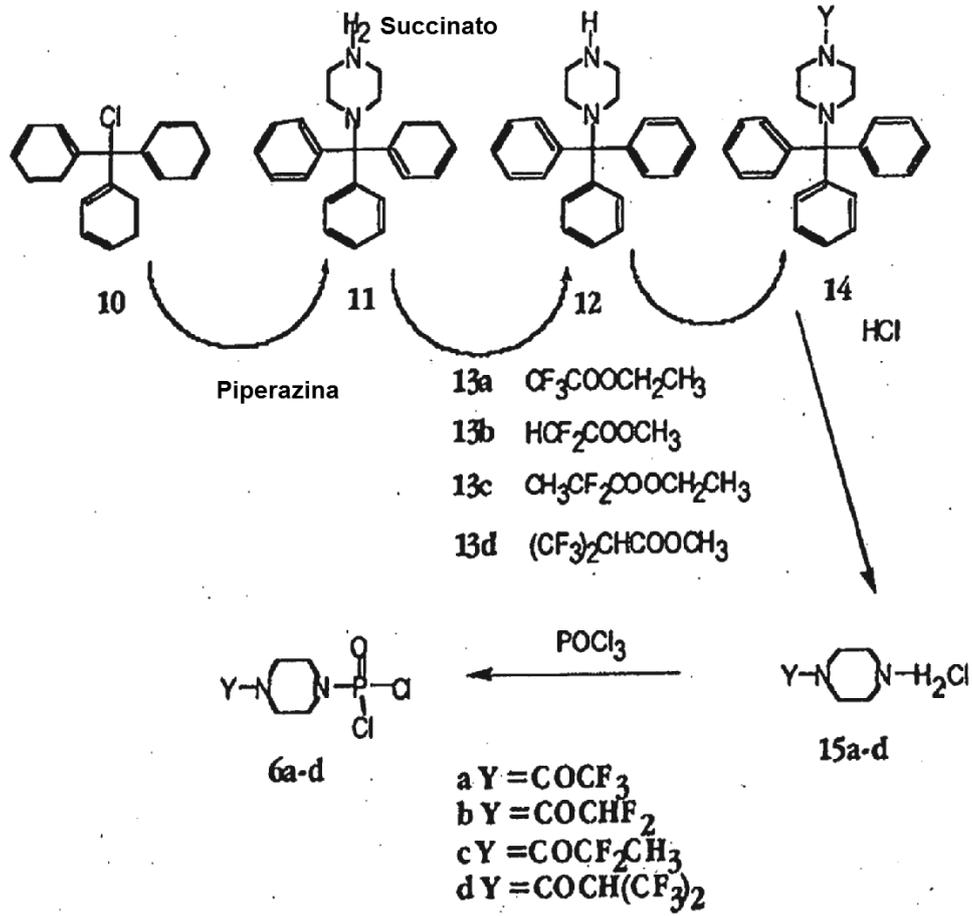


Fig. 2D

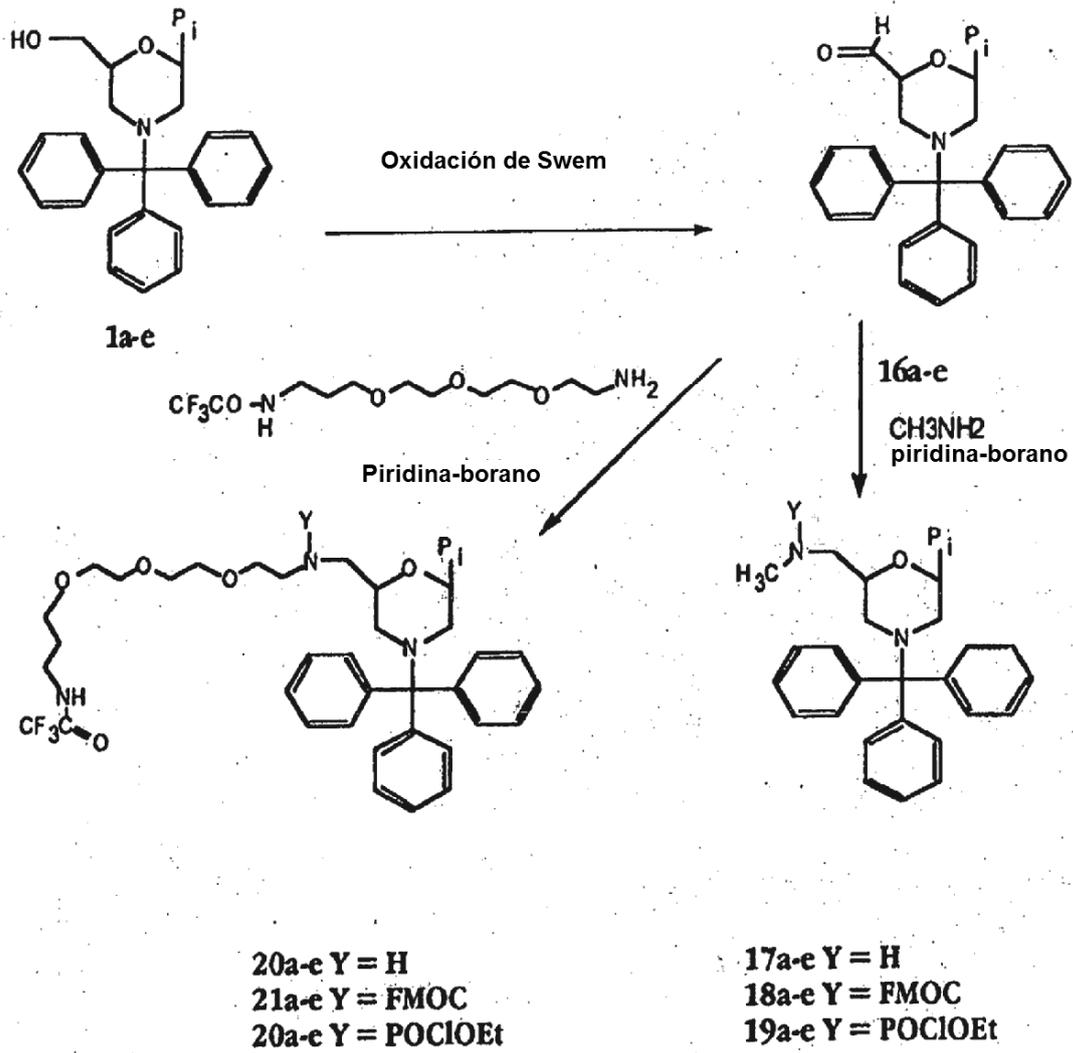


Fig. 2E

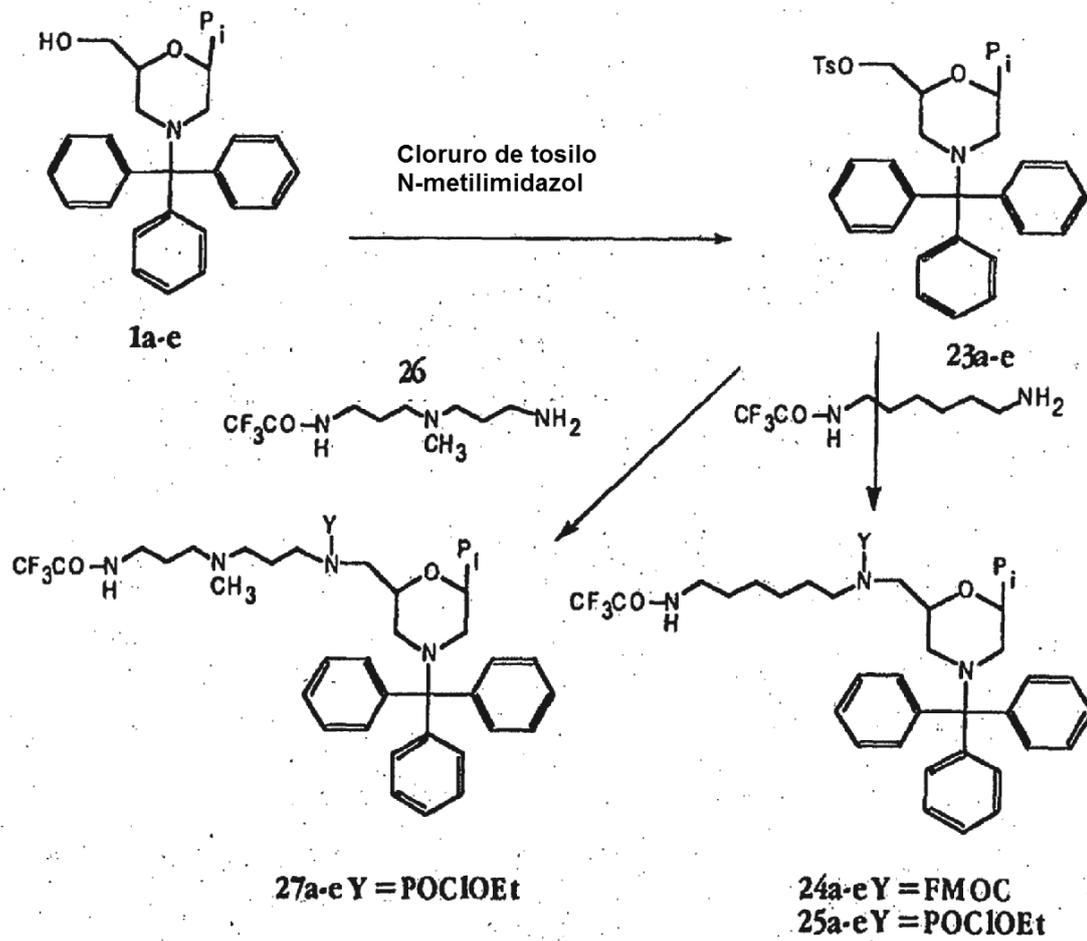


Fig. 2F

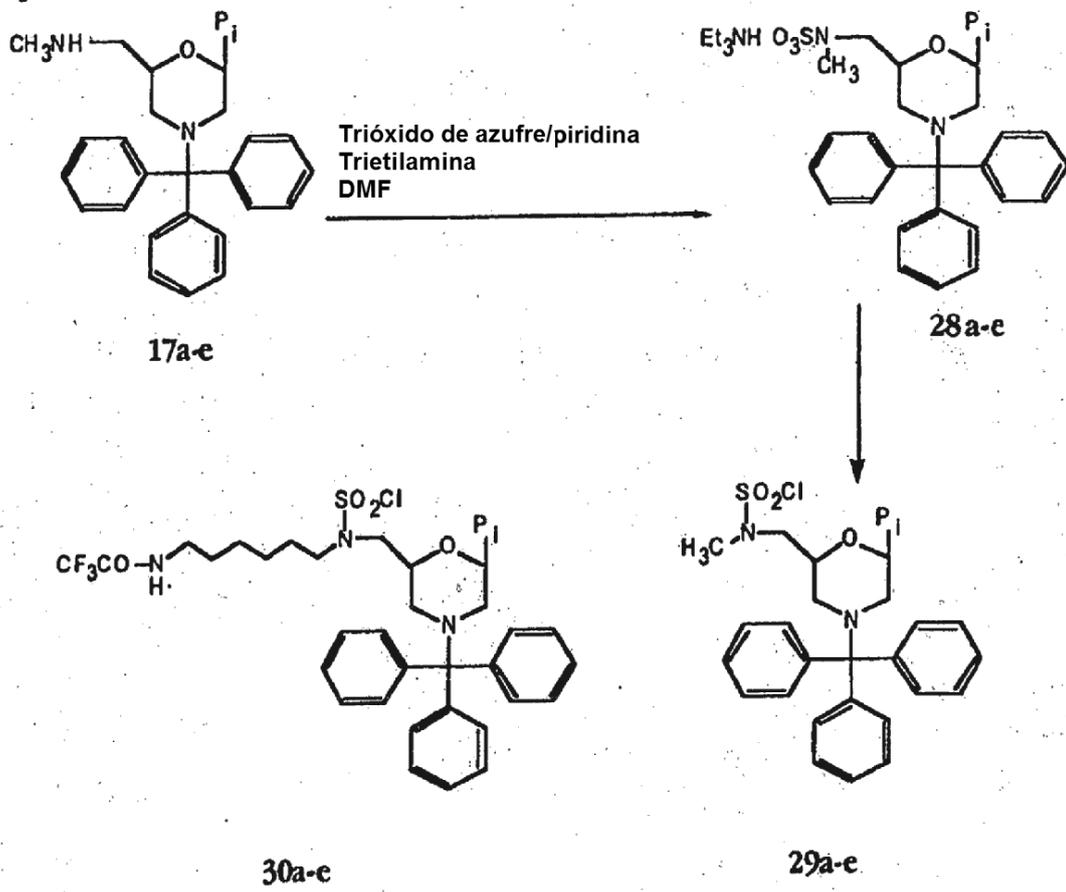


Fig. 2G

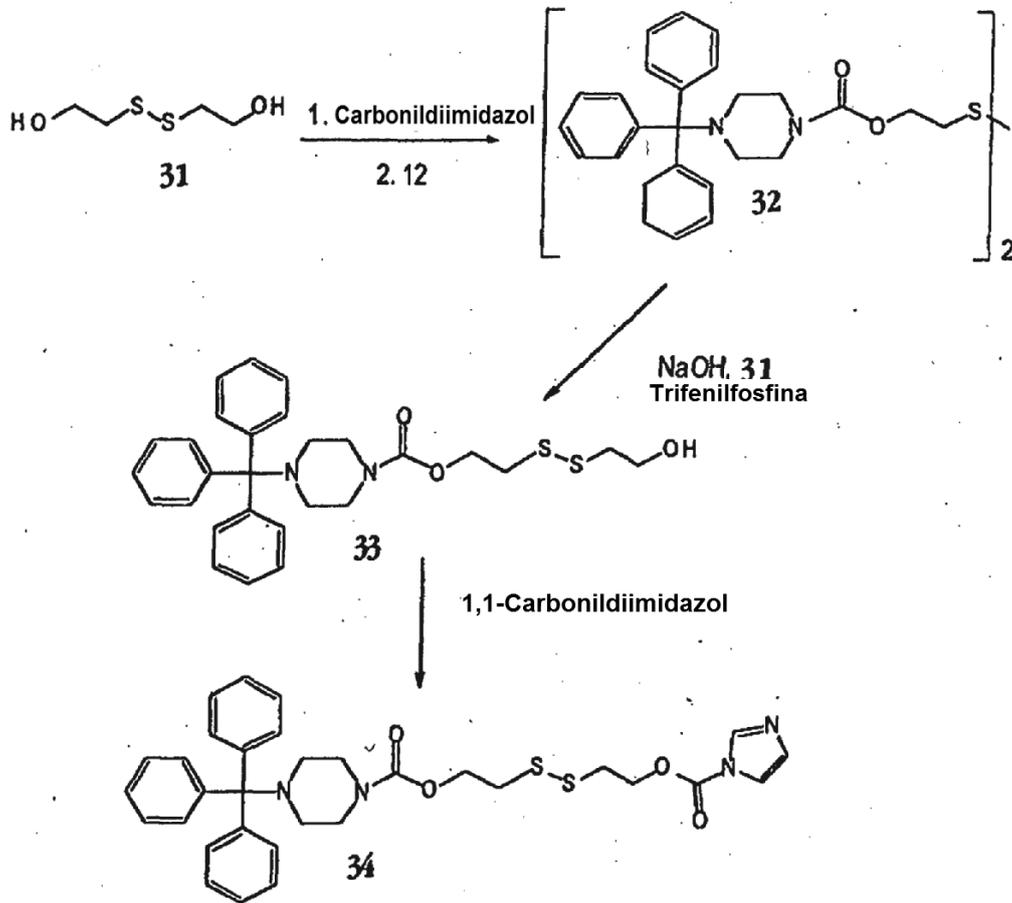


Fig. 2H

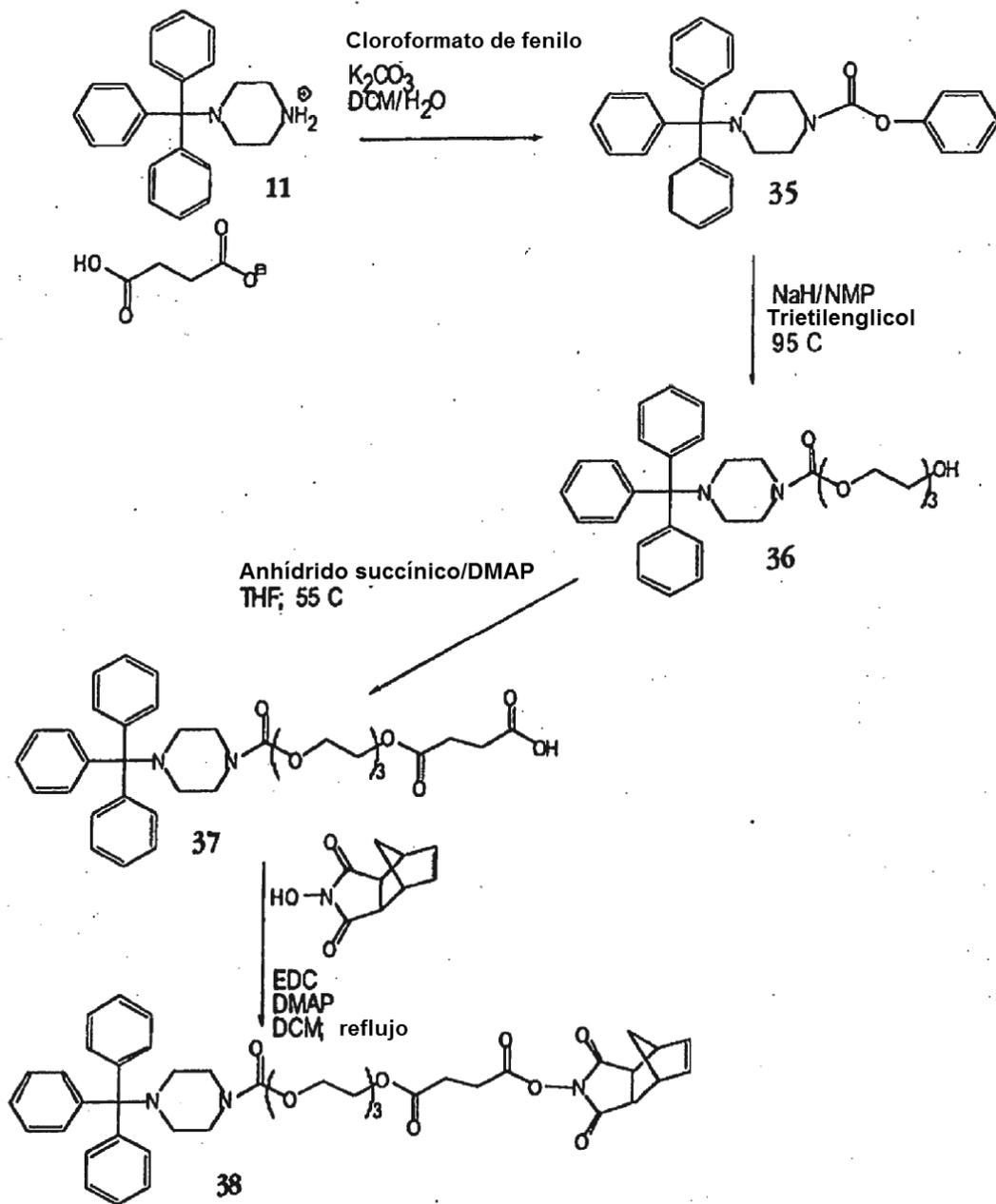


Fig. 2I

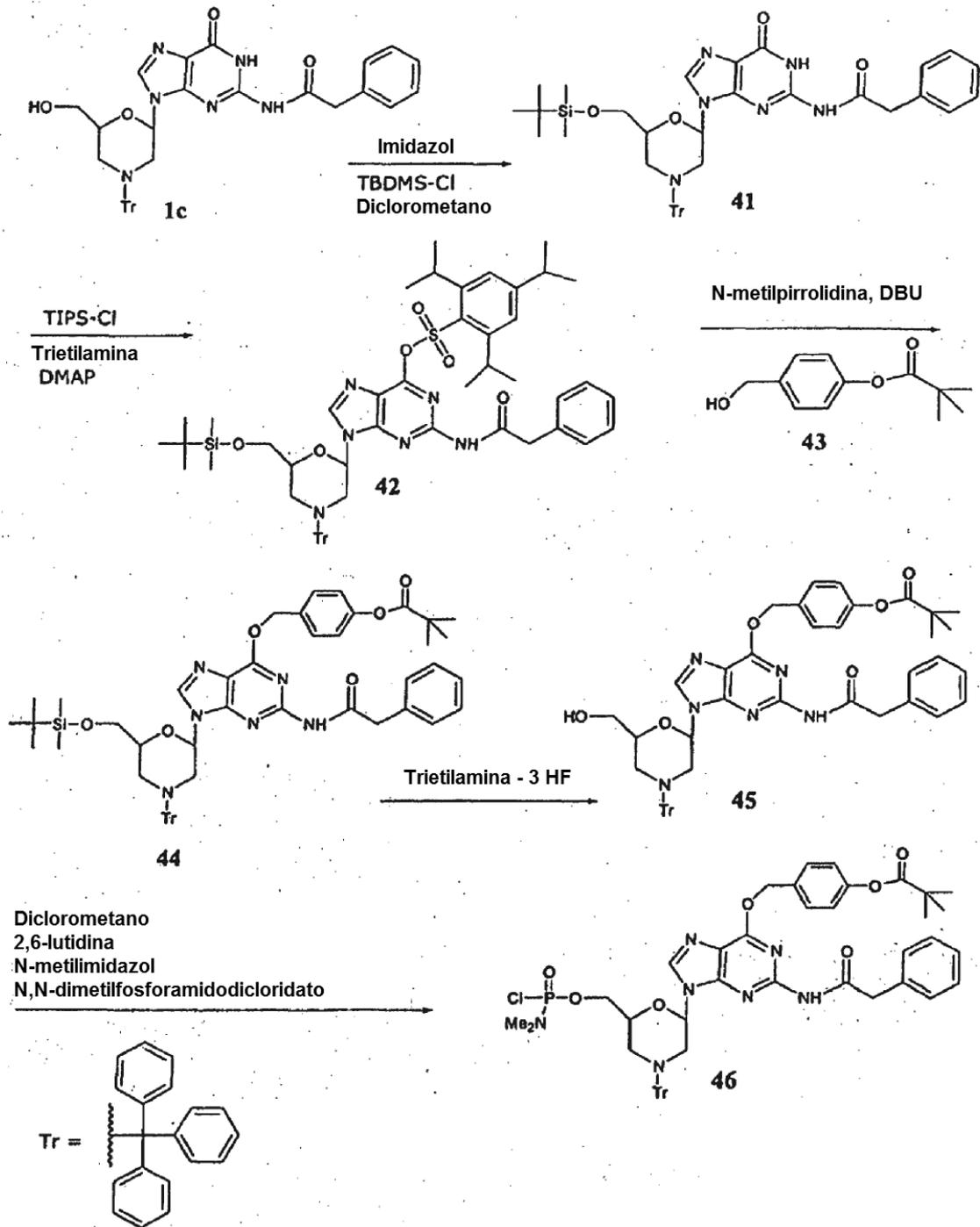


Fig. 2K

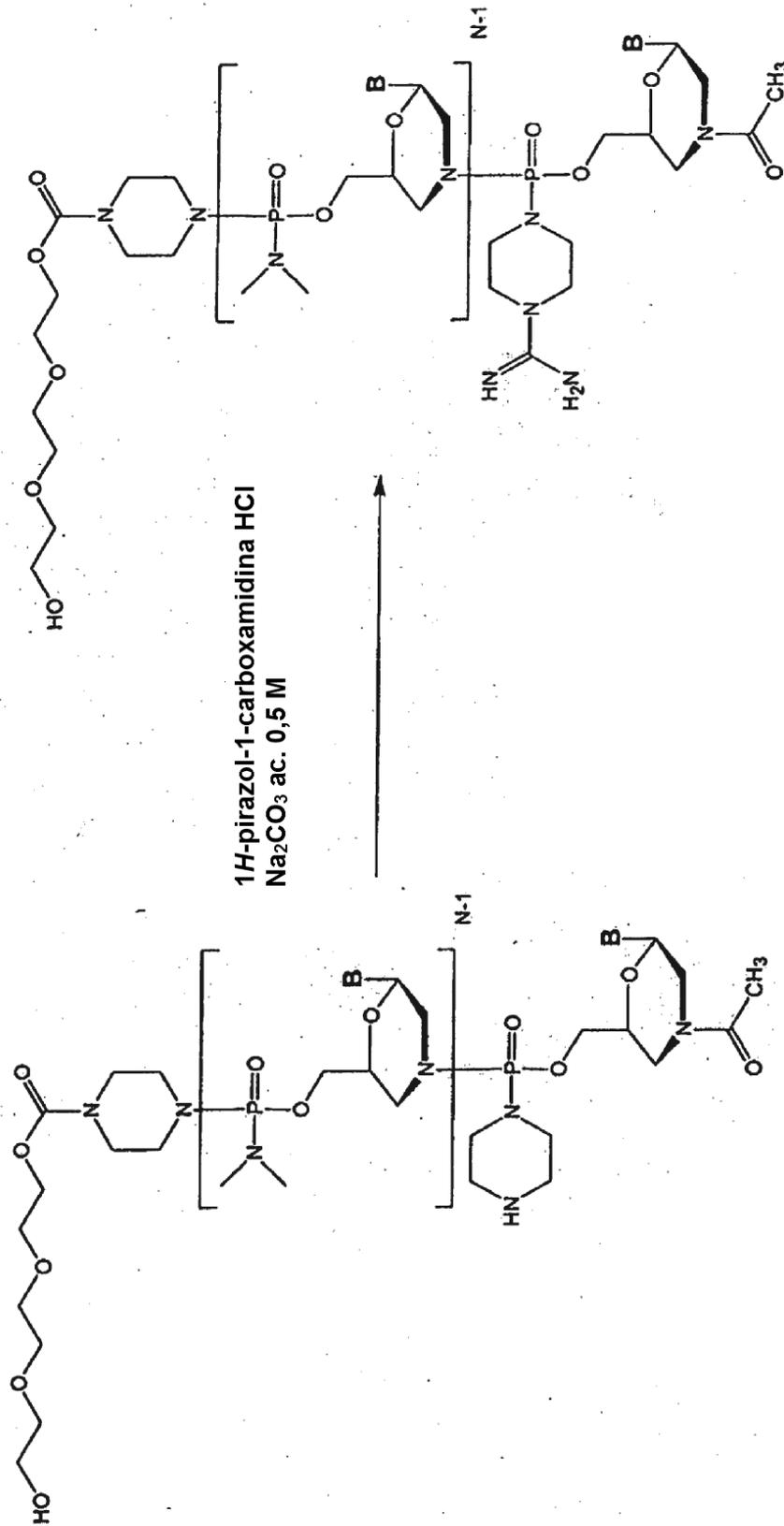


Fig. 2I

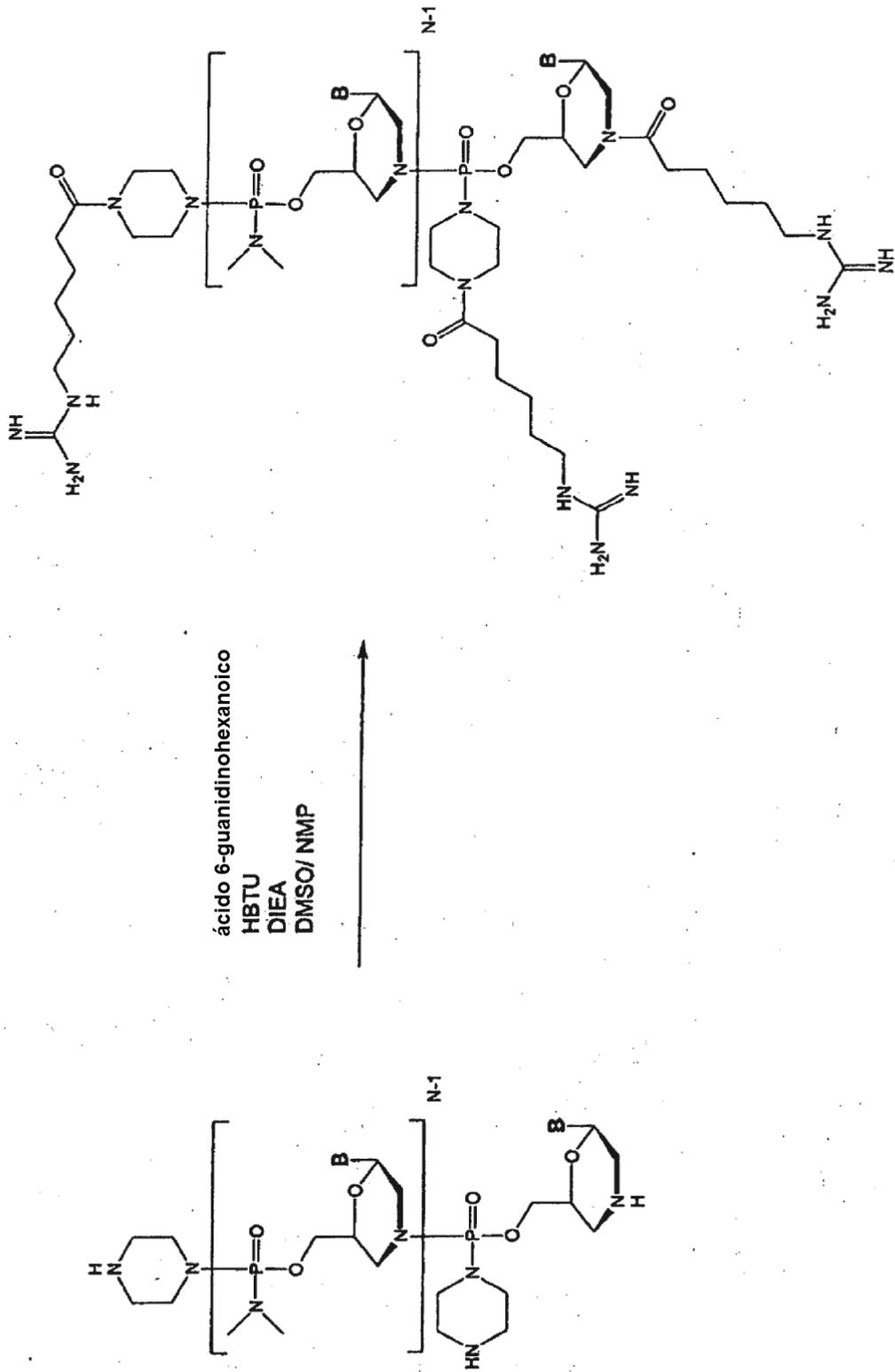


Fig. 2N

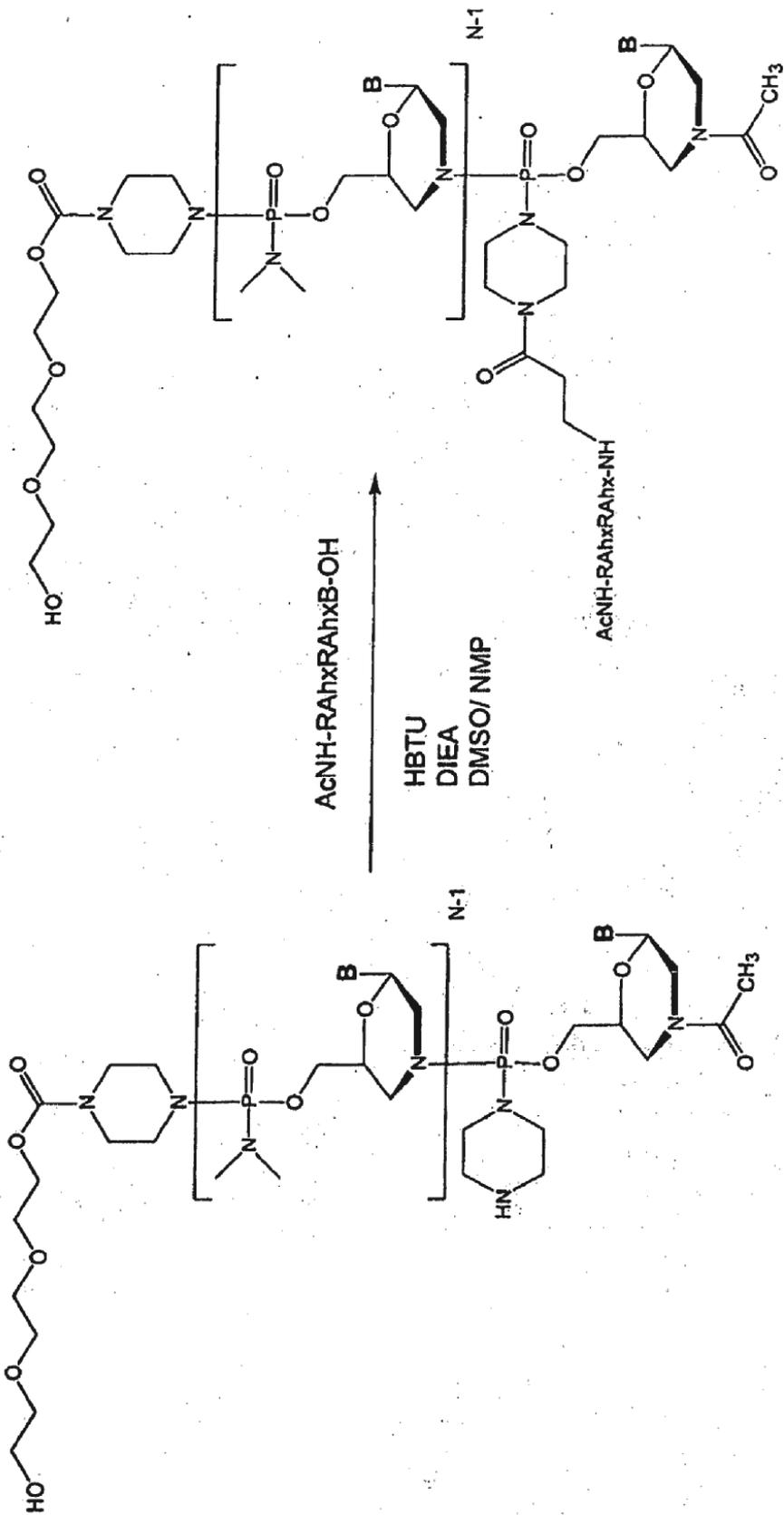


Fig. 20

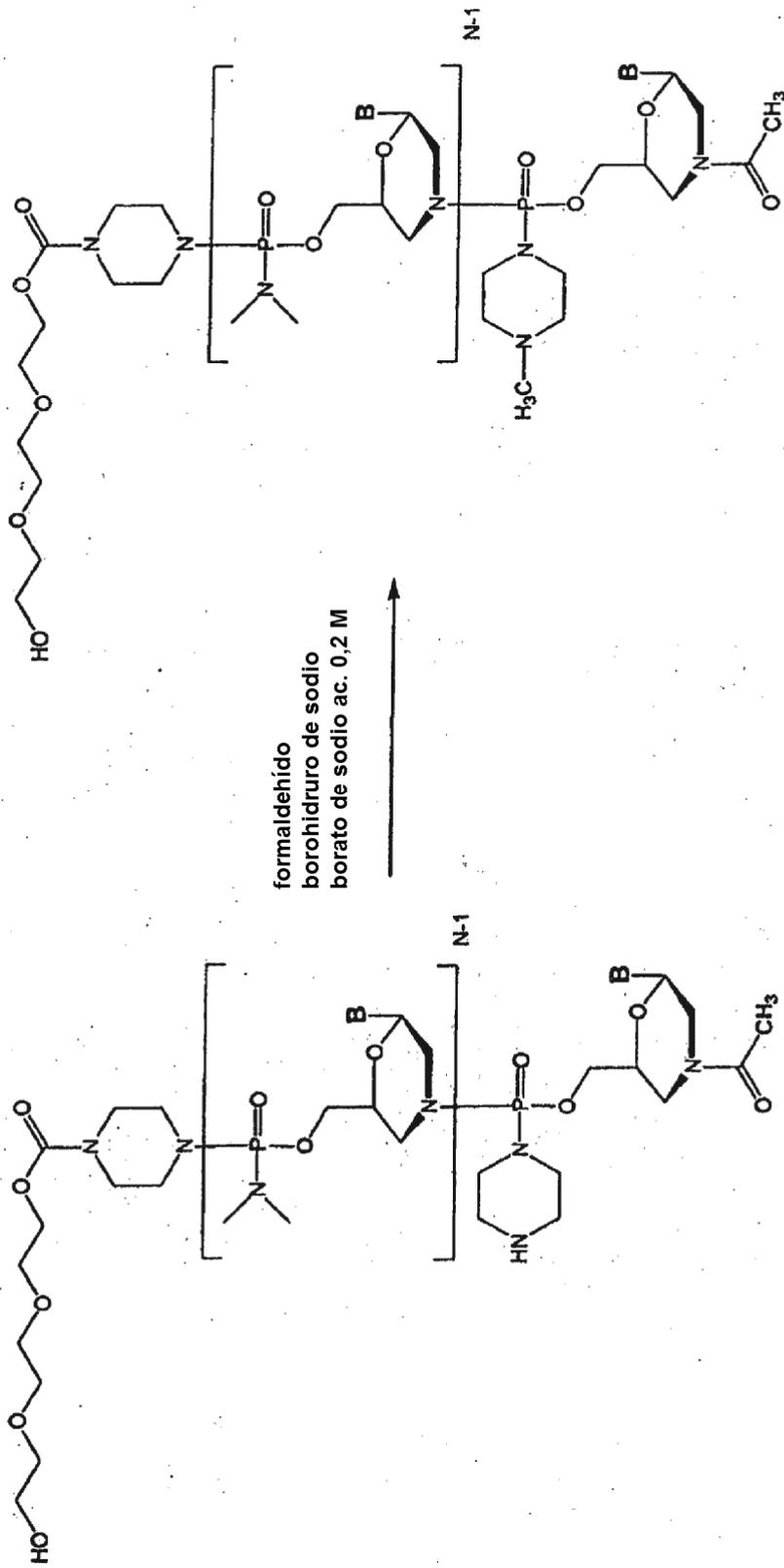


Fig. 2R

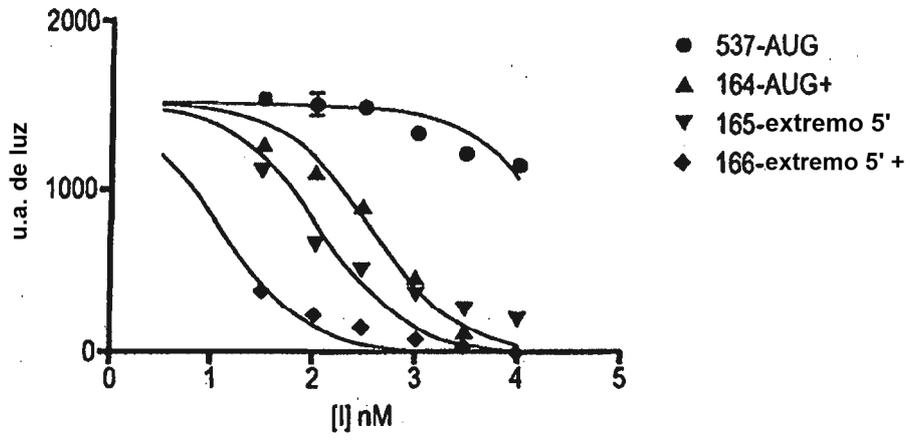


Fig. 3

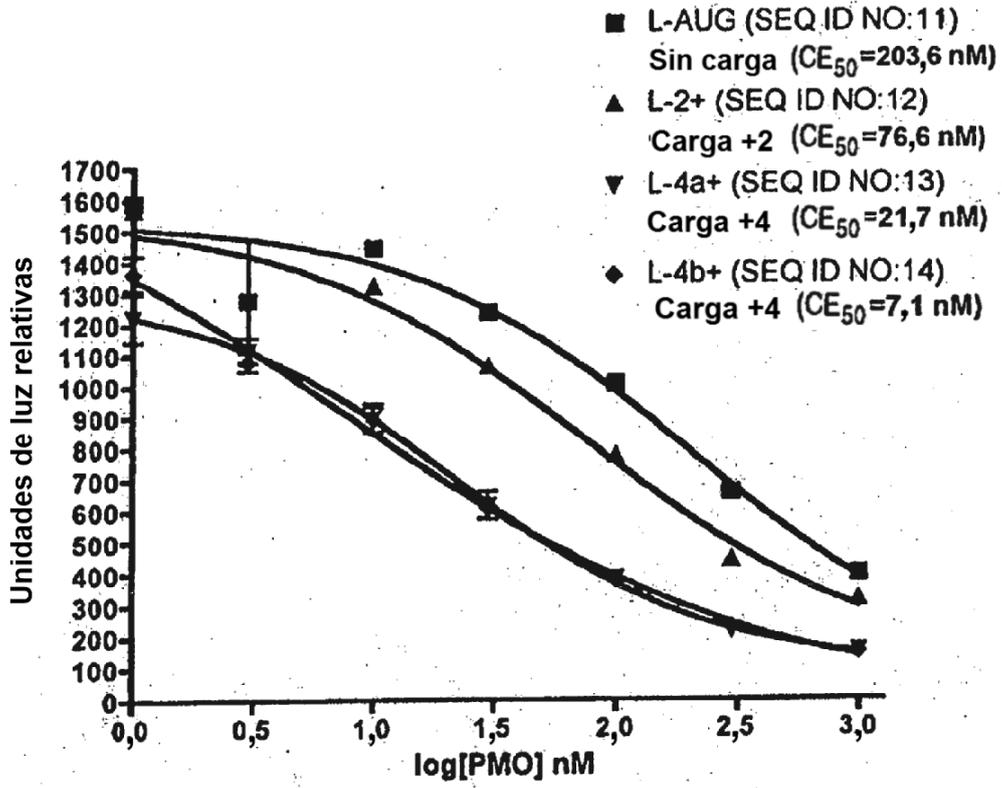


Fig. 4

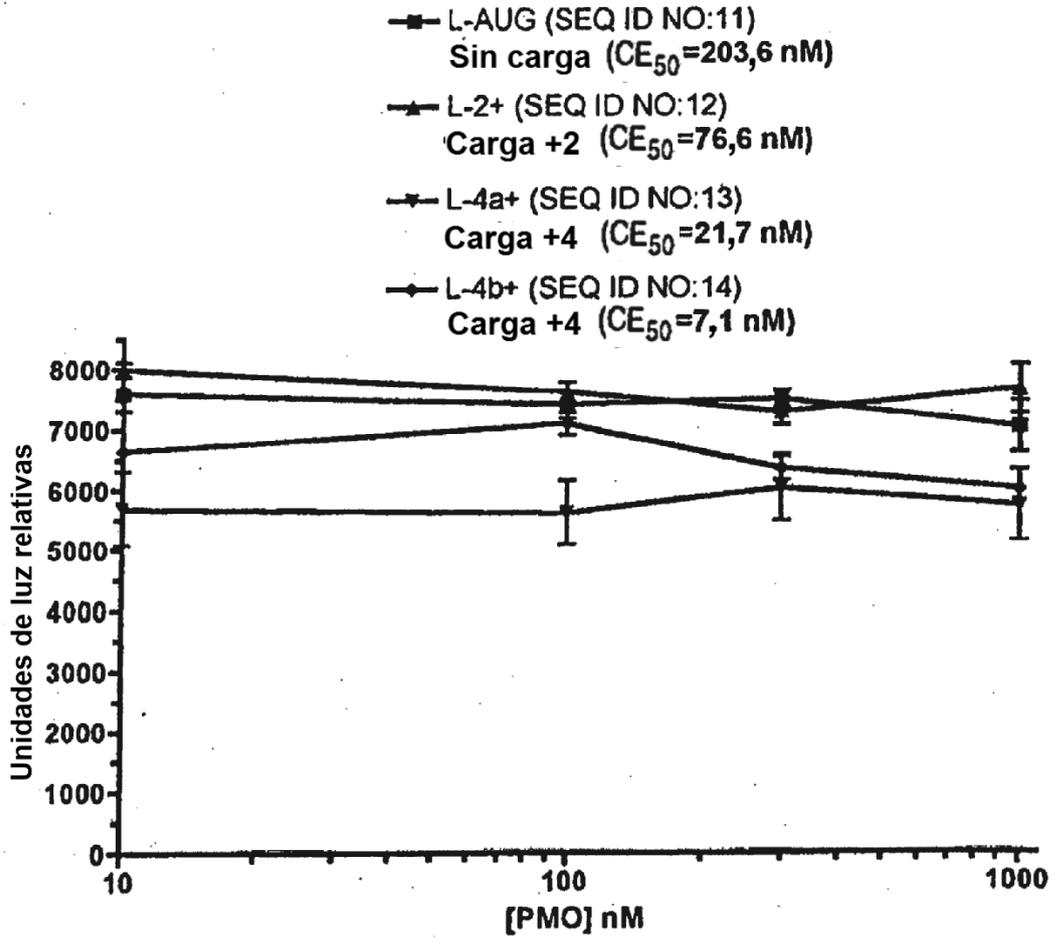


Fig. 5

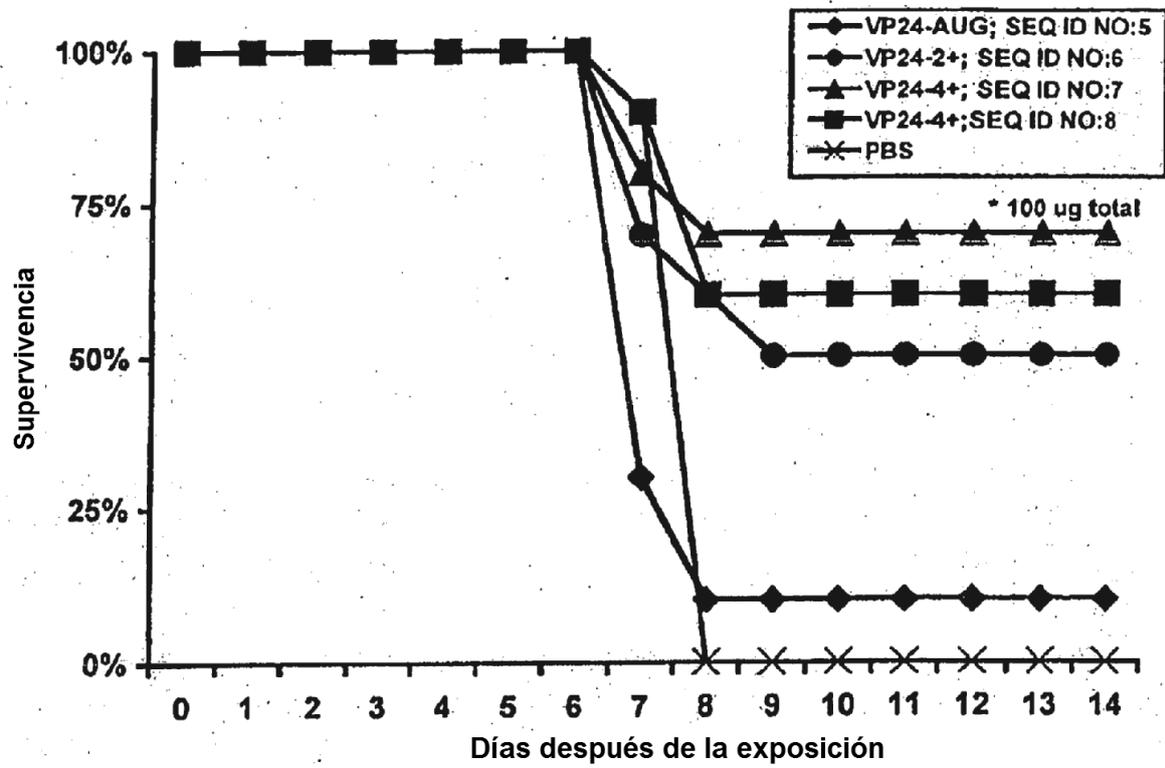


Fig. 6

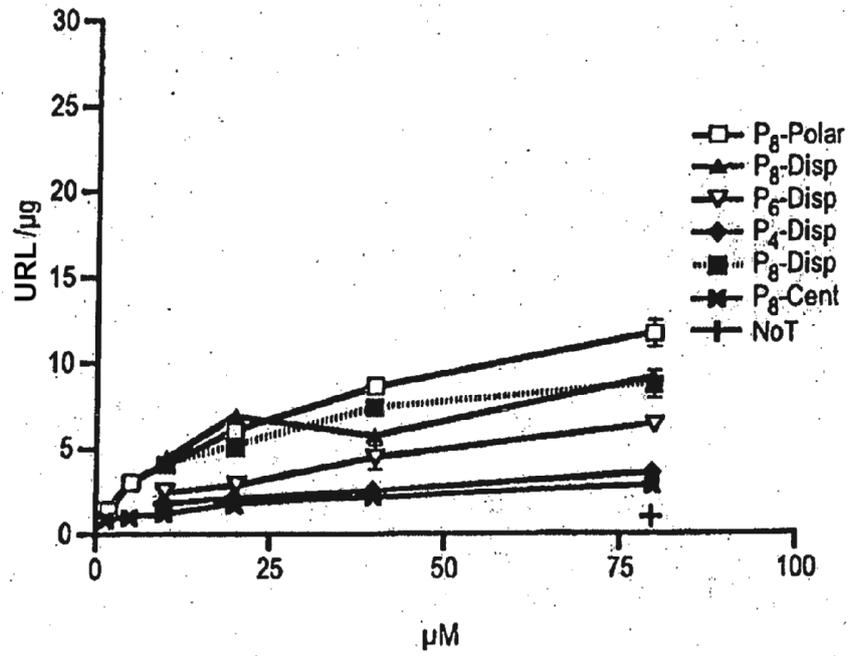


Fig. 7

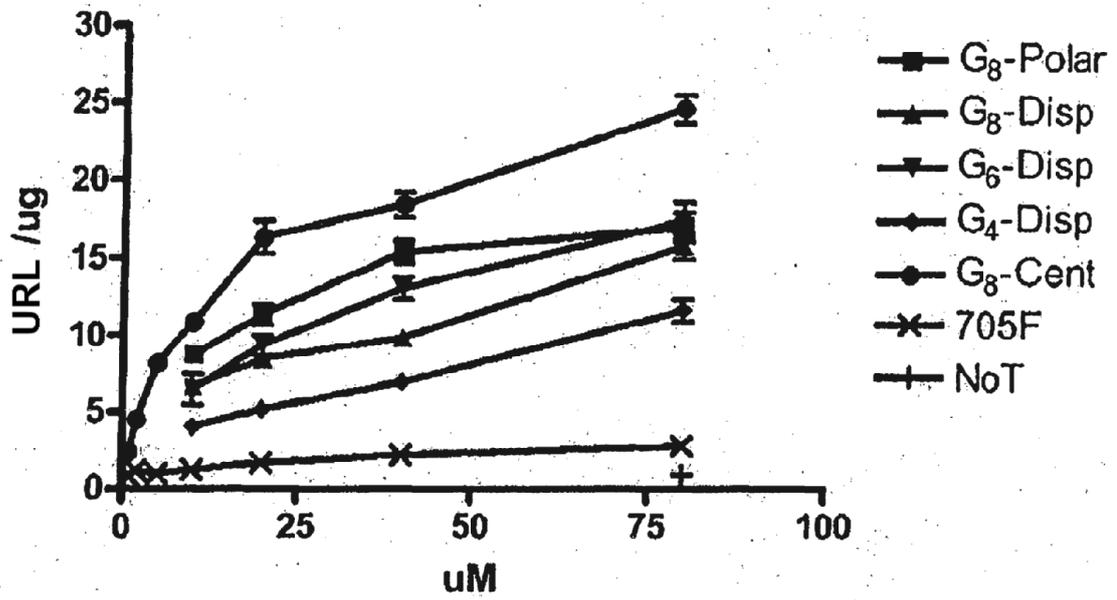


Fig. 8

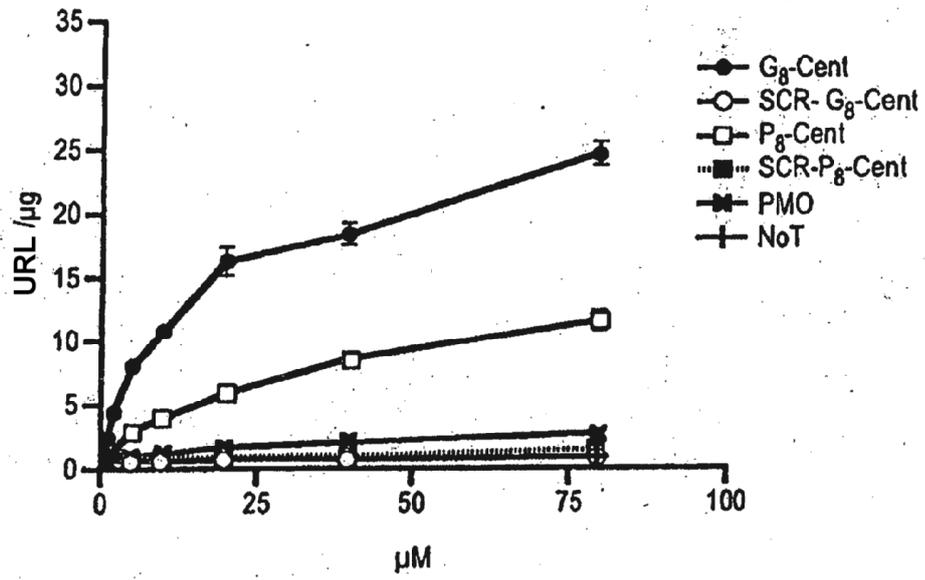


Fig. 9

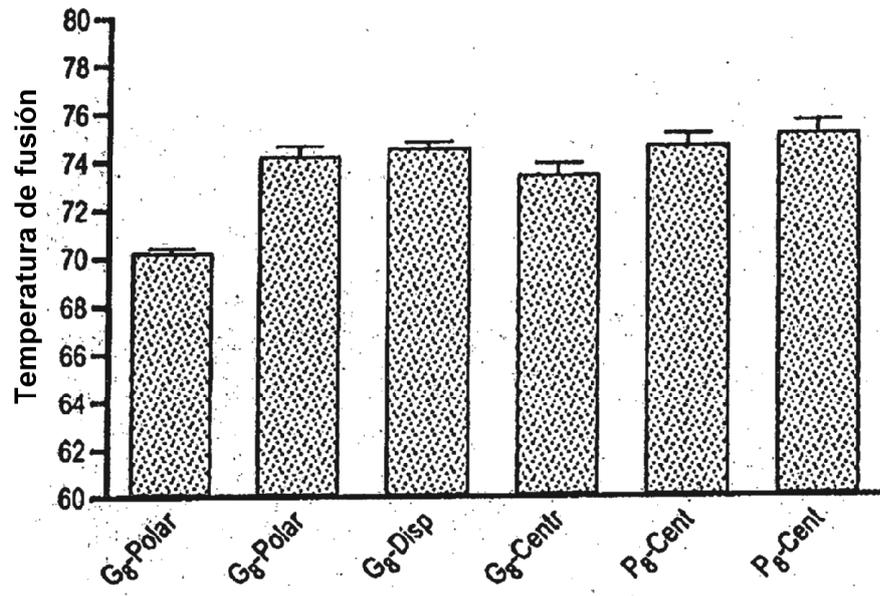


Fig. 10

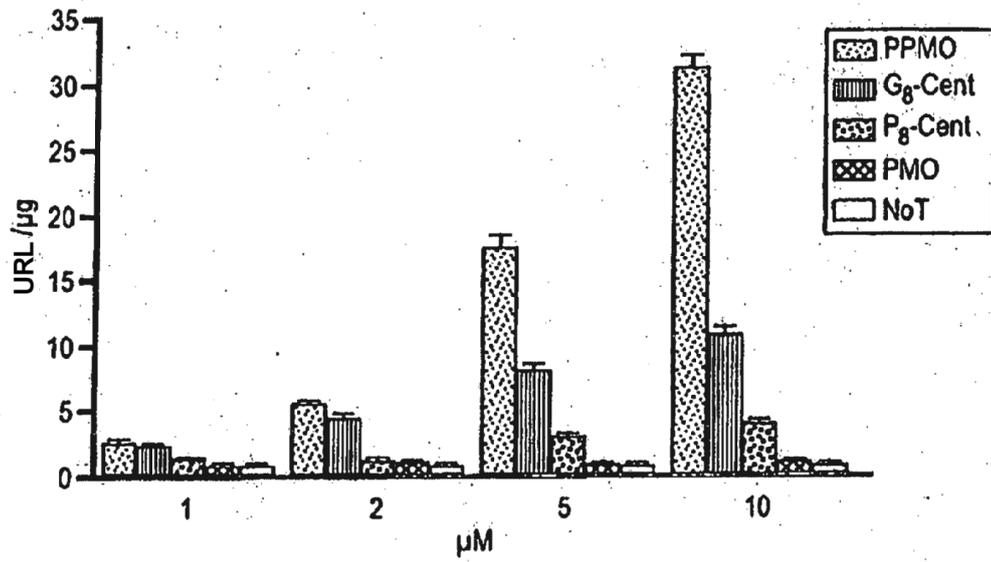


Fig. 11A

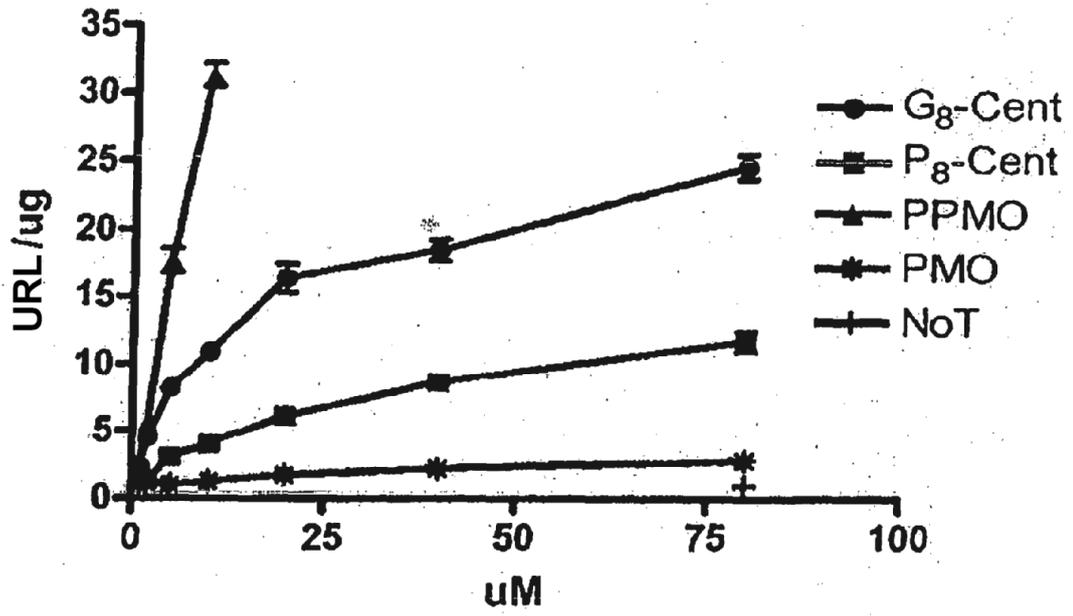


Fig. 11B

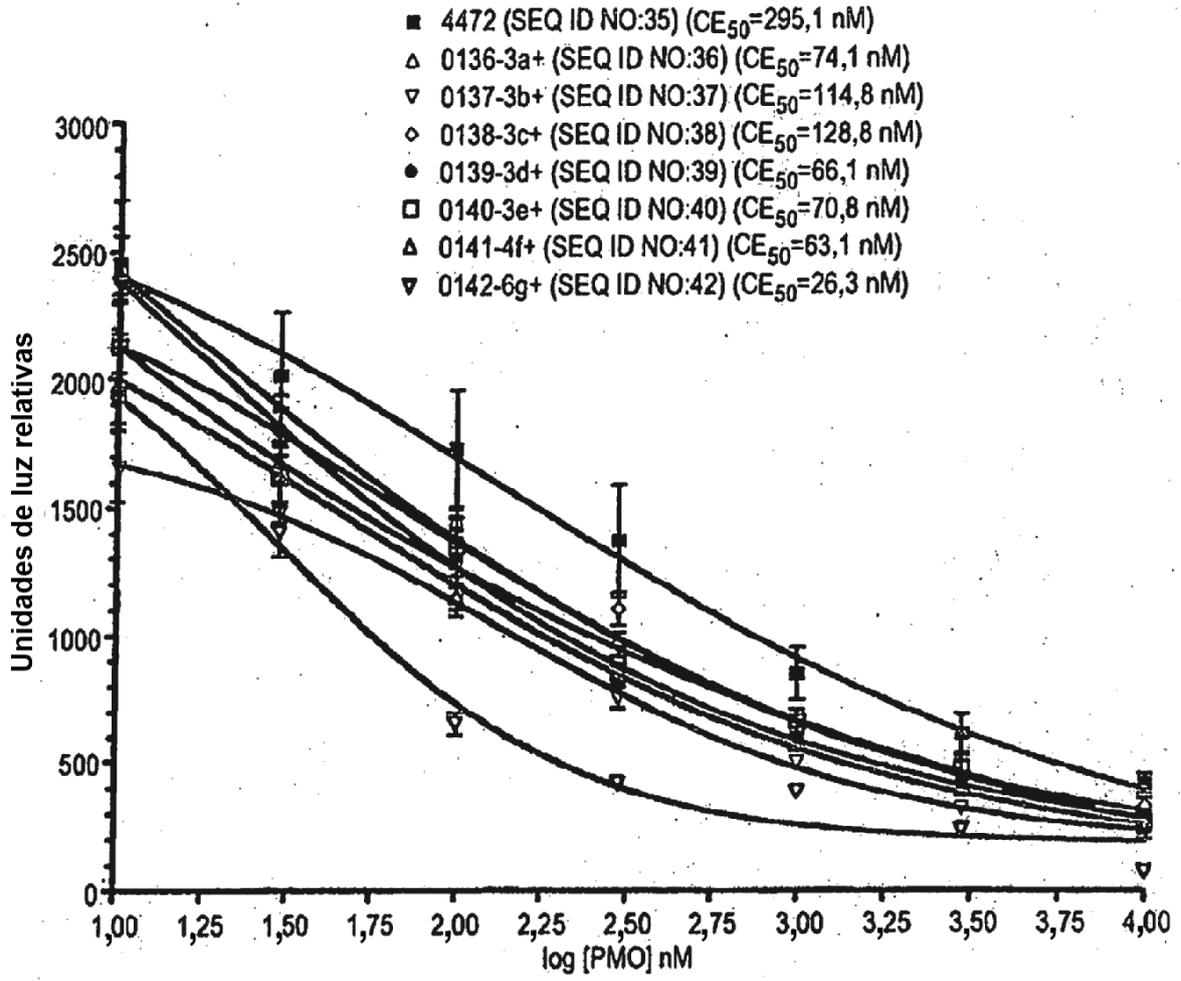


Fig. 12