

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 285**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2011 E 13167536 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2628801**

54 Título: **Molécula de ácido nucleico monocatenario que tiene esqueleto alicíclico que contiene nitrógeno**

30 Prioridad:

03.08.2010 JP 2010174915
13.10.2010 JP 2010230806
02.12.2010 JP 2010269823
08.07.2011 JP 2011152381

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.02.2015

73 Titular/es:

BONAC CORPORATION (100.0%)
Fukuoka BIO Factory 4F 1488-4 Aikawa-machi
Kurume-shi, Fukuoka 839-0861, JP

72 Inventor/es:

OHGI, TADAAKI;
HAYASHI, HIROTAKE;
SHIROHZU, HISAO;
HAMASAKI, TOMOHIRO;
ITOH, AKIHIRO y
SUZUKI, HIROSHI

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 528 285 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

Molécula de ácido nucleico monocatenario que tiene esqueleto alicíclico que contiene nitrógeno

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico monocatenario que inhibe la expresión génica. En particular, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico monocatenario que tiene un esqueleto alicíclico que contiene nitrógeno, una composición que contiene la molécula de ácido nucleico monocatenario y el uso de la molécula de ácido nucleico monocatenario.

Técnica anterior

Como una técnica para inhibir la expresión génica se conoce, por ejemplo, la interferencia por ARN (iARN) (Fire y col., Nature, Feb. 19, 1998; 391 (6669): pág 806-811). La inhibición de la expresión génica por interferencia por ARN generalmente se lleva a cabo administrando una molécula de ARN bicatenario corto a, por ejemplo, una célula o similares. La molécula de ARN bicatenario generalmente se llama ARNip (ARN interferente pequeño). Se ha informado que no solo el ARNip, sino que también una molécula de ARN circular que se ha convertido en parcialmente bicatenaria por hibridación intermolecular, también pueden inhibir la expresión génica (publicación de patente de EE.UU. N° 2004-058886). Sin embargo, las moléculas de ARN usadas en estas técnicas para inducir la inhibición de la expresión génica tienen los siguientes problemas.

Primero, con el fin de producir el ARNip, es necesario sintetizar una hebra codificante y una hebra no codificante por separado e hibridar estas hebras al final del procedimiento. Así, hay un problema de baja eficiencia de fabricación. Además, cuando el ARNip se administra a una célula, es necesario administrar el ARNip a la célula mientras que se inhibe la disociación a ARN monocatenario, que requiere una tarea laboriosa de fijar las condiciones para manipular el ARNip. Por otra parte, la molécula de ARN circular tiene un problema en que su síntesis es difícil.

Estas moléculas de ARN están básicamente compuestas por residuos de nucleótidos. Por ahora, con el fin de conferir alguna función a las moléculas de ARN o marcar las moléculas de ARN, no hay otra forma sino que modificar cualquiera de los componentes, es decir, una base, un residuo de azúcar o un grupo fosfato, del (de los) residuo(s) de nucleótido(s). Por tanto, en el desarrollo de productos farmacéuticos y similares que utilizan interferencia por ARN es muy difícil alterar las moléculas de ARN de manera que se confiera otra función a las mismas o marcarlas mientras que se mantiene su función para inhibir la expresión génica.

El documento WO 2004/090108 se refiere a un agente de iARN que comprende una secuencia codificante y una secuencia no codificante, donde el agente comprende una modificación estabilizante tal como un grupo catiónico y la secuencia no codificante elige como diana un ARN expresado en el riñón. El documento WO 2006/088490 se refiere a un ribonucleósido sustituido con un grupo fosfonamídito en la posición 3'. En ciertas realizaciones, el fosfonamídito es un fosfonamídito de alquilo. El documento WO 2006/088490 también se refiere a un oligonucleótido bicatenario que comprende al menos un enlace de no fosfato. Enlaces de no fosfato representativos incluyen enlaces fosfonato, hidroxilamina, hidroxilhidrazinilo, amida y carbamato. En ciertas realizaciones, el enlace de no fosfato es un enlace fosfonato.

El documento EP 2233573 A1 (WO 2009/074076) se refiere a una molécula compleja que interfiere con la expresión de genes diana y que contiene dos hebras de ARNip X_1 y X_2 que tienen al menos el 80 % de complementariedad. El extremo 5' de X_1 y el extremo 3' de X_2 están ligados mediante la molécula no de ácido nucleico L1. El extremo 5' de X_2 y el extremo 3' de X_1 están ligados mediante la molécula no de ácido nucleico L2. Como ambos extremos 5' y 3' de las dos hebras de ARNip X_1 y X_2 de la molécula compleja están ligados mediante moléculas de no ácido nucleico, no es fácil para las hebras de ARNip desenrollarse y degradarse.

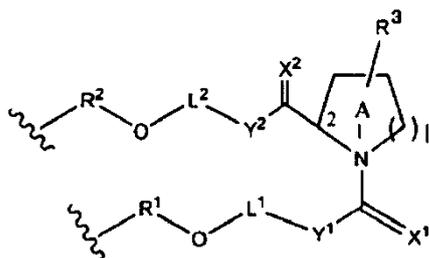
Breve resumen de la invención

Teniendo en cuenta lo anterior, es un objetivo de la presente invención proporcionar una molécula de ácido nucleico novedosa que pueda producirse fácilmente y eficazmente y pueda inhibir la expresión génica.

Con el fin de lograr el objetivo anterior, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico monocatenario que comprende una secuencia inhibidora de la expresión que inhibe la expresión de un gen diana donde:

- la molécula comprende: una región (X_c); una región de ligador (L_x), una región interna (Z) que comprende la secuencia inhibidora de la expresión y que está compuesta de una región (X) y una región (Y), una región de ligador (L_y) y una región (Y_c) en este orden;
- la región (X_c) es complementaria a la región (X);
- la región (Y_c) es complementaria a la región (Y); y
- la región de ligador (L_x)

se representa por la siguiente fórmula (I):



• • • (I)

5 en la que:

X^1 y X^2 son cada uno independientemente H_2 , O, S o NH;

Y^1 y Y^2 son cada uno independientemente un enlace sencillo, CH_2 , NH, O o S;

R^3 es un átomo de hidrógeno o sustituyente que está unido a C-3, C-4, C-5 o C-6 sobre un anillo A;

10 L^1 es una cadena de alquileo compuesta por n átomos, y un átomo de hidrógeno sobre un átomo de carbono del alquileo puede o puede no estar sustituido con OH, OR^a , NHR^a , NR^aR^b , SH o SR^a , o

L^1 es una cadena de poliéter obtenida sustituyendo al menos un átomo de carbono sobre la cadena de alquileo con un átomo de oxígeno,

15 a condición de que: cuando Y^1 sea NH, O o S, un átomo unido a Y^1 en L^1 sea carbono, un átomo unido a OR^1 en L^1 sea carbono y los átomos de oxígeno no sean adyacentes entre sí;

L^2 es una cadena de alquileo compuesta por m átomos, y un átomo de hidrógeno sobre un átomo de carbono del alquileo puede o puede no estar sustituido con OH, OR^c , NHR^c , NR^cR^d , SH o SR^c , o

20 L^2 es una cadena de poliéter obtenida sustituyendo al menos un átomo de carbono sobre la cadena de alquileo con un átomo de oxígeno,

a condición de que: cuando Y^2 sea NH, O o S, un átomo unido a Y^2 en L^2 sea carbono, un átomo unido a OR^2 en L^2 sea carbono y los átomos de oxígeno no sean adyacentes entre sí;

R^a , R^b , R^c y R^d son cada uno independientemente un sustituyente o un grupo protector;

l es 1 o 2;

m es un número entero en el intervalo de 0 a 30;

25 n es un número entero en el intervalo de 0 a 30;

las regiones (Xc) y (X) están cada una ligadas a la región de ligador (L_x) mediante $-OR^1-$ o $-OR^2-$; y

R^1 y R^2 pueden o pueden no estar presentes, y cuando están presentes, R^1 y R^2 son cada uno independientemente un residuo de nucleótido o la estructura de fórmula (I).

30 La presente invención también proporciona una composición para inhibir la expresión de un gen diana. La composición contiene la molécula de ácido nucleico monocatenario según la presente invención.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que contiene la molécula de ácido nucleico monocatenario según la presente invención.

35 La presente invención también proporciona un procedimiento *in vitro* para inhibir la expresión de un gen diana, comprendiendo el procedimiento usar la molécula de ácido nucleico monocatenario según la presente invención, donde opcionalmente

40 - el procedimiento comprende administrar la molécula de ácido nucleico monocatenario a una célula, tejido o un órgano *in vitro*; o

- la molécula de ácido nucleico es una molécula de ARN y la expresión del gen diana se inhibe induciendo interferencia por ARN.

45 La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico para su uso en un procedimiento para tratar una enfermedad, donde la molécula de ARN es la molécula de ácido nucleico monocatenario según la presente invención; y la molécula de ácido nucleico monocatenario comprende, como secuencia inhibidora de la expresión, una secuencia que inhibe la expresión de un gen que causa la enfermedad.

50 Usando la molécula de ácido nucleico monocatenario de la presente invención es posible inhibir la expresión de un gen. Además, como la molécula de ácido nucleico monocatenario no es circular, puede sintetizarse fácilmente. Por tanto, como es de una sola hebra, no es necesaria una etapa de hibridación requerida en la producción de una hebra doble, de manera que puede producirse eficazmente. Además, como la región de ligador incluye el (los) residuo(s) de no nucleótido, no solo son posibles, por ejemplo, alteraciones convencionales a residuos de nucleótidos, sino

55 también, por ejemplo, alteraciones tales como modificación en la región de ligador.

Son los inventores de la presente invención los que primero descubrieron que la expresión génica puede inhibirse según la estructura de la molécula de ácido nucleico monocatenario de la presente invención. Se supone que el efecto inhibitorio de genes de la molécula de ácido nucleico monocatenario de la presente invención se produce por un fenómeno similar a interferencia por ARN. Debe observarse, sin embargo, que la inhibición de la expresión génica en la presente invención no está limitada o restringida por interferencia por ARN.

Breve descripción de los dibujos

[FIG. 1] La FIG. 1 muestra vistas esquemáticas que ilustran un ejemplo de una molécula de ácido nucleico monocatenario (no de la presente invención).

[FIG. 2] La FIG. 2 muestra vistas esquemáticas que ilustran un ejemplo de la molécula de ácido nucleico monocatenario de la presente invención.

[FIG. 3] La FIG. 3 muestra vistas esquemáticas que ilustran otros ejemplos de la molécula de ácido nucleico monocatenario de la presente invención.

[FIG. 4] La FIG. 4 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH en un ejemplo (no de la invención).

[FIG. 5] La FIG. 5 es un electroforetograma que muestran la estabilidad en otro ejemplo (no de la invención).

[FIG. 6] La FIG. 6 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH en todavía otro ejemplo de la presente invención.

[FIG. 7] La FIG. 7 muestra los resultados de electroforesis, que indican la reactividad de una proteína Dicer con ARNmc en otro ejemplo adicional de la presente invención.

[FIG. 8] La FIG. 8 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH en células A549 en otro ejemplo adicional de la presente invención

[FIG. 9] La FIG. 9 es una gráfica que muestra un nivel de expresión relativa del gen GAPDH en células 293 en el ejemplo de la presente invención.

[FIG. 10] La FIG. 10 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH en células HCT116 en otro ejemplo adicional de la presente invención

[FIG. 11] La FIG. 11 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH en células HCT116 en otro ejemplo adicional de la presente invención.

[FIG. 12] La FIG. 12 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen TGF- β 1 en otro ejemplo adicional de la presente invención.

[FIG. 13] La FIG. 13 es una gráfica que muestra el nivel de expresión de TGF- β 1 por unidad de peso de pulmón en cada grupo de administración en otro ejemplo adicional de la presente invención.

[FIG. 14] La FIG. 14A es una gráfica que muestra la cantidad de TNF- α en una muestra de BALF en cada grupo de administración en el ejemplo de la presente invención. La FIG. 14B es una gráfica que muestra la cantidad de IFN- β en una muestra de BALF en cada grupo de administración en el ejemplo de la presente invención.

[FIG. 15] La FIG. 15 es un electroforetograma que muestra resistencia a ribonucleasa en otro ejemplo adicional de la presente invención.

[FIG. 16] La FIG. 16 es un electroforetograma que muestra resistencia a nucleasa S7 en otro ejemplo adicional de la presente invención.

[FIG. 17] La FIG. 17 muestra ARNmc usado en un ejemplo de referencia.

[FIG. 18] La FIG. 18 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH en el ejemplo de referencia.

[FIG. 19] La FIG. 19 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen TGF- β 1 en otro ejemplo de referencia.

[FIG. 20] La FIG. 20 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen LAMA1 en otro ejemplo adicional de referencia.

[FIG. 21] La FIG. 21 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen LMNA en otro ejemplo adicional de referencia.

[FIG. 22] La FIG. 22 muestra ARNmc usado en otro ejemplo adicional de referencia.

[FIG. 23] La FIG. 23 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH en el ejemplo de referencia.

Modo para llevar a cabo la invención

Términos usados en la presente memoria descriptiva tienen cada uno un significado generalmente usado en la materia, a menos que se establezca de otro modo.

1. Molécula de PNmc

La molécula de ácido nucleico monocatenario de la presente invención es, como se ha descrito anteriormente, una molécula de ácido nucleico monocatenario que incluye: una secuencia inhibitoria de la expresión que inhibe la expresión de un gen diana. La molécula de ácido nucleico monocatenario incluye: una región (Xc); una región de ligador (Lx); una región interna (Z) que está compuesta de una región (X) y una región (Y); una región de ligador

(Ly); y una región (Yc) en este orden. La región interna (Z) incluye la secuencia inhibidora de la expresión.

En la presente invención, "inhibición de la expresión de un gen diana" significa, por ejemplo, alterar la expresión del gen diana. El mecanismo por el que la inhibición se logra no está particularmente limitado, y puede, por ejemplo, regularse por disminución o silenciarse. La inhibición de la expresión del gen diana puede verificarse por: una disminución en la cantidad de un producto de la transcripción derivado del gen diana; una disminución en la actividad del producto de la transcripción; una disminución en la cantidad de un producto de la traducción generado a partir del gen diana; una disminución en la actividad, por ejemplo, del producto de la traducción; o similares. Las proteínas pueden ser proteínas maduras, proteínas precursoras antes de someterse, por ejemplo, a procesamiento o modificación postraduccional, o similares.

La molécula de ácido nucleico monocatenario de la presente invención también puede denominarse en lo sucesivo la "molécula de PNmc" de la presente invención. La molécula de PNmc de la presente invención puede usarse, por ejemplo, para inhibir la expresión de un gen diana *in vivo* o *in vitro*, de manera que también puede denominarse una "molécula de PNmc para inhibir la expresión de un gen diana" o "inhibidor de la expresión de un gen diana". Además, la molécula de PNmc de la presente invención pueden inhibir la expresión de un gen diana, por ejemplo, por interferencia por ARN, de manera que también puede denominarse una "molécula de PNmc para interferencia por ARN", "molécula de PNmc para inducir interferencia por ARN" o "el agente de interferencia por ARN o el agente inductor de interferencia por ARN". Además, según la presente invención, es posible inhibir un efecto secundario tal como, por ejemplo, inducción de interferón.

En la molécula de PNmc de la presente invención, el extremo 5' y el extremo 3' están ligados entre sí. Así, la molécula de PNmc de la presente invención también puede denominarse una "molécula de ácido nucleico monocatenario lineal".

En la molécula de PNmc de la presente invención, la secuencia inhibidora de la expresión es una secuencia que presenta una actividad para inhibir la expresión de un gen diana cuando la molécula de PNmc de la presente invención se introduce, por ejemplo, en una célula *in vivo* o *in vitro*. La secuencia inhibidora de la expresión no está particularmente limitada, y puede fijarse según convenga dependiendo del tipo de gen diana cuya expresión vaya a inhibirse. Como secuencia inhibidora de la expresión puede usarse, por ejemplo, una secuencia que participa en la interferencia por ARN producida por ARNip, según convenga. Generalmente, la interferencia por ARN es un fenómeno en el que un ARN bicatenario largo (ARNbc) se escinde en una célula por Dicer para producir un ARN bicatenario (ARNip: ARN interferente pequeño) compuesto por aproximadamente 19 a 21 pares de bases y que tiene un extremo 3' que sobresale, y uno de los ARN monocatenarios que componen el ARNip se une a un ARNm diana para degradar el ARNm, por lo que se inhibe la traducción del ARNm. Como secuencia del ARN monocatenario del ARNip que se une al ARNm diana se ha informado, por ejemplo, de diversos tipos de secuencias para diversos tipos de genes diana. En la presente invención, por ejemplo, la secuencia del ARN monocatenario del ARNip puede usarse como secuencia inhibidora de la expresión.

Debe observarse que el objetivo de la presente invención no es la información de secuencia de la secuencia inhibidora de la expresión para el gen diana. En realidad, la presente invención se refiere a la estructura de una molécula de ácido nucleico que permite que una actividad inhibidora del gen diana se provoque por la secuencia inhibidora de la expresión para que funcione, por ejemplo, en una célula. Por tanto, en la presente invención, no solo las secuencias de ARN monocatenario del ARNip conocidas en el momento de la presentación de la presente solicitud, sino también secuencias que se identificarían en el futuro, pueden usarse como, por ejemplo, secuencia inhibidora de la expresión.

La secuencia inhibidora de la expresión tiene preferentemente al menos el 90 % de complementariedad, más preferentemente el 95 % de complementariedad, todavía más preferentemente el 98 % de complementariedad, y particularmente preferentemente el 100 % de complementariedad con, por ejemplo, una región predeterminada del gen diana. Si la secuencia inhibidora de la expresión satisface la complementariedad anteriormente descrita, puede reducirse suficientemente por ejemplo, un efecto inespecífico.

Ejemplos específicos de la secuencia inhibidora de la expresión son los siguientes: si el gen diana es el gen GAPDH puede usarse, por ejemplo, una secuencia 19-mera mostrada en SEC ID N°: 4; si el gen diana es el gen TGF- β 1 puede usarse, por ejemplo, una secuencia 21-mera mostrada en SEC ID N°: 18; si el gen diana es el gen LAMA1 puede usarse, por ejemplo, una secuencia 19-mera mostrada en SEC ID N°: 6; y si el gen diana es el gen LMNA puede usarse, por ejemplo, una secuencia 19-mera mostrada en SEC ID N°: 30.

5'-GUUGUCAUACUUCUCAUGG-3' (SEC ID N°: 4)
 5'-AAAGUCA AUGUACAGCUGCUU-3' (SEC ID N°: 18)
 5'-AUUGUAACGAGACAAACAC-3' (SEC ID N°: 6)
 5'-UUGCGCUUUUUGGUGACGC-3' (SEC ID N°: 30)

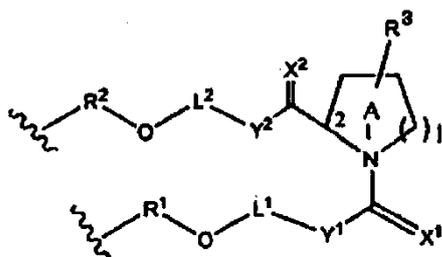
Se supone que la inhibición de la expresión de un gen diana por la molécula de PNmc de la presente invención se logra por interferencia por ARN. Debe observarse, sin embargo, que la presente invención no está en absoluto limitada por este mecanismo. A diferencia del llamado ARNip, la molécula de PNmc de la presente invención no se

introduce en una célula o similares en forma de ARNbc compuesto por dos ARN monocatenarios, y no siempre es necesario, por ejemplo, escindir la secuencia inhibidora de la expresión en la célula. Así, puede decirse que la molécula de PNmc de la presente invención presenta, por ejemplo, una función similar a interferencia por ARN.

- 5 La molécula de PNmc de la presente invención puede inhibir un efecto secundario, por ejemplo, tal como inducción de interferón *in vivo* y presenta excelente resistencia a nucleasa.

En la molécula de PNmc de la presente invención, la región de ligador se representa, por ejemplo, por la siguiente fórmula (I)

10



. . . (I)

En la fórmula (I), por ejemplo,

- 15 X^1 y X^2 son cada uno independientemente H_2 , O, S o NH;
 Y^1 y Y^2 son cada uno independientemente un enlace sencillo, CH_2 , NH, O o S;
 R^3 es un átomo de hidrógeno o sustituyente que está unido a C-3, C-4, C-5 o C-6 sobre un anillo A;
 L^1 es una cadena de alquileo compuesta por n átomos, y átomo(s) de hidrógeno sobre átomo(s) de carbono del alquileo puede(n) o puede(n) no estar sustituido(s) con OH, OR^a , NHR^a , NR^aR^b , SH o SR^a , o,
 20 L^1 es una cadena de poliéter obtenida sustituyendo al menos un átomo de carbono sobre la cadena de alquileo con un átomo de oxígeno,
 a condición de que: cuando Y^1 sea NH, O o S, un átomo unido a Y^1 en L^1 sea carbono, un átomo unido a OR^1 en L^1 sea carbono y los átomos de oxígeno no sean adyacentes entre sí;
 L^2 es una cadena de alquileo compuesta por m átomos, y átomo(s) de hidrógeno sobre átomo(s) de carbono del alquileo puede(n) o puede(n) no estar sustituido(s) con OH, OR^c , NHR^c , NR^cR^d , SH o SR^c , o
 25 L^2 es una cadena de poliéter obtenida sustituyendo al menos un átomo de carbono sobre la cadena de alquileo con un átomo de oxígeno,
 a condición de que: cuando Y^2 sea NH, O o S, un átomo unido a Y^2 en L^2 sea carbono, un átomo unido a OR^2 en L^2 sea carbono y los átomos de oxígeno no sean adyacentes entre sí;
 30 R^a , R^b , R^c y R^d son cada uno independientemente un sustituyente o un grupo protector;
 l es 1 o 2;
 m es un número entero en el intervalo de 0 a 30;
 n es un número entero en el intervalo de 0 a 30;
 las regiones (Xc) y (X) están cada una ligadas a la región de ligador (Lx) mediante $-OR^1-$ o $-OR^2-$; y
 35 R^1 y R^2 pueden o pueden no estar presentes, y cuando están presentes, R^1 y R^2 son cada uno independientemente un residuo de nucleótido o la estructura de fórmula (I).

En la fórmula (I), X^1 y X^2 son cada uno independientemente H_2 , O, S o NH, por ejemplo. En la fórmula (I), " X^1 es H_2 " significa que X^1 forma CH_2 (un grupo metileno) junto con un átomo de carbono al que se une X^1 . Lo mismo se aplica a X^2 .

40

En la fórmula (I), Y^1 y Y^2 son cada uno independientemente un enlace sencillo, CH_2 , NH, O o S.

En la fórmula (I), l en el anillo A es 1 o 2. Si $l = 1$, el anillo A es un anillo de 5 miembros, que es, por ejemplo, el esqueleto de pirrolidina. El esqueleto de pirrolidina es, por ejemplo, un esqueleto de prolina, un esqueleto de prolinol o similares, y ejemplos específicos incluyen estructuras divalentes del esqueleto de prolina y el esqueleto de prolinol. Si $l = 2$, el anillo A es un anillo de 6 miembros, que es, por ejemplo, el esqueleto de piperidina. El anillo A puede estar, por ejemplo, en tanto la forma L como la forma D.

En la fórmula (I), R^3 es un átomo de hidrógeno o sustituyente que está unido a C-3, C-4, C-5 o C-6 sobre el anillo A. Si R^3 es el sustituyente, puede ser un sustituyente R^3 , dos o más sustituyentes R^3 , o ningún sustituyente R^3 , y si hay una pluralidad de sustituyentes R^3 , pueden ser iguales o diferentes.

El sustituyente R^3 es, por ejemplo, un halógeno, OH, OR^4 , NHR^4 , NR^4R^5 , SH, SR^4 , un grupo oxo (=O), o similares.

55

5 R^4 y R^5 son cada uno un sustituyente o un grupo protector, y pueden ser iguales o diferentes. Ejemplos del sustituyente incluyen halógenos, alquilos, alquenos, alquinos, haloalquilos, arios, heteroarilos, arilalquilos, cicloalquilos, cicloalquenos, cicloalquilalquilos, ciclilalquilos, hidroxialquilos, alcoxialquilos, aminoalquilos, heterociclilalquenos, heterociclilalquilos, heteroarilalquilos, sililos y sililoxialquilos. Lo mismo se aplica en lo sucesivo. El sustituyente R^3 puede ser cualquiera de los sustituyentes enumerados anteriormente.

10 El grupo protector es un grupo funcional que inactiva, por ejemplo, un grupo funcional altamente reactivo. Ejemplos del grupo protector incluyen grupos protectores conocidos. Con respecto al grupo protector, la descripción puede encontrarse, por ejemplo, en la bibliografía (J. F. W. McOmie, "Protecting Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, Londres y Nueva York, 1973). El grupo protector no está particularmente limitado, y ejemplos del mismo incluyen un grupo terc-butildimetilsililo (TBDMS), un grupo bis(2-acetoxietiloxi)metilo (ACE), un grupo triisopropilsililoximetilo (TOM), un grupo 1-(2-cianoetoxi)etilo (CEE), un grupo 2-cianoetoximetilo (CEM), un grupo toliisulfoniletoximetilo (TEM) y un grupo dimetoxitritilo (DMTr). Si R^3 es OR^4 , el grupo protector no está particularmente limitado, y ejemplos del mismo incluyen un grupo TBDMS, un grupo ACE, un grupo TOM, un grupo CEE, un grupo CEM y un grupo TEM. Otros ejemplos del grupo protector incluyen grupos que contienen sililo representados por la fórmula que va a mostrarse en el párrafo [0275]. Lo mismo se aplica en lo sucesivo.

20 En la fórmula (I), L^1 es una cadena de alquileo compuesta por n átomos. El (Los) átomo(s) de hidrógeno sobre el (los) átomo(s) de carbono del alquileo puede(n) o puede(n) no estar sustituido(s), por ejemplo, con OH , OR^a , NH_2 , NHR^a , NR^aR^b , SH o SR^a . Alternativamente, L^1 puede ser una cadena de poliéter obtenida sustituyendo al menos un átomo de carbono sobre la cadena de alquileo con un átomo de oxígeno. La cadena de poliéter es, por ejemplo, polietilenglicol. Si Y^1 es NH , O o S , un átomo unido a Y^1 en L^1 es carbono, un átomo unido a OR^1 en L^1 es carbono y los átomos de oxígeno no son adyacentes entre sí. Es decir, por ejemplo, si Y^1 es O , este átomo de oxígeno y el átomo de oxígeno en L^1 no son adyacentes entre sí, y el átomo de oxígeno en OR^1 y el átomo de oxígeno en L^1 no son adyacentes entre sí.

30 En la fórmula (I), L^2 es una cadena de alquileo compuesta por m átomos. El (Los) átomo(s) de hidrógeno sobre átomo(s) de carbono del alquileo puede(n) o puede(n) no estar sustituido(s), por ejemplo, con OR , OR^c , NH_2 , NHR^c , NR^cR^d , SH o SR^c . Alternativamente, L^2 puede ser una cadena de poliéter obtenida sustituyendo al menos un átomo de carbono sobre la cadena de alquileo con un átomo de oxígeno. Si Y^2 es NH , O o S , un átomo unido a Y^2 en L^2 es carbono, un átomo unido a OR^2 en L^2 es carbono y los átomos de oxígeno no son adyacentes entre sí. Es decir, por ejemplo, cuando Y^2 sea O , este átomo de oxígeno y el átomo de oxígeno en L^2 no son adyacentes entre sí, y el átomo de oxígeno en OR^2 y el átomo de oxígeno en L^2 no son adyacentes entre sí.

35 n de L^1 y m de L^2 no están particularmente limitados, y el límite inferior de cada uno de ellos puede ser, por ejemplo, 0 y el límite superior de los mismos no está particularmente limitado. n y m pueden fijarse según convenga dependiendo de una longitud deseada, por ejemplo, de la región de ligador (Lx). Por ejemplo, desde el punto de vista del coste de fabricación, rendimiento y similares, n y m son cada uno preferentemente 0 a 30, más preferentemente 0 a 20, y todavía más preferentemente 0 a 15. n y m puede ser iguales ($n = m$) o diferentes. $n + m$ es, por ejemplo, 0 a 30, preferentemente 0 a 20, y más preferentemente 0 a 15.

R^a , R^b , R^c y R^d son cada uno independientemente, por ejemplo, un sustituyente o un grupo protector. El sustituyente y el grupo protector son, por ejemplo, los mismos que se han descrito anteriormente.

45 En la fórmula (I), los átomos de hidrógeno pueden estar cada uno sustituidos independientemente, por ejemplo, con un halógeno tal como Cl , Br , F , o I .

50 Las regiones (Xc) y (X) están cada una ligadas a la región de ligador (Lx), por ejemplo, mediante $-OR^1-$ o $-OR^2-$. R^1 y R^2 pueden o pueden no estar presentes. Si R^1 y R^2 están presentes, R^1 y R^2 son cada uno independientemente un residuo de nucleótido o la estructura representada por la fórmula (I). Si R^1 y/o R^2 es el residuo de nucleótido, la región de ligador (Lx) está compuesta por el residuo de no nucleótido que tiene la estructura de fórmula (I) excluyendo, por ejemplo, el residuo de nucleótido R^1 y/o R^2 , y el (los) residuo(s) de nucleótido(s). Si R^1 y/o R^2 es la estructura representada por la fórmula (I), la estructura de la región de ligador (Lx) es de forma que, por ejemplo, dos o más de los residuos de no nucleótido que tienen la estructura de fórmula (I) estén ligados entre sí. El número de las estructuras de fórmula (I) puede ser, por ejemplo, 1, 2, 3 o 4. Si la región de ligador (Lx) incluye una pluralidad de estructuras, las estructuras de fórmula (I) pueden ligarse, por ejemplo, tanto directamente como mediante los residuo(s) de nucleótido(s). Por otra parte, si R^1 y R^2 no están presentes, la región de ligador (Lx) está compuesta, por ejemplo, por el residuo de no nucleótido que tiene la estructura de fórmula (I) solo.

60 La combinación de las regiones (Xc) y (X) con $-OR^1-$ y $-OR^2-$ no está particularmente limitada, y puede ser, por ejemplo, cualquiera de las siguientes condiciones.

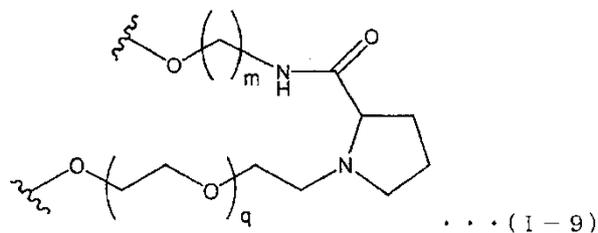
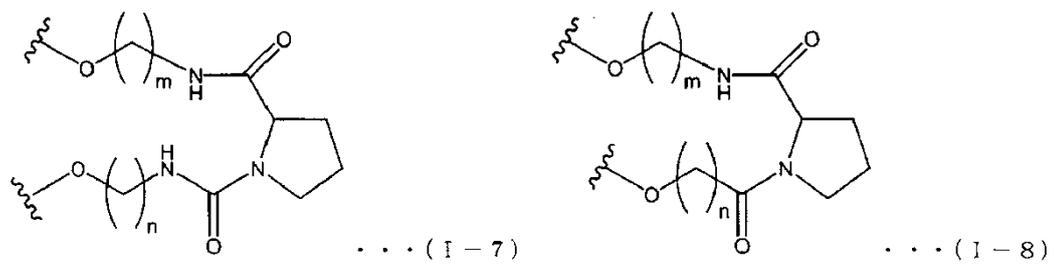
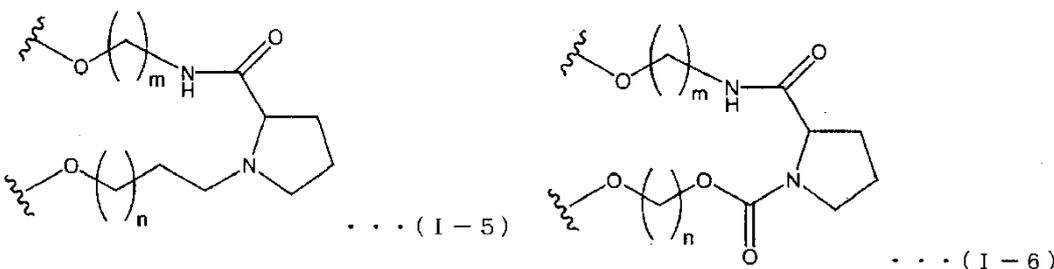
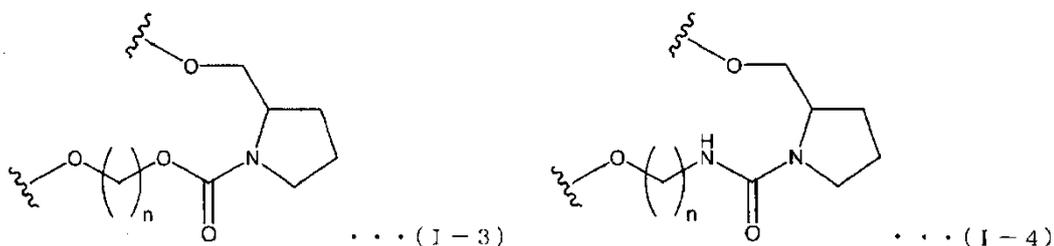
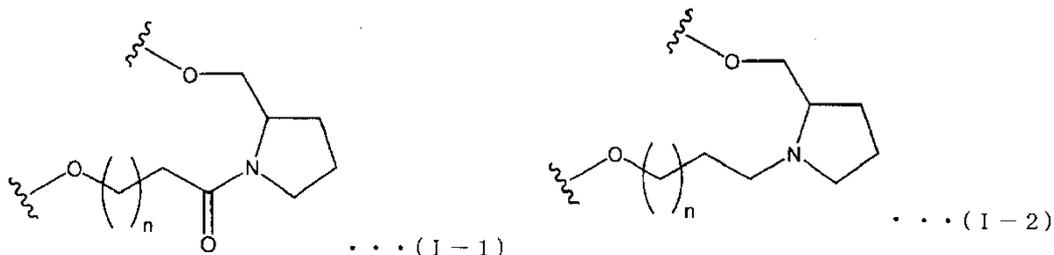
Condición (1):

65 las regiones (Xc) y (X) están ligadas a la estructura de fórmula (I) mediante $-OR^2-$ y $-OR^1-$, respectivamente.

Condición (2):

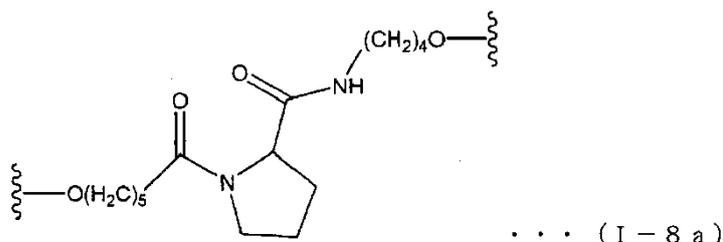
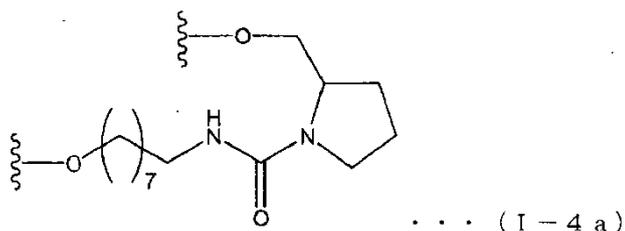
las regiones (Xc) y (X) están ligadas a la estructura de fórmula (I) mediante -OR¹- y -OR²-, respectivamente.

5 Ejemplos de la estructura de fórmula (I) incluyen las estructuras de las siguientes fórmulas (I-1) a (I-9). En las siguientes fórmulas, n y m son los mismos que en la fórmula (I). En las siguientes fórmulas, q es un número entero de 0 a 10.



En las fórmulas (I-1) a (I-9), n, m y q no están particularmente limitados, y son como se ha descrito anteriormente. Ejemplos específicos son del siguiente modo: en la fórmula (I-1), n = 8; en la fórmula (I-2), n = 3; en la fórmula (I-3), n = 4 u 8; en la fórmula (I-4), n = 7 u 8; en la fórmula (I-5), n = 3 y m = 4; en la fórmula (I-6), n = 8 y m = 4; en la fórmula (I-7), n = 8 y m = 4; en la fórmula (I-8), n = 5 y m = 4; y en la fórmula (I-9), q = 1 y m = 4. La siguiente fórmula (I-4a) muestra un ejemplo de fórmula (I-4) (n = 8), y la siguiente fórmula (I-8a) muestra un ejemplo de fórmula (I-8) (n = 5, m = 4).

25



5 En la molécula de PNmc de la presente invención, la región (Xc) es complementaria a la región (X). Así, en la molécula de PNmc de la presente invención, una hebra doble puede formarse plegando hacia atrás la región (Xc) hacia la región (X) y autohibridando las regiones (Xc) y (X). La molécula de PNmc de la presente invención puede formar una hebra doble intramolecularmente como se ha descrito anteriormente. Así, la estructura de la molécula de PNmc es totalmente diferente de la estructura de un ARN bicatenario obtenido mediante hibridación de dos ARN monocatenarios separados, tal como, por ejemplo, ARNip convencionalmente usado en interferencia por ARN.

En el presente documento se desvela una molécula de PNmc en la que solo la región (Xc) puede plegarse hacia atrás para formar una hebra doble con la región (X). En lo sucesivo, una molécula de PNmc tal, es decir, la molécula de PNmc en la que la formación de hebras dobles se produce en una localización, se denomina una "primera molécula de PNmc". La molécula de PNmc según la presente invención es, sin embargo, una molécula de PNmc en la que la formación de hebras dobles se produce en dos localizaciones. Una molécula de PNmc tal se denomina una "segunda molécula de PNmc". Ejemplos de la primera y segunda moléculas de PNmc se facilitan más adelante. Debe observarse, sin embargo, que la presente invención no se limita a estos ejemplos ilustrativos de la segunda molécula de PNmc.

(1) Primera molécula de PNmc (no de invención)

La primera molécula de PNmc es una molécula que incluye, por ejemplo, la región (X), la región (Xc) y la región de ligador (Lx).

La primera molécula de PNmc puede incluir la región (Xc), la región de ligador (Lx) y la región (X) en este orden desde el lado de 5' hasta el lado de 3', o puede incluir, por ejemplo, la región (Xc), la región de ligador (Lx) y la región (X) en este orden desde el lado de 3' hasta el lado de 5'.

En la primera molécula de PNmc, la región (Xc) es complementaria a la región (X). Solo es necesario que la región (Xc) tenga una secuencia complementaria a la región entera o parte de la región (X). Preferentemente, la región (Xc) incluye o está compuesta por una secuencia complementaria a la región entera o parte de la región (X). La región (Xc) puede ser perfectamente complementaria a la región entera o parte de la región (X), o una o algunas bases en la región (Xc) pueden ser, por ejemplo, no complementarias a la misma. Preferentemente, la región (Xc) es perfectamente complementaria a la misma. La expresión "una o algunas bases" significa, por ejemplo, 1 a 3 bases, preferentemente 1 base o 2 bases.

En la primera molécula de PNmc, la secuencia inhibidora de la expresión se incluye en al menos una de las regiones (Xc) y (X), como se ha descrito anteriormente. La primera molécula de PNmc puede incluir una secuencia inhibidora de la expresión, o, por ejemplo, dos o más secuencias inhibidoras de la expresión.

En el último caso, la primera molécula de PNmc puede incluir, por ejemplo: dos o más secuencias inhibidoras de la expresión idénticas para el mismo gen diana; dos o más secuencias inhibidoras de la expresión diferentes para el mismo gen diana; o dos o más secuencias inhibidoras de la expresión diferentes para diferentes genes diana. Si la primera molécula de PNmc incluye dos o más secuencias inhibidoras de la expresión, las posiciones de las secuencias inhibidoras de la expresión respectivas no están particularmente limitadas, y pueden estar en una región o regiones diferentes seleccionadas de las regiones (X) y (Xc). Si la primera molécula de PNmc incluye dos o más secuencias inhibidoras de la expresión para diferentes genes diana, la primera molécula de PNmc pueden inhibir, por ejemplo, las expresiones de dos o más tipos de genes diana diferentes.

La FIG. 1 muestra vistas esquemáticas que ilustran un ejemplo de la primera molécula de PNmc. La FIG. 1A es una vista esquemática que muestra el orden de las regiones respectivas en la molécula de PNmc, como un ejemplo ilustrativo. La FIG. 1B es una vista esquemática que muestra el estado en el que una hebra doble se forma en la molécula de PNmc. Como se muestra en la FIG. 1B, en la molécula de PNmc, una hebra doble se forma entre las regiones (Xc) y (X), y la región Lx tiene una estructura de bucle que depende de su longitud. La vista esquemática mostrada en la FIG. 1 ilustra únicamente el orden en el que las regiones respectivas están ligadas y la relación de posición de las regiones respectivas que forman la hebra doble, y no limitan, por ejemplo, las longitudes de las regiones respectivas, la forma de la región de ligador (Lx), y similares.

En la primera molécula de PNmc, el número de bases en cada una de las regiones (X) y (Xc) no está particularmente limitado. Ejemplos de las longitudes de las regiones respectivas se facilitan más adelante. En el presente documento, "el número de bases" significa la "longitud", por ejemplo, y también puede denominarse la "longitud de bases". El intervalo numérico con respecto al número de bases divulga todos los números enteros positivos que se encuentran dentro de ese intervalo. Por ejemplo, la descripción "1 a 4 bases" divulgó todas de "1, 2, 3 y 4 bases" (lo mismo se aplica en lo sucesivo).

La región (Xc) puede ser perfectamente complementaria, por ejemplo, a la región entera de la región (X). En este caso, significa que, por ejemplo, la región (Xc) está compuesta por una secuencia de bases complementaria a la región entera que se extiende desde el extremo 5' hasta el extremo 3' de la región (X). En otras palabras, significa que la región (Xc) tiene la misma longitud de bases que la región (X), y todas las bases en la región (Xc) son complementarias a todas las bases en la región (X).

Además, la región (Xc) puede ser perfectamente complementaria, por ejemplo, a parte de la región (X). En este caso significa que, por ejemplo, la región (Xc) está compuesta por una secuencia de bases complementaria a la parte de la región (X). En otras palabras, significa que la región (Xc) está compuesta por una secuencia de bases cuya longitud de bases es más corta que la longitud de bases de la región (X) por una o más bases, y todas las bases en la región (Xc) son complementarias a todas las bases en la parte de la región (X). La parte de la región (X) es preferentemente una región que tiene, por ejemplo, una secuencia de bases compuesta por bases sucesivas a partir de la base en el extremo (la 1ª base) sobre el lado de la región (Xc).

En la primera molécula de PNmc, la relación entre el número de bases (X) en la región (X) y el número de bases (Xc) en la región (Xc) satisfacen, por ejemplo, la condición (3) o (5). En el primer caso, específicamente, se satisface, por ejemplo, la siguiente condición (11).

$$X > Xc \quad \dots(3)$$

$$X - Xc = 1 \text{ a } 10, \text{ preferentemente } 1, 2 \text{ o } 3,$$

$$\text{más preferentemente } 1 \text{ o } 2 \quad \dots(11)$$

$$X = Xc \quad \dots(5)$$

Si la región (X) y/o la región (Xc) incluye la secuencia inhibidora de la expresión, la región interna (Z) puede ser una región compuesta por la secuencia inhibidora de la expresión solo o una región que incluye, por ejemplo, la secuencia inhibidora de la expresión. El número de bases en la secuencia inhibidora de la expresión es, por ejemplo, 19 a 30, preferentemente 19, 20 o 21. En la(s) región (regiones) que incluye(n), por ejemplo, la secuencia inhibidora de la expresión, la secuencia inhibidora de la expresión puede tener adicionalmente una secuencia adicional en su lado 5' y/o lado 3'. El número de bases en la secuencia adicional es, por ejemplo, 1 a 31, preferentemente 1 a 21, y más preferentemente 1 a 11.

El número de bases en la región (X) no está particularmente limitado. Si la región (X) incluye la secuencia inhibidora de la expresión, el límite inferior del número de bases en la región (X) es, por ejemplo, 19, y el límite superior de la misma es, por ejemplo, 50, preferentemente 30, y más preferentemente 25. Específicamente, el número de bases en la región (X) es, por ejemplo, 19 a 50, preferentemente 19 a 30, y más preferentemente 19 a 25.

El número de bases en la región (Xc) no está particularmente limitado. El límite inferior del número de bases en la región (Xc) es, por ejemplo, 19, preferentemente 20, y más preferentemente 21, y el límite superior de la misma es, por ejemplo, 50, más preferentemente 40, y todavía más preferentemente 30.

En la molécula de PNmc, la longitud de la región de ligador (Lx) no está particularmente limitada. La longitud de la región de ligador (Lx) es preferentemente de forma que, por ejemplo, las regiones (X) y (Xc) puedan formar una hebra doble. Si la región de ligador (Lx) incluyen el (los) residuo(s) de nucleótido(s), además de los residuo(s) de no nucleótido(s), el límite inferior del número de bases en la región de ligador (Lx) es, por ejemplo, 1, preferentemente 2, y más preferentemente 3, y el límite superior del mismo es, por ejemplo, 100, preferentemente 80, y más preferentemente 50.

La longitud completa de la primera molécula de PNmc no está particularmente limitada. En la primera molécula de PNmc, el límite inferior del número total de bases (el número de bases en la molécula de PNmc de longitud completa) es, por ejemplo, 38, preferentemente 42, más preferentemente 50, todavía más preferentemente 51, y particularmente preferentemente 52, y el límite superior de la misma es, por ejemplo, 300, preferentemente 200, más preferentemente 150, todavía más preferentemente 100, y particularmente preferentemente 80. En la primera molécula de PNmc, el límite inferior del número total de bases excluyendo aquellas en la región de ligador (Lx) es, por ejemplo, 38, preferentemente 42, más preferentemente 50, todavía más preferentemente 51, y particularmente preferentemente 52, y el límite superior de la misma es, por ejemplo, 300, preferentemente 200, más preferentemente 150, todavía más preferentemente 100, y particularmente preferentemente 80.

(2) Segunda molécula de PNmc (invención)

La segunda molécula de PNmc es una molécula que incluye adicionalmente una región (Y) y una región (Yc) que es complementaria a la región (Y), además de, por ejemplo, la región (X), la región de ligador (Lx) y la región (Xc). En la segunda molécula de PNmc, una región interna (Z) está compuesta por la región (X) y la región (Y) que están ligadas entre sí. La descripción con respecto a la primera molécula de PNmc también se aplica a la segunda molécula de PNmc, a menos que se establezca de otro modo. Hay una región de ligador (Ly) entre las regiones (Y) y (Yc).

La segunda molécula de PNmc puede incluir, por ejemplo, la región (Xc), la región de ligador (Lx), la región (X), la región (Y) y la región (Yc) en este orden desde el lado 5' hasta el lado 3'. En este caso, la región (Xc) también se denomina "región del lado 5' (Xc)"; la región (X) en la región (Z) también denomina "región del lado 5' interna (X)"; la región (Y) en la región interna (Z) también denomina "región de 3' interna (Y)"; y la región (Yc) también se denomina "región del lado 3' (Yc)". Alternativamente, la segunda molécula de PNmc puede incluir, por ejemplo, la región (Xc), la región de ligador (Lx), la región (X), la región (Y) y la región (Yc) en este orden desde el lado 3' hasta el lado 5'. En este caso, la región (Xc) también se denomina "región del lado 3' (Xc)"; la región (X) en la región interna (Z) también denomina "región del lado 3' interna (X)"; la región (Y) en la región interna (Z) también denomina "región de 5' interna (Y)"; y la región (Yc) también se denomina "región del lado 5' (Yc)".

Como se ha descrito anteriormente, la región interna (Z) está compuesta, por ejemplo, por las regiones (X) y (Y) que están ligadas entre sí. Las regiones (X) y (Y) están ligadas directamente entre sí, por ejemplo, sin secuencia interviniente entre ellas. La región interna (Z) se define como que está "compuesta por las regiones (X) y (Y) que están ligadas entre sí" únicamente para indicar el contexto de secuencias entre la región del lado 5' (Xc) y la región del lado 3' (Yc). La región inhibidora de la expresión puede estar dispuesta de manera que se extienda a través de las regiones (X) y (Y) en la región interna (Z).

En la segunda molécula de PNmc, la región (Xc) es complementaria a la región (X). Solo es necesario que la región (Xc) tenga una secuencia complementaria a la región entera o parte de la región (X). Preferentemente, la región (Xc) incluye o está compuesta por una secuencia complementaria a la región entera o parte de la región (X). La región (Xc) puede ser perfectamente complementaria a la región entera o parte de la región (X), o una o algunas bases en la región (Xc) pueden ser, por ejemplo, no complementarias a la misma. Preferentemente, la región (Xc) es perfectamente complementaria a la misma. La expresión "una o algunas bases" significa, por ejemplo, 1 a 3 bases, preferentemente 1 base o 2 bases.

En la segunda molécula de PNmc, la región (Yc) es complementaria a la región (Y). Solo es necesario que la región (Yc) tenga una secuencia complementaria a la región entera o parte de la región (Y). Preferentemente, la región (Yc) incluye o está compuesta por una secuencia complementaria a la región entera o parte de la región (Y). La región (Yc) puede ser perfectamente complementaria a la región entera o parte de la región (Y), o una o algunas bases en la región (Yc) pueden ser, por ejemplo, no complementarias a la misma. Preferentemente, la región (Yc) es perfectamente complementaria a la misma. La expresión "una o algunas bases" significa, por ejemplo, 1 a 3 bases, preferentemente 1 base o 2 bases.

En la segunda molécula de PNmc, la región interna (Z), que está compuesta de las regiones (X) y (Y), incluye la secuencia inhibidora de la expresión. Cualquiera de las regiones (X) y (Y) puede incluir la secuencia inhibidora de la expresión, o la secuencia inhibidora de la expresión puede estar incluida de manera que se extienda a través de, por ejemplo, las regiones (X) y (Y). La segunda molécula de PNmc puede incluir, por ejemplo, una secuencia inhibidora de la expresión, o dos o más secuencias inhibidoras de la expresión.

Cuando la segunda molécula de PNmc incluye dos o más secuencias inhibidoras de la expresión, las posiciones de las secuencias inhibidoras de la expresión respectivas no están particularmente limitadas. Pueden estar en una cualquiera de la región interna (Z) y la región (Xc), o pueden estar en la región interna (Z) y cualquier otra región distinta de la región (Xc).

La segunda molécula de PNmc está configurada de manera que tenga una región de ligador (Ly) entre las regiones (Yc) y (Y), y las regiones (Yc) y (Y) están ligadas mediante la región de ligador (Ly).

Cuando la segunda molécula de PNmc tienen la región de ligador (Ly), la región de ligador (Ly) puede ser un ligador compuesto del (de los) residuo(s) de nucleótidos, o un ligador que tiene una estructura de no nucleótido que contiene al menos una de un esqueleto de pirrolidina y un esqueleto de piperidina. El esqueleto de pirrolidina puede ser el esqueleto de un derivado de pirrolidina obtenido mediante la sustitución de al menos un carbono que constituye, por ejemplo, el anillo de pirrolidina de 5 miembros. En el caso de la sustitución, es preferible sustituir, por ejemplo, el (los) carbono(s) distintos de C-2. El carbono puede estar sustituido, por ejemplo, con nitrógeno, oxígeno o azufre. El esqueleto de pirrolidina puede contener, por ejemplo, un doble enlace carbono-carbono o un doble enlace carbono-nitrógeno en, por ejemplo, el anillo de pirrolidina de 5 miembros. En el esqueleto de pirrolidina, los carbonos y el nitrógeno que constituyen el anillo de pirrolidina de 5 miembros pueden tener cada uno hidrógeno unido al mismo, o, por ejemplo, un sustituyente que va a describirse más adelante unido al mismo.

La región de ligador (Ly) puede ligarse a las regiones (Y) y (Yc) mediante, por ejemplo, cualquier grupo en el esqueleto de pirrolidina, preferentemente cualquier átomo de carbono o nitrógeno en el anillo de 5 miembros, y más preferentemente el carbono en la posición 2 (C-2) o nitrógeno en el anillo de 5 miembros. Ejemplos del esqueleto de pirrolidina incluyen esqueletos de prolina y esqueletos de prolinol. Los esqueletos de prolina, los esqueletos de prolinol, y similares, son excelentes en seguridad debido a que son sustancias presentes en, por ejemplo, organismos vivos y reductores de los mismos.

El esqueleto de piperidina puede ser el esqueleto de un derivado de piperidina obtenido mediante la sustitución de al menos un carbono que constituye, por ejemplo, el anillo de piperidina de 6 miembros. En el caso de la sustitución, es preferible sustituir, por ejemplo, el (los) carbono(s) distintos de C-2. El carbono puede estar sustituido, por ejemplo, con nitrógeno, oxígeno o azufre. El esqueleto de piperidina puede contener, por ejemplo, un doble enlace carbono-carbono o un doble enlace carbono-nitrógeno en, por ejemplo, el anillo de piperidina de 6 miembros. En el esqueleto de piperidina, los carbonos y el nitrógeno que constituyen el anillo de piperidina de 6 miembros pueden tener cada uno hidrógeno unido al mismo, o, por ejemplo, un sustituyente que va a describirse más adelante unido al mismo.

La región de ligador (Ly) puede ligarse a las regiones (Y) y (Yc) mediante, por ejemplo, cualquier grupo en el esqueleto de piperidina, preferentemente cualquier átomo de carbono o nitrógeno en el anillo de 6 miembros, y más preferentemente el carbono en la posición 2 (C-2) o nitrógeno en el anillo de 6 miembros.

La región de ligador (Ly) puede representarse por la fórmula (I), por ejemplo, y todas las descripciones referentes a la fórmula (I) establecidas anteriormente a propósito de la región de ligador (Lx) también se aplican a la región de ligador (Ly).

Las regiones (Yc) y (Y) están cada una ligadas a la región de ligador (Ly) mediante, por ejemplo, $-OR^1-$ o $-OR^2-$. En la región de ligador (Ly), R^1 y R^2 pueden o pueden no estar presentes, como en la región de ligador (Lx) anteriormente descrita.

La combinación de las regiones (Xc) y (X) con $-OR^1-$ y $-OR^2-$, y la combinación de las regiones (Yc) y (Y) con $-OR^1-$ y $-OR^2-$, no están particularmente limitadas, y pueden ser, por ejemplo, cualquiera de las siguientes condiciones.

Condición (1):

las regiones (Xc) y (X) están ligadas a la estructura de fórmula (I) mediante $-OR^2-$ y $-OR^1-$, respectivamente;
y
las regiones (Yc) y (Y) están ligadas a la estructura de fórmula (I) mediante $-OR^1-$ y $-OR^2-$, respectivamente.

Condición (2):

las regiones (Xc) y (X) están ligadas a la estructura de fórmula (I) mediante $-OR^2-$ y $-OR^1-$, respectivamente;
y
las regiones (Yc) y (Y) están ligadas a la estructura de fórmula (I) mediante $-OR^2-$ y $-OR^1-$, respectivamente.

Condición (3):

las regiones (Xc) y (X) están ligadas a la estructura de fórmula (I) mediante $-OR^1-$ y $-OR^2-$, respectivamente;
y
las regiones (Yc) y (Y) están ligadas a la estructura de fórmula (I) mediante $-OR^1-$ y $-OR^2-$, respectivamente.

Condición (4):

las regiones (Xc) y (X) están ligadas a la estructura de fórmula (I) mediante $-OR^1-$ y $-OR^2-$, respectivamente;
y
las regiones (Yc) y (Y) están ligadas a la estructura de fórmula (I) mediante $-OR^2-$ y $-OR^1-$, respectivamente.

La FIG. 2 muestra vistas esquemáticas que ilustran un ejemplo de la segunda molécula de PNmc que tiene la región de ligador (Ly). La FIG. 2A es una vista esquemática que muestra el orden de las regiones respectivas desde el lado 5' hasta el lado 3' en la molécula de PNmc, como un ejemplo ilustrativo. La FIG. 2B es una vista esquemática que muestra el estado en el que hebras dobles se forman en la molécula de PNmc. Como se muestra en la FIG. 2B, en la molécula de PNmc, hebras dobles se forman entre las regiones (Xc) y (X) y entre las regiones (Y) y (Yc) y la

región Lx y la región Ly tienen cada una una estructura de bucle dependiendo de sus longitudes. La vista esquemática mostrada en la FIG. 2 ilustra únicamente el orden en el que las regiones respectivas están ligadas y la relación de posición de las regiones respectivas que forman la hebra doble, y no limitan, por ejemplo, las longitudes de las regiones respectivas, la forma de la región de ligador, y similares. Además, aunque la región (Xc) esté sobre el lado 5' en la FIG. 2, la posición de la región (Xc) no se limita a ésta, y la región (Xc) puede estar sobre el lado 3'.

En la segunda molécula de PNmc, el número de bases en cada una de las regiones (Xc), (X), (Y) y (Yc) no está particularmente limitado. Ejemplos de las longitudes de las regiones respectivas se facilitan más adelante. Debe observarse, sin embargo, que la presente invención no se limita en absoluto a esto.

Como se ha descrito anteriormente, la región (Xc) puede ser complementaria, por ejemplo, a la región entera de la región (X). En este caso es preferible que, por ejemplo, la región (Xc) tenga la misma longitud de bases que la región (X), y esté compuesta por una secuencia de bases complementaria a la región entera de la región (X). Es más preferible, por ejemplo, que la región (Xc) tenga la misma longitud de bases que la región (X), y todas las bases en la región (Xc) sean complementarias a todas las bases en la región (X), es decir, la región (Xc) sea perfectamente complementaria a la región (X). Debe observarse, sin embargo, que la configuración de la región (Xc) no se limita a ésta, y, por ejemplo, una o algunas bases en la región (Xc) pueden ser no complementarias a las bases correspondientes en la región (X), como se ha descrito anteriormente.

Además, como se ha descrito anteriormente, la región (Xc) puede ser complementaria, por ejemplo, a parte de la región (X). En este caso es preferible que, por ejemplo, la región (Xc) tenga la misma longitud de bases que la parte de la región (X), es decir, la región (Xc) esté compuesta por una secuencia de bases cuya longitud de bases es más corta que la longitud de bases de la región (X) por una o más bases. Es más preferible, por ejemplo, que la región (Xc) tenga la misma longitud de bases que la parte de la región (X) y todas las bases en la región (Xc) sean complementarias a todas las bases en la parte de la región (X), es decir, la región (Xc) sea perfectamente complementaria a la parte de la región (X). La parte de la región (X) es preferentemente, por ejemplo, una región que tiene una secuencia de bases compuesta por bases sucesivas a partir de la base en el extremo (la 1ª base) sobre el lado de la región (Xc) en la región (X).

Como se ha descrito anteriormente, la región (Yc) puede ser, por ejemplo, complementaria a la región entera de la región (Y). En este caso es preferible que, por ejemplo, la región (Yc) tenga la misma longitud de bases que la región (Y), y esté compuesta por una secuencia de bases complementaria a la región entera de la región (Y). Es más preferible, por ejemplo, que la región (Yc) tenga la misma longitud de bases que la región (Y), y todas las bases en la región (Yc) sean complementarias a todas las bases en la región (Y), es decir, la región (Yc) sea perfectamente complementaria a la región (Y). Debe observarse, sin embargo, que la configuración de la región (Yc) no se limita a ésta, y, por ejemplo, una o algunas bases en la región (Yc) pueden ser no complementarias a las bases correspondientes en la región (Y), como se ha descrito anteriormente.

Además, como se ha descrito anteriormente, la región (Yc) puede ser, por ejemplo, complementaria a parte de la región (Y). En este caso es preferible que, por ejemplo, la región (Yc) tenga la misma longitud de bases que la parte de la región (Y), es decir, la región (Yc) esté compuesta por una secuencia de bases cuya longitud de bases sea más corta que la longitud de bases de la región (Y) por una o más bases. Es más preferible, por ejemplo, que la región (Yc) tenga la misma longitud de bases que la parte de la región (Y) y todas las bases en la región (Yc) sean complementarias a todas las bases en la parte de la región (Y), es decir, la región (Yc) sea perfectamente complementaria a la parte de la región (Y). La parte de la región (Y) es preferentemente, por ejemplo, una región que tiene una secuencia de bases compuesta por bases sucesivas a partir de la base en el extremo (la 1ª base) sobre el lado de la región (Yc) en la región (Y).

En la segunda molécula de PNmc, la relación del número de bases (Z) en la región interna (Z) con el número de bases (X) en la región (X) y el número de bases (Y) en la región (Y), y la relación del número de bases (Z) en la región interna (Z) con el número de bases (X) en la región (X) y el número de bases (Xc) en la región (Xc) satisfacen, por ejemplo, las condiciones de las expresiones (1) y (2).

$$Z = X + Y \quad \dots (1)$$

$$Z \geq Xc + Yc \quad \dots (2)$$

En la segunda molécula de PNmc, la relación de longitud entre el número de bases (X) en la región (X) y el número de bases (Y) en la región (Y) no está particularmente limitada, y satisfacen, por ejemplo, cualquiera de las condiciones de las siguientes expresiones.

$$X = Y \quad \dots (19)$$

$$X < Y \quad \dots (20)$$

$$X > Y \quad \dots (21)$$

5 En la segunda molécula de PN_mc, la relación entre el número de bases (X) en la región (X) y el número de bases (X_c) en la región (X_c), y la relación entre el número de bases (Y) en la región (Y) y el número de bases (Y_c) en la región (Y_c) satisfacen, por ejemplo, cualquiera de las siguientes condiciones (a) a (d).

(a) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (3) y (4).

10
$$X > X_c \quad \dots (3)$$

$$Y = Y_c \quad \dots (4)$$

15 (b) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (5) y (6).

$$X = X_c \quad \dots (5)$$

$$Y > Y_c \quad \dots (6)$$

20 (c) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (7) y (8).

$$X > X_c \quad \dots (7)$$

25
$$Y > Y_c \quad \dots (8)$$

(d) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (9) y (10).

$$X = X_c \quad \dots (9)$$

30
$$Y = Y_c \quad \dots (10)$$

35 En las condiciones (a) a (d) anteriormente descritas, la diferencia entre el número de bases (X) en la región (X) y el número de bases (X_c) en la región (X_c), y la diferencia entre el número de bases (Y) en la región (Y) y el número de bases (Y_c) en la región (Y_c) satisfacen preferentemente, por ejemplo, las siguientes condiciones (a) a (d).

(a) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (11) y (12).

$$X - X_c = 1 \text{ a } 10, \text{ preferentemente } 1, 2, 3 \text{ o } 4,$$

40
$$\text{y más preferentemente } 1, 2 \text{ o } 3 \quad \dots(11)$$

$$Y - Y_c = 0 \quad \dots(12)$$

(b) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (13) y (14).

45
$$X - X_c = 0 \quad \dots(13)$$

$$Y - Y_c = 1 \text{ a } 10, \text{ preferentemente } 1, 2, 3 \text{ o } 4,$$

50
$$\text{y más preferentemente } 1, 2 \text{ o } 3 \quad \dots(14)$$

(c) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (15) y (16).

$$X - X_c = 1 \text{ a } 10, \text{ preferentemente } 1, 2 \text{ o } 3,$$

55
$$\text{y más preferentemente } 1 \text{ o } 2 \quad \dots(15)$$

$$Y - Y_c = 1 \text{ a } 10, \text{ preferentemente } 1, 2 \text{ o } 3,$$

60
$$\text{y más preferentemente } 1 \text{ o } 2 \quad \dots(16)$$

(d) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (17) y (18).

$$X - X_c = 0 \quad \dots (17)$$

$$Y - Y_c = 0 \quad \dots (18)$$

Con respecto a las segundas moléculas de PNmc que satisfacen las condiciones (a) a (d), ejemplos de sus estructuras se muestran respectivamente en las vistas esquemáticas de la FIG. 3. La FIG. 3 muestra la moléculas de PNmc que incluyen las regiones de ligador (Lx) y (Ly). La FIG. 3A muestra un ejemplo de la molécula de PNmc que satisface la condición (a); la FIG. 3B muestra un ejemplo de la molécula de PNmc que satisface la condición (b); la FIG. 3C muestra un ejemplo de la molécula de PNmc que satisface la condición (c); y la FIG. 3D muestra un ejemplo de la molécula de PNmc que satisface la condición (d). En la FIG. 3, líneas de puntos indican un estado en el que se forman hebras dobles por autohibridación. Las moléculas de PNmc mostradas en la FIG. 3 se refieren todas a ejemplos en los que la relación entre el número de bases (X) en la región (X) y el número de bases (Y) en la región (Y) satisfacen "X < Y" de la expresión (20). Debe observarse, sin embargo, que la relación no se limita a esto, y puede satisfacerse "X = Y" de la expresión (19) o "X > Y" de la expresión (21). La vista esquemática mostrada en la FIG. 3 ilustra únicamente la relación entre las regiones (X) y (Xc) y la relación entre las regiones (Y) y (Yc), y no limitan la longitud, la forma y similares de cada región, y la presencia o ausencia de, por ejemplo, la región de ligador (Ly).

Cada una de las moléculas de PNmc que satisface las condiciones (a) a (c) está configurada de manera que, por ejemplo, si se forman hebras dobles por las regiones (Xc) y (X) y por las regiones (Yc) y (Y), respectivamente, la región interna (Z) incluye al menos una base que no puede alinearse con ninguna de las regiones (Xc) y (Yc). En la región interna (Z), la base que no está alineada (una base que no forma la hebra doble) también se denomina en lo sucesivo "base desapareada". En la FIG. 3, una región compuesta por la(s) base(s) desapareada(s) se muestra como "F". El número de bases en la región (F) no está particularmente limitado. El número de bases (F) en la región (F) es del siguiente modo, por ejemplo: "Xc - X" en el caso de la molécula de PNmc que satisface la condición (a); "Y - Yc" en el caso de la molécula de PNmc que satisface la condición (b); y el total de "Xc - X" y "Y - Yc" en el caso de la molécula de PNmc que satisface la condición (c).

Por otra parte, la molécula de PNmc que satisface la condición (d) está configurada de manera que, por ejemplo, la región entera de la región interna (Z) esté alineada con las regiones (Xc) y (Yc), en otras palabras, la región entera de la región interna (Z) forma una hebra doble. En la molécula de PNmc que satisface la condición (d), el extremo 5' de la región (Xc) y el extremo 3' de la región (Yc) no están ligados entre sí.

El número total de bases en la región (Xc), bases en la región (Yc) y bases desapareadas (F) en la región interna (Z) es igual al número de bases en la región interna (Z). Así, la longitud de la región (Xc) y la longitud de la región (Yc) pueden determinarse según convenga dependiendo, por ejemplo, de la longitud de la región interna (Z), el número de bases desapareadas y las posiciones de las bases desapareadas.

El número de bases en la región interna (Z) es, por ejemplo, 19 o más. El límite inferior del número de bases es, por ejemplo, 19, preferentemente 20, y más preferentemente 21. El límite superior del número de bases es, por ejemplo, 50, preferentemente 40, y más preferentemente 30. Un ejemplo específico del número de bases en la región interna (Z) es 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30. Si la región interna (Z) incluye la secuencia inhibidora de la expresión, la condición anterior es, por ejemplo, preferible.

La región interna (Z) puede ser una región compuesta de la secuencia inhibidora de la expresión solo o una región que incluye, por ejemplo, la secuencia inhibidora de la expresión. El número de bases en la secuencia inhibidora de la expresión es, por ejemplo, 19 a 30, preferentemente 19, 20 o 21. La secuencia inhibidora de la expresión puede tener además una secuencia adicional sobre su lado 5' y/o lado 3'. El número de bases en la secuencia adicional es, por ejemplo, 1 a 31, preferentemente 1 a 21, más preferentemente 1 a 11, y todavía más preferentemente 1 a 7.

El número de bases en la región (Xc) es, por ejemplo, 1 a 29, preferentemente 1 a 11, más preferentemente 1 a 7, todavía más preferentemente 1 a 4, y particularmente preferentemente 1, 2 o 3. Un ejemplo específico es del siguiente modo: si el número de bases en la región interna (Z) es 19 a 30 (por ejemplo, 19), el número de bases en la región (Xc) es, por ejemplo, 1 a 11, preferentemente 1 a 7, más preferentemente 1 a 4, y todavía más preferentemente 1, 2 o 3.

El número de bases en la región (Yc) es, por ejemplo, 1 a 29, preferentemente 1 a 11, más preferentemente 1 a 7, todavía más preferentemente 1 a 4, y particularmente preferentemente 1, 2 o 3. Un ejemplo específico es del siguiente modo: si el número de bases en la región interna (Z) es 19 a 30 (por ejemplo, 19), el número de bases en la región (Yc) es, por ejemplo, 1 a 11, preferentemente 1 a 7, 20 más preferentemente 1, 2, 3 o 4, y todavía más preferentemente 1, 2 o 3.

Como se ha descrito anteriormente, la relación entre el número de bases en la región interna (Z), el número de bases en la región (Xc) y el número de bases en la región (Yc) puede expresarse, por ejemplo, por la expresión (2): $Z \geq Xc + Yc$. Específicamente, el número de bases representado por $Xc + Yc$ es igual al número de bases en la región interna (Z), o, por ejemplo, inferior al número de bases en la región interna (Z). En el último caso, $Z - (Xc + Yc)$ es, por ejemplo, 1 a 10, preferentemente 1 a 4, y más preferentemente 1, 2 o 3. $Z - (Xc + Yc)$ se corresponde, por ejemplo, con el número de bases (F) en la región de bases desapareadas (F) en la región interna (Z).

En la segunda molécula de PNmc, las longitudes de las regiones de ligador (Lx) y (Ly) no están particularmente limitadas. La región de ligador (Lx) es como se ha descrito anteriormente. Si los componentes (bloques constructivos) de la región de ligador (Ly) incluyen una base(s), el límite inferior del número de bases en la región de ligador (Ly) es, por ejemplo, 1, preferentemente 2, y más preferentemente 3, y el límite superior de la misma es, por ejemplo, 100, preferentemente 80, y más preferentemente 50. El número de bases en cada una de las regiones de ligador es específicamente, por ejemplo, 1 a 50, 1 a 30, 1 a 20, 1 a 10, 1 a 7, o 1 a 4, pero no se limita a estos ejemplos ilustrativos.

La región de ligador (Lx) puede ser, por ejemplo, la misma o diferente de la región de ligador (Ly).

La longitud completa de la segunda molécula de PNmc no está particularmente limitada. En la segunda molécula de PNmc, el límite inferior del número total de bases (el número de bases en la molécula de PNmc de longitud completa) es, por ejemplo, 38, preferentemente 42, más preferentemente 50, todavía más preferentemente 51, y particularmente preferentemente 52, y el límite superior de la misma es, por ejemplo, 300, preferentemente 200, más preferentemente 150, todavía más preferentemente 100, y particularmente preferentemente 80. En la segunda molécula de PNmc, el límite inferior del número total de bases excluyendo aquellas en las regiones de ligador (Lx) y (Ly) es, por ejemplo, 38, preferentemente 42, más preferentemente 50, todavía más preferentemente 51, y particularmente preferentemente 52, y el límite superior de la misma es, por ejemplo, 300, preferentemente 200, más preferentemente 150, todavía más preferentemente 100, y particularmente preferentemente 80.

En la molécula de PNmc de la presente invención, solo es necesario que la región de ligador (Lx) tenga la estructura de no nucleótido como se ha descrito anteriormente, y otros componentes no están particularmente limitados. Sin embargo, los residuos de nucleótidos son residuos de ribonucleótidos. El residuo de nucleótido puede ser, por ejemplo, el que no está modificado (residuo de nucleótido sin modificar) o el que ha sido modificado (residuo de nucleótido modificado). Configurando la molécula de PNmc de la presente invención de manera que, por ejemplo, incluya un residuo de nucleótido modificado puede mejorarse la resistencia de la molécula de PNmc a nucleasa, permitiendo así que se mejore la estabilidad de la molécula de PNmc. Además, la molécula de PNmc de la presente invención puede incluir adicionalmente, por ejemplo, un residuo de no nucleótido, además del residuo de nucleótido.

El residuo de nucleótido es preferible como componente de cada una de las regiones (Xc), (X), (Y) y (Yc). Cada una de las regiones está compuesta, por ejemplo, por cualquiera de los siguientes residuos (1) a (3).

- (1) un residuo(s) de nucleótido(s) sin modificar
- (2) un residuo(s) de nucleótido(s) modificado(s)
- (3) un residuo(s) de nucleótido(s) sin modificar y un residuo(s) de nucleótido(s) modificado(s)

Los componentes de la región de ligador (Ly) no están particularmente limitados, y ejemplos de los mismos incluyen los residuos de nucleótidos y los residuos de no nucleótidos, como se ha descrito anteriormente. Cada una de las regiones de ligador puede estar compuesta del (de los) residuo(s) de nucleótido(s) solo, el (los) residuo(s) de no nucleótido(s) solo, o tanto el (los) residuo(s) de nucleótido(s) como el (los) residuo(s) de no nucleótido(s). Cada una de las regiones de ligador está compuesta, por ejemplo, por cualquiera de las siguientes residuos (1) a (7).

- (1) un residuo(s) de nucleótido(s) no modificado(s)
- (2) un residuo(s) de nucleótido(s) modificado(s)
- (3) un residuo(s) de nucleótido(s) no modificado(s) y un residuo(s) de nucleótido(s) modificado(s)
- (4) un residuo(s) de no nucleótido(s)
- (5) un residuo(s) de no nucleótido(s) y un residuo(s) de nucleótido(s) no modificado(s)
- (6) un residuo(s) de no nucleótido(s) y un residuo(s) de nucleótido(s) modificado(s)
- (7) un residuo(s) de no nucleótido(s), un residuo(s) de nucleótido(s) no modificado(s) y un residuo(s) de nucleótido(s) modificado(s)

La molécula de PNmc de la presente invención puede ser, por ejemplo: una molécula compuesta por los residuos de nucleótidos solos, excepto su región de ligador (Lx); una molécula que incluye el (los) residuo(s) de no nucleótido, además de los residuos de nucleótidos; o similares. En la molécula de PNmc de la presente invención, los residuos de nucleótidos pueden ser, por ejemplo, los residuos de nucleótidos sin modificar solos; los residuos de nucleótidos modificados solos; o tanto el (los) residuo(s) de nucleótido(s) sin modificar como el (los) residuo(s) de nucleótido(s) modificado(s), como se ha descrito anteriormente. Si la molécula de PNmc incluye tanto el (los) residuo(s) de nucleótido(s) sin modificar como el (los) residuo(s) de nucleótido(s) modificado(s), el número de residuo(s) de nucleótido(s) modificado(s) no está particularmente limitado, y es, por ejemplo, "uno o más", específicamente, por

ejemplo, 1 a 5, preferentemente 1 a 4, más preferentemente 1 a 3, y lo más preferentemente 1 o 2. Si la molécula de PNmc de la presente invención incluyen el (los) residuo(s) de no nucleótido, el número de residuo(s) de no nucleótido no está particularmente limitado, y es, por ejemplo, “uno o más”, específicamente, por ejemplo, 1 o 2.

5 En la molécula de PNmc de la presente invención, el residuo de nucleótido es preferentemente, por ejemplo, un residuo de ribonucleótido. En este caso, la molécula de PNmc de la presente invención también se denomina, por ejemplo, “molécula de ARN” o “molécula de ARNmc”. La molécula de ARNmc puede ser, por ejemplo: una molécula compuesta por los residuos de ribonucleótidos solos, excepto su región de ligador (Lx); una molécula que incluye el (los) residuo(s) de no nucleótido, además de los residuos de ribonucleótidos; o similares. Como se ha descrito
10 anteriormente, como los residuos de ribonucleótidos, la molécula de ARNmc puede incluir, por ejemplo: los residuos de ribonucleótidos sin modificar solos; residuos de ribonucleótidos modificados solos; o tanto el (los) residuo(s) de ribonucleótido(s) sin modificar como el (los) residuo(s) de ribonucleótido(s) modificado(s).

15 Si la molécula de ARNmc incluye el (los) residuo(s) de ribonucleótido(s) modificado(s), además del (de los) residuo(s) de ribonucleótido(s) sin modificar, por ejemplo, el número del (de los) residuo(s) de ribonucleótido(s) modificado(s) no está particularmente limitado, y es, por ejemplo, “uno o más”, específicamente, por ejemplo, 1 a 5, preferentemente 1 a 4, más preferentemente 1 a 3, y lo más preferentemente 1 o 2. Ejemplos del residuo de ribonucleótido modificado a diferencia del residuo de ribonucleótido sin modificar incluyen el residuo de desoxirribonucleótido obtenido sustituyendo un residuo de ribosa con un residuo de desoxirribosa. Si la molécula de
20 ARNmc incluye el (los) residuos(s) de desoxirribonucleótido(s), además del (de los) residuos(s) de desoxirribonucleótido(s) sin modificar, por ejemplo, el número de residuos(s) de desoxirribonucleótido(s) no está particularmente limitado, y es, por ejemplo, “uno o más”, específicamente, por ejemplo, 1 a 5, preferentemente 1 a 4, más preferentemente 1 a 3, y lo más preferentemente 1 o 2.

25 La molécula de PNmc de la presente invención puede incluir una sustancia de marcado (marcador), y puede marcarse, por ejemplo, con la sustancia de marcado. La sustancia de marcado no está particularmente limitada, y puede ser, por ejemplo, una sustancia fluorescente, un colorante, un isótopo o similares. Ejemplos de la sustancia fluorescente incluyen: fluoróforos tales como pireno, TAMRA, fluoresceína, un colorante Cy3 y un colorante Cy5. Ejemplos del colorante incluyen colorantes Alexa tales como Alexa 488. Ejemplos de isótopo incluyen isótopos
30 estables y radioisótopos. Entre ellos se prefieren los isótopos estables. Los isótopos estables tienen un bajo riesgo de exposición a radiación y no requieren, por ejemplo, instalaciones dedicadas. Así, los isótopos estables son excelentes en manipulabilidad y pueden contribuir a una reducción del coste. Además, un isótopo estable no cambia, por ejemplo, las propiedades físicas de un compuesto marcado con el mismo, y así tiene una excelente propiedad como trazador. El isótopo estable no está particularmente limitado, y ejemplos de los mismos incluyen ^2H , ^{13}C , ^{15}N ,
35 ^{17}O , ^{18}O , ^{33}S , ^{34}S y ^{36}S .

En la molécula de PNmc de la presente invención, como se ha descrito anteriormente, es preferible introducir la sustancia de marcado en la estructura de no nucleótido, más preferentemente, por ejemplo, al (a los) residuo(s) de no nucleótido en la región de ligador (Lx). La introducción de la sustancia de marcado, por ejemplo, al (a los)
40 residuo(s) de no nucleótido puede llevarse a cabo fácilmente y a bajo coste.

Como se ha descrito anteriormente, la molécula de PNmc de la presente invención puede inhibir la expresión de un gen diana. Así, la molécula de PNmc de la presente invención puede usarse, por ejemplo, como agente terapéutico para tratar una enfermedad producida por un gen. Según la molécula de PNmc que incluye, por ejemplo, como
45 secuencia inhibidora de la expresión, una secuencia que inhibe la expresión de un gen que causa la enfermedad, es posible tratar la enfermedad inhibiendo la expresión del gen diana. En la presente invención, el término “tratamiento” engloba, por ejemplo: prevención de enfermedades; mejora de enfermedades; y mejora en el pronóstico, y puede significar cualquiera de ellas.

50 El procedimiento de uso de la molécula de PNmc de la presente invención no está particularmente limitado. Por ejemplo, la molécula de PNmc puede administrarse a un sujeto que tiene el gen diana.

Ejemplos del sujeto al que se administra la molécula de PNmc de la presente invención incluye células, tejidos y órganos. Ejemplos del sujeto también incluyen seres humanos y animales no humanos tales como mamíferos no
55 humanos, es decir, mamíferos excluyendo seres humanos. La administración puede realizarse, por ejemplo, *in vivo* o *in vitro*. Las células no están particularmente limitadas, y ejemplos de las mismas incluyen: diversas células cultivadas tales como células HeLa, células 293, células NIH3T3 y células COS; citoblastos tales como células ES y citoblastos hematopoyéticos; y células aisladas de organismos vivos, tales como células cultivadas primarias.

60 En la presente invención, el gen diana cuya expresión va a inhibirse no está particularmente limitado, y cualquier gen deseado puede fijarse como gen diana. La secuencia inhibidora de la expresión puede diseñarse según convenga dependiendo del tipo de gen diana.

65 Ejemplos específicos de la molécula de PNmc de la presente invención se facilitarán más adelante. Debe observarse, sin embargo, que la presente invención no se limita en absoluto a éstos. Ejemplos de la secuencia de bases de la molécula de PNmc incluyen: secuencias de bases de SEC ID N°: 11, 14 a 17, y 23; y secuencias de

bases obtenidas por, por ejemplo, delección, sustitución y/o adición de una o más bases en estas secuencias de bases. Si el gen diana es el gen GAPDH, ejemplos de la secuencia de bases de la molécula de PNmc incluyen las secuencias de bases de SEC ID N°: 11. Si el gen diana es TGF-β1, ejemplos de la secuencia de bases de la molécula de PNmc incluyen las secuencias de bases de SEC ID N°: 14 a 17 y 23.

5 En cuanto al uso de la molécula de PNmc de la presente invención pueden citarse las siguientes descripciones con respecto a la composición, el procedimiento inhibitor, el procedimiento de tratamiento, y similares.

10 Como la molécula de PNmc de la presente invención puede inhibir la expresión de un gen diana como se ha descrito anteriormente, es útil como un producto farmacéutico, un agente de diagnóstico, un producto químico agrícola y una herramienta para realizar investigación, por ejemplo, de productos químicos agrícolas, medicina, ciencias de la vida, y similares.

15 En la presente invención, el término “alquilo” engloba, por ejemplo, grupos alquilo de cadena lineal y ramificada. El número de átomos de carbono en el alquilo no está particularmente limitado, y es, por ejemplo, 1 a 30, preferentemente 1 a 6 o 1 a 4. Ejemplos de grupo alquilo incluyen: metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, isohexilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo y n-decilo. Entre ellos se prefieren, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, isohexilo, y similares.

20 En la presente invención, el término “alqueno” engloba, por ejemplo, alquenos de cadena lineal y ramificada. Ejemplos de alqueno incluyen los alquenos anteriormente descritos que tienen uno o más dobles enlaces. El número de átomos de carbono en el alqueno no está particularmente limitado, y es, por ejemplo, el mismo que en el alquilo, preferentemente 2 a 8. Ejemplos de alqueno incluyen vinilo, 1-propeno, 2-propeno, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 1,3-butadieno y 3-metil-2-butenilo.

25 En la presente invención, el término “alquino” engloba, por ejemplo, alquinos de cadena lineal y ramificada. Ejemplos de alquino incluyen los alquinos anteriormente descritos que tienen uno o más triples enlaces. El número de átomos de carbono en el alquino no está particularmente limitado, y es, por ejemplo, el mismo que en alquilo, preferentemente 2 a 8. Ejemplos de alquino incluyen etino, propino y butino. El alquino puede incluir adicionalmente, por ejemplo, uno o más dobles enlaces.

30 En la presente invención, el término “arilo” engloba, por ejemplo, grupos de hidrocarburo aromático monocíclico y grupos de hidrocarburo aromático policíclico. Ejemplos del grupo de hidrocarburo aromático monocíclico incluyen fenilo. Ejemplos del grupo de hidrocarburo aromático policíclico incluyen 1-naftilo, 2-naftilo, 1-antrilo, 2-antrilo, 9-antrilo, 1-fenantrilo, 2-fenantrilo, 3-fenantrilo, 4-fenantrilo y 9-fenantrilo. Entre ellos se prefieren, por ejemplo, fenilo, naftilos tales como 1-naftilo y 2-naftilo, y similares.

35 En la presente invención, el término “heteroarilo” engloba, por ejemplo, grupos heterocíclicos aromáticos monocíclicos y grupos heterocíclicos aromáticos condensados. Ejemplos de heteroarilo incluyen furilos (por ejemplo: 2-furilo, 3-furilo), tienilos (por ejemplo: 2-tienilo, 3-tienilo), pirrolilos (por ejemplo: 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo), imidazolilos (por ejemplo: 1-imidazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo), pirazolilos (por ejemplo: 1-pirazolilo, 3-pirazolilo, 4-pirazolilo), triazolilos (por ejemplo: 1,2,4-triazol-1-ilo, 1,2,4-triazol-3-ilo, 1,2,4-triazol-4-ilo), tetrazolilos (por ejemplo: 1-tetrazolilo, 2-tetrazolilo, 5-tetrazolilo), oxazolilos (por ejemplo: 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 5-oxazolilo), isoxazolilos (por ejemplo: 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo), tiazolilos (por ejemplo: 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo), tiadiazolilos, isotiazolilos (por ejemplo: 3-isotiazolilo, 4-isotiazolilo, 5-isotiazolilo), piridilos (por ejemplo: 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo), piridazinilos (por ejemplo: 3-piridazinilo, 4-piridazinilo), pirimidinilos (por ejemplo: 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo), furazanilos (por ejemplo: 3-furazanilo), pirazinilos (por ejemplo: 2-pirazinilo), oxadiazolilos (por ejemplo: 1,3,4-oxadiazol-2-ilo), benzofurilos (por ejemplo: 2-benzo[b]furilo, 3-benzo[b]furilo, 4-benzo[b]furilo, 5-benzo[b]furilo, 6-benzo[b]furilo, 7-benzo[b]furilo), benzotienilos (por ejemplo: 2-benzo[b]tienilo, 3-benzo[b]tienilo, 4-benzo[b]tienilo, 5-benzo[b]tienilo, 6-benzo[b]tienilo, 7-benzo[b]tienilo), bencimidazolilos (por ejemplo: 1-bencimidazolilo, 2-bencimidazolilo, 4-bencimidazolilo, 5-bencimidazolilo), dibenzofurilos, benzoxazolilos, benzotiazolilos, quinoxalilos (por ejemplo: 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 6-quinoxalinilo), cinolinilos (por ejemplo: 3-cinolinilo, 4-cinolinilo, 5-cinolinilo, 6-cinolinilo, 7-cinolinilo, 8-cinolinilo), quinazolilos (por ejemplo: 2-quinazolinilo, 4-quinazolinilo, 5-quinazolinilo, 6-quinazolinilo, 7-quinazolinilo, 8-quinazolinilo), quinolilos (por ejemplo: 2-quinolilo, 3-quinolilo, 4-quinolilo, 5-quinolilo, 6-quinolilo, 7-quinolilo, 8-quinolilo), ftalazinilos (por ejemplo: 1-ftalazinilo, 5-ftalazinilo, 6-ftalazinilo), isoquinolilos (por ejemplo: 1-isoquinolilo, 3-isoquinolilo, 4-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 6-isoquinolilo, 7-isoquinolilo, 8-isoquinolilo), purilos, pteridinilos (por ejemplo: 2-pteridinilo, 4-pteridinilo, 6-pteridinilo, 7-pteridinilo), carbazolilos, fenantridinilos, acridinilos (por ejemplo: 1-acridinilo, 2-acridinilo, 3-acridinilo, 4-acridinilo, 9-acridinilo), indolilos (por ejemplo: 1-indolilo, 2-indolilo, 3-indolilo, 4-indolilo, 5-indolilo, 6-indolilo, 7-indolilo), isoindolilos, fenazinilos (por ejemplo: 1-fenazinilo, 2-fenazinilo) y fenotiazinilos (por ejemplo: 1-fenotiazinilo, 2-fenotiazinilo, 3-fenotiazinilo, 4-fenotiazinilo).

65 En la presente invención, el término “cicloalquilo” se refiere, por ejemplo, a grupos de hidrocarburo saturado cíclico, y el número de átomos de carbono en el cicloalquilo es, por ejemplo, 3 a 15. Ejemplos del cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, grupos de hidrocarburos cíclicos unidos por

puentes y grupos de espirohidrocarburo. Entre ellos se prefieren ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, hidrocarburos cíclicos unidos por puentes, y similares.

5 En la presente invención, ejemplos de los “grupos de hidrocarburos cíclicos unidos por puentes” incluyen biciclo[2.1.0]pentilo, biciclo[2.2.1]heptilo, biciclo[2.2.2]octilo y biciclo[3.2.1]octilo, triciclo[2.2.1.0]heptilo, biciclo[3.3.1]nonano, 1-adamantilo y 2-adamantilo.

En la presente invención, ejemplos de los “grupos de espirohidrocarburo” incluyen espiro[3.4]octilo.

10 En la presente invención, el término “cicloalqueno” engloba, por ejemplo, grupos de hidrocarburo alifático cíclico insaturado, y el número de átomos de carbono en el cicloalqueno es, por ejemplo, 3 a 7. Ejemplos del grupo cicloalqueno incluyen ciclopropeno, ciclobuteno, ciclopenteno, ciclohexeno y ciclohepteno. Entre ellos se prefieren ciclopropeno, ciclobuteno, ciclopenteno, ciclohexeno, y similares. El término “cicloalqueno” también engloba grupos de hidrocarburos cíclicos unidos por puentes y grupos de espirohidrocarburo que tienen, por
15 ejemplo, un enlace insaturado en sus anillos.

En la presente invención, ejemplos de “arilalquilo” incluyen bencilo, 2-fenetilo y naftalenilmetilo. Ejemplos del “cicloalquilalquilo” y “ciclilalquilo” incluyen ciclohexilmetilo y adamantilmetilo. Ejemplos de “hidroxialquilo” incluyen hidroximetilo y 2-hidroxietilo.
20

En la presente invención, “alcoxi” engloba, por ejemplo, grupos compuestos de cualquiera de los alquilos anteriormente descritos y oxígeno (grupos alquil-O) y ejemplos de los mismos incluyen metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi y n-butoxi. Ejemplos de “alcoxialquilo” incluyen metoximetilo. Ejemplos de “aminoalquilo” incluyen 2-aminoetilo.
25

En la presente invención, ejemplos de “heterociclilo” incluyen 1-pirrolinilo, 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, 1-pirrolidinilo, 2-pirrolidinilo, 3-pirrolidinilo, pirrolidinona, 1-imidazolino, 2-imidazolino, 4-imidazolino, 1-imidazolidinilo, 2-imidazolidinilo, 4-imidazolidinilo, imidazolidinona, 1-pirazolinilo, 3-pirazolinilo, 4-pirazolinilo, 1-pirazolidinilo, 3-pirazolidinilo, 4-pirazolidinilo, piperidinona, piperidino, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-piperidinilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo, piperazinona, 2-morfolinilo, 3-morfolinilo, morfolino, tetrahidropiranilo y tetrahidrofuranilo.
30

En la presente invención, ejemplos de “heterociclilalquilo” incluyen piperidinilmetilo y piperazinilmetilo. Ejemplos de “heterociclilalqueno” incluyen 2-piperidiniletieno. Ejemplos de “heteroarilalquilo” incluyen piridilmetilo y quinolin-3-ilmetilo.
35

En la presente invención, el término “sililo” engloba grupos representados por la fórmula R_3Si- en la que R puede seleccionarse independientemente de los alquilos, arilos y cicloalquilos anteriormente descritos. Ejemplos de sililo incluyen un grupo trimetilsililo y un grupo terc-butildimetilsililo. Ejemplos de “sililoxi” incluyen un grupo trimetilsililoxi. Ejemplos de “sililoxialquilo” incluyen trimetilsililoximetilo.
40

En la presente invención, ejemplos de “alqueno” incluyen metileno, etileno y propileno.

En la presente invención, los diversos grupos anteriormente descritos pueden estar sustituidos. Ejemplos del sustituyente incluyen hidroxilo, carboxilo, halógenos, haluros de alquilo (por ejemplo: CF_3 , CH_2CF_3 , CH_2CCl_3), nitro, nitroso, ciano, alquilos (por ejemplo: metilo, etilo, isopropilo, terc-butilo), alquenos (por ejemplo: vinilo), alquinos (por ejemplo: etinilo), cicloalquilos (por ejemplo: ciclopropilo, adamantilo), cicloalquilalquilos (por ejemplo: ciclohexilmetilo, adamantilmetilo), cicloalquenos (por ejemplo: ciclopropeno), arilos (por ejemplo: fenilo, naftilo), arilalquilos (por ejemplo: bencilo, fenetilo), heteroarilos (por ejemplo: piridilo, furilo), heteroarilalquilos (por ejemplo: piridilmetilo), heterociclilos (por ejemplo: piperidilo), heterociclilalquilos (por ejemplo: morfolilmetilo), alcoxis (por ejemplo: metoxi, etoxi, propoxi, butoxi), alcoxis halogenados (por ejemplo: OCF_3), alquinoxis (por ejemplo: viniloxi, aliloxi), ariloxis (por ejemplo: feniloxi), alquiloxicarbonilos (por ejemplo: metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, terc-butoxicarbonilo), arilalquinoxis (por ejemplo: benciloxi), aminos [alquilaminos (por ejemplo: metilamino, etilamino, dimetilamino), acilaminos (por ejemplo: acetilamino, benzoilamino), arilalquilaminos (por ejemplo: bencilamino, tritilamino), hidroxiaminol, alquilaminoalquilos (por ejemplo: dietilaminometilo), sulfamoilo y oxo.
50
55

2. Residuo de nucleótido

El residuo de nucleótido incluye, como sus componentes, un azúcar, una base y un fosfato. El residuo de nucleótido puede ser, por ejemplo, un residuo de ribonucleótido o un residuo de desoxirribonucleótido, como se ha descrito
60 anteriormente. El residuo de ribonucleótido tiene, por ejemplo: un residuo de ribosa como azúcar; y adenina (A), guanina (G), citosina (C) o uracilo (U) como base. El residuo de desoxirribosa tiene, por ejemplo: un residuo de desoxirribosa como azúcar; y adenina (A), guanina (G), citosina (C) o timina (T) como base.

El residuo de nucleótido puede ser, por ejemplo, un residuo de nucleótido sin modificar o un residuo de nucleótido modificado. Los componentes del residuo de nucleótido sin modificar son, por ejemplo, los mismos o sustancialmente los mismos que los componentes de un residuo de nucleótido que se produce naturalmente.
65

Preferentemente, los componentes son los mismos o sustancialmente los mismos que los componentes de un residuo de nucleótido que se produce naturalmente en un cuerpo humano.

5 El residuo de nucleótido modificado es un residuo de nucleótido obtenido, por ejemplo, modificando el residuo de nucleótido sin modificar. El nucleótido modificado puede ser, por ejemplo, de forma que cualquiera de los componentes del residuo de nucleótido sin modificar se modifique. En la presente invención, "modificación" significa, por ejemplo: sustitución, adición y/o deleción de cualquiera de los componentes; y sustitución, adición y/o deleción de un átomo(s) y/o un grupo(s) funcional(es) en el (los) componente(s). También puede denominarse "alteración". Ejemplos del residuo de nucleótido modificado incluyen residuos de nucleótidos que se producen naturalmente y

10 residuos de nucleótidos artificialmente modificados. Con respecto a los residuos de nucleótidos modificados naturalmente derivados puede citarse, por ejemplo, Limbach y col. (1994, Summary: the modified nucleosides of RNA, *Nucleic Acids Res.* 22: pág. 2183 a 2196). El residuo de nucleótido modificado puede ser un residuo, por ejemplo, de una alternativa del nucleótido.

15 Ejemplos de la modificación del residuo de nucleótido incluyen modificación de un esqueleto de fosfato de ribosa (denominado en lo sucesivo un "esqueleto de ribofosfato").

En el esqueleto de ribofosfato, por ejemplo, un residuo de ribosa puede modificarse. En el residuo de ribosa, por ejemplo, el carbono en la posición 2' puede modificarse. Específicamente, un grupo hidroxilo unido al carbono en la

20 posición 2' puede sustituirse, por ejemplo, con hidrógeno, flúor o similares. Sustituyendo el grupo hidroxilo unido al carbono en la posición 2' con hidrógeno es posible sustituir el residuo de ribosa con desoxirribosa. El residuo de ribosa puede sustituirse, por ejemplo, con su estereoisómero, y puede sustituirse, por ejemplo, con un residuo de arabinosa.

25 El esqueleto de ribofosfato puede sustituirse, por ejemplo, con un esqueleto de no ribofosfato que tiene un residuo de no ribosa y/o uno de no fosfato. El esqueleto de no ribofosfato puede ser, por ejemplo, el esqueleto de ribofosfato modificado de manera que esté sin cargar, o similares. Ejemplos de una alternativa obtenida sustituyendo el esqueleto de ribofosfato con el esqueleto de no ribofosfato en el nucleótido incluyen morfolino, ciclobutilo y pirrolidina. Otros ejemplos de la alternativa incluyen residuos de monómeros de ácidos nucleicos artificiales.

30 Ejemplos específicos de los mismos incluyen PNA (ácido nucleico peptídico), LNA (ácido nucleico bloqueado) y ENA (ácidos nucleicos unidos por 2'-O,4'-C-etileno). Entre ellos es preferible PNA.

En el esqueleto de ribofosfato, por ejemplo, un grupo fosfato puede modificarse. En el esqueleto de ribofosfato, un grupo fosfato en la proximidad más estrecha al residuo de azúcar se llama un "grupo α -fosfato". El grupo α -fosfato se carga negativamente, y las cargas eléctricas se distribuyen uniformemente sobre dos átomos de oxígeno que no están ligados al residuo de azúcar. Entre los cuatro átomos de oxígeno en el grupo α -fosfato, los dos átomos de oxígeno no ligados al residuo de azúcar en el enlace fosfodiéster entre los residuos de nucleótidos se denominan en lo sucesivo "oxígenos de no enlace". Por otra parte, dos átomos de oxígeno que están ligados al residuo de azúcar en el enlace fosfodiéster entre los residuos de nucleótidos se denominan en lo sucesivo "oxígenos de enlace". El

35 grupo α -fosfato se modifica preferentemente, por ejemplo, de manera que esté sin cargar, o de manera que se haga asimétrica la distribución de carga entre los átomos de no enlace.

En el grupo fosfato, por ejemplo, el (los) oxígeno(s) de no enlace puede(n) estar sustituido(s). El (Los) oxígeno(s) puede(n) sustituirse, por ejemplo, con cualquier átomo seleccionado de S (azufre), Se (selenio), B (boro), C (carbono), H (hidrógeno), N (nitrógeno) y OR (R es, por ejemplo, un grupo alquilo o un grupo arilo), y la sustitución con S es preferible. Es preferible, por ejemplo, que ambos oxígenos de no enlace estén sustituidos, y es más preferible que ambos oxígenos de no enlace estén sustituidos con S. Ejemplos del grupo fosfato así modificado incluyen fosforotioatos, fosforoditioatos, fosforoselenatos, boranofosfatos, ésteres de boranofosfato, hidrogenofosfonatos, fosforoamidatos, fosfonatos de alquilo o arilo, y fosfotriésteres. En particular es preferible

45 fosforoditioato en el que ambos de los dos oxígenos de no enlace están sustituidos con S.

En el grupo fosfato, por ejemplo, el (los) oxígeno(s) de enlace puede(n) estar sustituido(s). El (Los) oxígeno(s) puede(n) sustituirse, por ejemplo, con cualquier átomo seleccionado de S (azufre), C (carbono) y N (nitrógeno). Ejemplos del grupo fosfato así modificado incluyen: fosforoamidatos unidos con puentes resultantes de la sustitución con N; fosforotioatos unidos con puentes resultantes de la sustitución S; y metilfosfonatos unidos con puentes resultantes de la sustitución C. Preferentemente, la sustitución del (de los) oxígeno(s) de enlace se realiza, por ejemplo, en al menos un residuo de nucleótido del extremo 5' y el residuo de nucleótido del extremo 3' de la molécula de PNmc de la presente invención. Si la sustitución se realiza en el lado 5', la sustitución con C es preferible. Si la sustitución se realiza en el lado 3', la sustitución con N es preferible.

50

55

60

El grupo fosfato puede sustituirse, por ejemplo, con el ligador libre de fosfato. El ligador puede contener siloxano, carbonato, carboximetilo, carbamato, amida, tioéter, ligador de óxido de etileno, sulfonato, sulfonamida, tioformacetal, formacetal, oxima, metilenimino, metilmetilimino, metilenhidrazo, metilendimetilhidrazo, metilenoximetilimino o similares. Preferentemente, el ligador puede contener un grupo metilencarbonilamino y un

65 grupo metilencarbonilamino.

En la molécula de PNmc de la presente invención puede modificarse, por ejemplo, al menos uno de un residuo de nucleótido en el extremo 3' y un residuo de nucleótido en el extremo 5'. El residuo de nucleótido en uno cualquiera del extremo 3' y el extremo 5' puede modificarse, o, por ejemplo, los residuos de nucleótidos en tanto el extremo 3' como el extremo 5' pueden modificarse. La modificación puede ser, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente y es preferible modificar un grupo(s) fosfato en el (los) extremo(s). El grupo fosfato entero puede modificarse, o, por ejemplo, uno o más átomos en el grupo fosfato pueden modificarse. En el primer caso, por ejemplo, el grupo fosfato entero puede sustituirse o deleccionarse.

La modificación del (de los) residuo(s) de nucleótido(s) en el (los) extremo(s) puede ser, por ejemplo, adición de cualquier otra molécula, o similares. Ejemplos de la otra molécula incluyen moléculas funcionales tales como sustancias de marcado como se han descrito anteriormente y grupos protectores. Ejemplos de los grupos protectores incluyen S (azufre), Si (silicio), B (boro) y grupos que contienen éster. Las moléculas funcionales tales como las sustancias de marcado pueden usarse, por ejemplo, en la detección y similares de la molécula de PNmc de la presente invención.

La otra molécula puede añadirse al grupo fosfato del residuo de nucleótido o puede añadirse al grupo fosfato o el residuo de azúcar mediante, por ejemplo, un espaciador. El átomo terminal del espaciador puede añadirse a o sustituirse, por ejemplo, con uno cualquiera de los oxígenos de enlace del grupo fosfato u O, N, S o C del residuo de azúcar. El sitio de unión en el residuo de azúcar es preferentemente, por ejemplo, C en la posición 3', C en la posición 5', o cualquier átomo unido al mismo. El espaciador también puede añadirse a o sustituirse, por ejemplo, con un átomo terminal de la alternativa de nucleótido tal como PNA.

El espaciador no está particularmente limitado, y ejemplos del mismo incluyen $-(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nN-$, $-(CH_2)_nO-$, $-(CH_2)_nS-$, $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OH$, azúcares abásicos, amida, carboxi, amina, oxiamina, oxiimina, tioéter, disulfuro, tiourea, sulfonamida y morfolino, y también reactivos de biotina y reactivos de fluoresceína. En las fórmulas anteriores, n es un número entero positivo, y es preferible $n = 3$ o 6.

Otros ejemplos de la molécula que va a añadirse al extremo incluyen colorantes, agentes intercalantes (por ejemplo, acridinas), agentes de reticulación (por ejemplo, psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, sapfirina), hidrocarburos aromáticos policíclicos (por ejemplo, fenazina, dihidrofenazina), endonucleasas artificiales (por ejemplo, EDTA), vehículos lipófilos (por ejemplo, colesterol, ácido cólico, ácido adamantanoacético, ácido 1-pirenobutírico, dihidrotestosterona, 1,3-Bis-O (hexadecil)glicerol, un grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, un grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litolcóico, ácido O3-(oleoil)cóico, dimetoxitritilo o fenoxazina), complejos de péptidos (por ejemplo, péptido de Antennapedia, péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (por ejemplo, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radiomarcados, enzimas (por ejemplo, biotina), facilitadores del transporte/absorción (por ejemplo, aspirina, vitamina E, ácido fólico) y ribonucleasas sintéticas (por ejemplo, imidazol, bisimidazol, histamina, agrupaciones de imidazol, complejos de acridina-imidazol, complejos de Eu^{3+} de tetraazamacrociclos).

En la molécula de PNmc de la presente invención, el extremo 5' puede modificarse, por ejemplo, con un grupo fosfato o un análogo de grupo fosfato. Ejemplos del grupo fosfato incluyen:

5'-monofosfato ((HO)₂(O)P-O-5');

5'-difosfato ((HO)₂(O)P-O-P(HO)(O)-O-5');

5'-trifosfato (HO)₂(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5');

tapa de 5'-guanosina (metilada en 7 o sin metilar, 7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5');

tapa de 5'-adenosina (A_{ppp});

cualquier estructura de tapa de nucleótido modificado o sin modificar (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5');

5'-monotiofosfato (fosfortioato: (HO)₂(S)P-O-5');

5'-monoditiofosfato (fosforditioato: (HO)(HS)(S)P-O-5');

5'-fosfortiolato ((HO)₂(O)P-S-5');

monofosfato, difosfato y trifosfatos sustituidos con azufre (por ejemplo, 5'-α-tiotrifosfato, 5'-γ-tiotrifosfato, y similares);

5'-fosforamidatos ((HO)₂(O)P-NH-5', (HO)(NH₂)(O)P-O-5');

5'-alquifosfonatos (por ejemplo, RP(OH)(O)-O-5', (OH)₂(O)P-5'-CH₂ en la que R es alquilo (por ejemplo, metilo, etilo, isopropilo, propilo o similares)); y

5'-alquiléterfosfonatos (por ejemplo, RP(OH)(O)-O-5' en la que R es alquiléter (por ejemplo, metoximetilo, etoximetilo o similares)).

En el residuo de nucleótido, la base no está particularmente limitada. La base puede ser, por ejemplo, una base natural o una base no natural. La base puede ser, por ejemplo, una base naturalmente derivada o una base sintética. Como base puede usarse, por ejemplo, una base común (universal), un análogo modificado de la misma, y similares.

Ejemplos de base incluyen: bases de purina tales como adenina y guanina; y bases de pirimidina tales como citosina, uracilo y timina. Otros ejemplos de base incluyen inosina, timina, xantina, hipoxantina, nubularina, isoguanisina y tubercidina. Ejemplos de base también incluyen: derivados de alquilo tales como 2-aminoadenina, purina 6-metilada y purina 2-propilada; 5-halouracilo y 5-halocitosina; 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina; 6-azouracilo, 6-azocitosina y 6-azotimina; 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 5-halouracilo, 5-(2-aminopropil)uracilo, 5-aminoaliluracilo; purinas 8-halogenadas, aminadas, tioladas, tioalquiladas, hidroxiladas y otras 8-sustituidas; pirimidinas 5-trifluorometiladas y otras 5-sustituidas; 7-metilguanina; pirimidinas 5-sustituidas; 6-azapirimidinas; purinas N-2, N-6 y O-6-sustituidas (incluyendo 2-aminopropiladenina); 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina; dihidrouracilo; 3-deaza-5-azacitosina; 2-aminopurina; 5-alquiluracilo; 7-alquilguanina; 5-alquilocitosina; 7-deazaadenina; N6,N6-dimetiladenina; 2,6-diaminopurina; 5-amino-alil-uracilo; N3-metiluracilo; 1,2,4-triazoles sustituidos; 2-piridinona; 5-nitroindol; 3-nitropirrol; 5-metoxiuracilo; ácido uracil-5-oxiacético; 5-metoxycarbonilmetiluracilo; 5-metil-2-tiouracilo; 5-metoxycarbonilmetil-2-tiouracilo; 5-metilaminometil-2-tiouracilo; S-(S-amino-3-carboxipropil)uracilo; S-metilcitosina; 5-metilcitosina; N4-acetilcitosina; 2-tiocitosina; N6-metiladenina; N6-isopentiladenina; 2-metiltio-N6-isopenteniladenina; N-metilguanina; y bases O-alquiladas. Ejemplos de purinas y pirimidinas incluyen las divulgadas en la patente de EE.UU. N° 3.687.808, "Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering", pág. 858 a 859, editado por Kroschwitz J. I, John Wiley & Sons, 1990, y Englisch y col., Angewandte Chemie, edición internacional, 1991, vol. 30, pág. 613.

Otros ejemplos del residuo de nucleótido modificado incluyen aquellos que no tienen bases, es decir, aquellos que tienen un esqueleto de ribofosfato abásico. Además, como residuos de nucleótidos modificados pueden usarse, por ejemplo, aquellos descritos en la solicitud internacional WO 2004/080406 (fecha de presentación: 8 de marzo de 2004).

3. Procedimiento de síntesis de molécula de PNmc de la presente invención El procedimiento para sintetizar la molécula de PNmc de la presente invención no está particularmente limitado, y puede emplearse un procedimiento convencionalmente conocido. Ejemplos del procedimiento incluyen procedimientos de síntesis según procedimientos de ingeniería genética y procedimientos de síntesis química. Ejemplos de los procedimientos de ingeniería genética incluyen: procedimientos de síntesis que utilizan transcripción *in vitro*; procedimientos usando un vector; y procedimientos llevados a cabo usando un casete de PCR. El vector no está particularmente limitado, y ejemplos de los mismos incluyen vectores de no virus tales como plásmido, y vectores de virus. Los ejemplos anteriormente descritos son únicamente ilustrativos, y el procedimiento de síntesis no se limita a éstos. Los procedimientos de síntesis química no están particularmente limitados, y ejemplos de los mismos incluyen un procedimiento de fosforamido y un procedimiento de H-fosfonato. Los procedimientos de síntesis química pueden llevarse a cabo usando, por ejemplo, un sintetizador de ácidos nucleicos automatizado comercialmente disponible. En los procedimientos de síntesis química generalmente se usa un amidito. El amidito no está particularmente limitado. Ejemplos de amiditos comercialmente disponibles incluyen fosforamiditos de ARN (2'-O-TBDMSi, marca registrada, Samchully Pharm. Co., Ltd.), amidito de ACE, amidito de TOM, amidito de CEE, amidito de CEM y amidito de TEM. En la síntesis de la molécula de PNmc de la presente invención es preferible, por ejemplo, usar el monómero de la presente invención que va a describirse más adelante para la síntesis de la(s) región (regiones) de ligador representada(s) por la fórmula (I).

4. Composición

La composición inhibidora según la presente invención es, como se ha descrito anteriormente, una composición para inhibir la expresión de un gen diana, que contiene la molécula de PNmc de la presente invención. La composición de la presente invención se caracteriza porque contiene la molécula de PNmc de la presente invención, y no está limitada en absoluto a otras configuraciones. La composición inhibidora de la presente invención también puede preferirse, por ejemplo, como reactivo inhibidor.

Es posible administrar la composición a un sujeto en el que el gen diana está presente para inhibir la expresión del gen diana.

Además, como se ha descrito anteriormente, la composición farmacéutica según la presente invención contiene la molécula de PNmc de la presente invención. La composición farmacéutica de la presente invención se caracteriza porque contiene la molécula de PNmc de la presente invención, y no está limitada en absoluto a otras configuraciones. La composición farmacéutica de la presente invención también puede denominarse, por ejemplo, un producto farmacéutico.

Es posible administrar la composición farmacéutica a un paciente con una enfermedad producida por un gen para inhibir la expresión del gen, tratando así la enfermedad. El término "tratamiento" engloba, por ejemplo: prevención de enfermedades; mejora de enfermedades; y mejora en el pronóstico, y puede significar cualquiera de ellas.

Una enfermedad que va a tratarse no está particularmente limitada, y ejemplos de las mismas incluyen enfermedades producidas por la expresión de genes. Dependiendo del tipo de enfermedad, un gen que produce la enfermedad puede fijarse como el gen diana, y además, dependiendo del gen diana, la secuencia inhibidora de la expresión puede fijarse según convenga.

Un ejemplo específico es el siguiente. Fijando el gen TGF- β 1 como gen diana e incorporando una secuencia inhibidora de la expresión para este gen en la molécula de PNmc, la molécula de PNmc puede usarse para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, por ejemplo, específicamente, lesión pulmonar aguda y similares.

- 5 El procedimiento de uso de la composición inhibidora y la composición farmacéutica (en lo sucesivo ambas composiciones se denominan simplemente "las composiciones") no está particularmente limitado, y ejemplos de los mismos incluyen administrar la molécula de PNmc a un sujeto que tiene el gen diana.

10 Ejemplos del sujeto al que la molécula de PNmc de la presente invención se administra incluyen células, tejidos y órganos. Ejemplos del sujeto también incluyen seres humanos y animales no humanos tales como mamíferos no humanos, es decir, mamíferos excluyendo seres humanos. La administración puede realizarse, por ejemplo, *in vivo* o *in vitro*. Las células no están particularmente limitadas, y ejemplos de las mismas incluyen: diversas células cultivadas tales como células HeLa, células 293, células NIH3T3 y células COS; citoblastos tales como células ES y citoblastos hematopoyéticos; y células aisladas de organismos vivos, tales como células cultivadas primarias.

15 El procedimiento de administración no está particularmente limitado, y puede determinarse según convenga, por ejemplo, dependiendo del sujeto. Si el sujeto es una célula cultivada, el procedimiento de administración puede ser, por ejemplo, un procedimiento usando un reactivo de transfección, un procedimiento de electroporación o similares. Si la administración se realiza *in vivo*, la administración puede ser, por ejemplo, tanto administración por vía oral como administración parenteral. Ejemplos de la administración parenteral incluyen administración subcutánea por inyección y administración local.

25 Cada una de las composiciones de la presente invención puede contener solo la molécula de PNmc de la presente invención o adicionalmente puede contener, por ejemplo, un aditivo(s), además de la molécula de PNmc. El aditivo no está particularmente limitado, y preferentemente es, por ejemplo, un aditivo farmacéuticamente aceptable. El tipo de aditivo no está particularmente limitado, y puede seleccionarse según convenga, por ejemplo, dependiendo del tipo de sujeto.

30 En la composición de la presente invención, el PNmc puede formar un complejo, por ejemplo, con el aditivo. El aditivo también puede denominarse, por ejemplo, un agente complejante. El complejo permite, por ejemplo, administrar la molécula de PNmc eficazmente. El enlace entre la molécula de PNmc y el agente complejante no está particularmente limitado, y ejemplos de los mismos incluyen enlace no covalente. El complejo puede ser, por ejemplo, un complejo de inclusión o similares.

35 El agente complejante no está particularmente limitado, y ejemplos del mismo incluyen polímeros, ciclodextrinas y adamantina. Ejemplos de ciclodextrinas incluyen copolímero de ciclodextrina lineal y copolímero de ciclodextrina oxidado lineal.

40 Otros ejemplos del aditivo incluyen un vehículo, una sustancia de unión que se une a una célula diana, un agente de condensación y un agente fusogénico.

45 El vehículo es preferentemente un polímero, por ejemplo, más preferentemente un biopolímero. Preferentemente, el vehículo es, por ejemplo, biodegradable. Ejemplos del vehículo incluyen: proteínas tales como albúmina de suero humano (HSA), lipoproteína de baja densidad (LDL) y globulina; hidratos de carbono tales como, por ejemplo, dextrano, pululano, quitina, quitosano, inulina, ciclodextrina y ácido hialurónico; y lípidos. Como vehículo también puede usarse, por ejemplo, un polímero sintético tal como un poliaminoácido sintético. Ejemplos del poliaminoácido incluyen polilisina (PLL), ácido poli-L-aspártico, ácido poli-L-glutámico, copolímero de estireno-anhídrido maleico, copolímero de poli(L-lactida-co-glicolida), copolímero de éter divinílico-anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímero de N-isopropilacrilamida y polifosfazina.

50 Ejemplos de la sustancia de unión incluyen hormona estimulante de la tiroides, hormona estimulante de melanocitos, lectina, glucoproteínas, proteína A tensioactiva, hidrato de carbono de mucina, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, manosa multivalente, fucosa multivalente, poliaminoácido glucosilado, galactosa multivalente, transferrina, bisfosfonato, ácido poliglutámico, ácido poliaspártico, lípidos, colesterol, esteroides, ácido biliar, folato, vitamina B12, biotina, neproxina, péptido RGD y mimético del péptido RGD.

60 Ejemplos del agente fusogénico y el agente de condensación incluyen cadenas de poliamino tales como polietilenimina (PEI). La PEI puede ser tanto lineal como ramificada y, por tanto, puede ser, por ejemplo, tanto sintética como que producirse naturalmente. La PEI puede sustituirse, por ejemplo, con un alquilo o un lípido. Como agente fusogénico también es posible usar, por ejemplo, polihistidina, poliimidazol, polipiridina, polipropilenimina, melitina, una sustancia de poliactal (por ejemplo, poliactal catiónico o similares), o similares. El agente fusogénico puede tener, por ejemplo, una estructura de hélice α . El agente fusogénico puede ser una agente de rotura de membranas tal como, por ejemplo, melitina.

65

En cuanto a las composiciones según la presente invención, por ejemplo, la formación del complejo y similares se describen en la patente de EE.UU. N° 6.509.323, la publicación de patente de EE.UU. N° 2003/0008818 y el documento WO 2004/080406.

5 Otros ejemplos del aditivo incluyen moléculas anfífilas. La molécula anfífila es una molécula que tiene, por ejemplo, una región hidrófoba y una región hidrófila. La molécula es preferentemente, por ejemplo, un polímero. El polímero puede tener, por ejemplo, una estructura secundaria, preferentemente una estructura secundaria de repetición. Específicamente, el polipéptido es preferible, y, por ejemplo, el polipéptido de hélice α y similares son más preferibles.

10 El polímero anfílico puede ser, por ejemplo, un polímero que tiene dos o más subunidades anfílicas. Ejemplos de la subunidad incluyen subunidades con una estructura cíclica que tiene al menos un grupo hidrófilo y un grupo hidrófobo. La subunidad puede contener, por ejemplo, esteroide, tal como ácido cólico, una estructura aromática y similares. El polímero puede contener, por ejemplo, tanto una subunidad de estructura cíclica, tal como una subunidad aromática, como un aminoácido.

5. Procedimiento inhibidor

20 La expresión de un gen diana puede inhibirse si se usa la molécula de PNmc de la presente invención. El procedimiento de efectuar tal inhibición se caracteriza porque la molécula de PNmc de la presente invención se usa en este respecto, y en absoluto están limitadas otras etapas y condiciones.

25 El mecanismo por el que la expresión génica se inhibe no está particularmente limitado, y ejemplos del mismo incluyen inhibición de la expresión por interferencia por ARN. El procedimiento inhibidor es, por ejemplo, un procedimiento para inducir la interferencia por ARN que inhibe la expresión de un gen diana, y también puede denominarse un procedimiento inhibidor que se caracteriza porque la molécula de PNmc de la presente invención se usa en este respecto.

30 El procedimiento inhibidor incluye la etapa de administrar la molécula de PNmc a un sujeto en el que está presente, por ejemplo, el gen diana. Por la etapa de administración, la molécula de PNmc se pone en contacto, por ejemplo, con el sujeto al que se administra la molécula de PNmc. Según el procedimiento *in vitro* de la invención, la molécula de PNmc se administra a células, tejidos y órganos. Ejemplos del sujeto también incluyen seres humanos y animales no humanos tales como mamíferos no humanos, es decir, mamíferos excluyendo seres humanos. La administración puede realizarse, por ejemplo, *in vivo* o *in vitro*.

35 En el procedimiento inhibidor, la molécula de PNmc puede administrarse sola, o, por ejemplo, puede administrarse la composición de la presente invención que contiene la molécula de PNmc. El procedimiento de administración no está particularmente limitado, y puede seleccionarse según convenga dependiendo, por ejemplo, del tipo de sujeto.

40 6. Procedimiento de tratamiento

45 Una enfermedad puede tratarse mediante un procedimiento que incluye la etapa de administrar la molécula de PNmc de la presente invención a un paciente, y la molécula de PNmc incluye, como secuencia inhibidora de la expresión, una secuencia que inhibe la expresión de un gen que causa la enfermedad. El procedimiento de tratamiento se caracteriza porque la molécula de PNmc de la presente invención se usa en este respecto, y en absoluto están limitadas otras etapas y condiciones. La descripción con respecto al procedimiento inhibidor también se aplica, por ejemplo, al procedimiento de tratamiento.

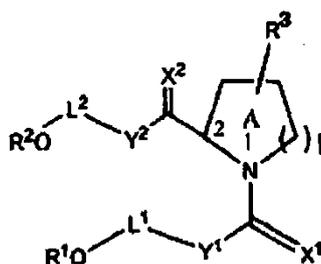
50 7. Uso de la molécula de PNmc

La molécula de PNmc de la presente invención se usa para inhibir la expresión de un gen diana. Por tanto, la molécula de PNmc de la presente invención se usa para inducir interferencia por ARN.

55 La molécula de ácido nucleico según la presente invención es una molécula de ácido nucleico para su uso en el tratamiento de una enfermedad. La molécula de ácido nucleico es la molécula de PNmc de la presente invención, y la molécula de PNmc incluye, como secuencia inhibidora de la expresión, una secuencia que inhibe la expresión de un gen que causa la enfermedad.

60 8. Monómero

Un monómero para la síntesis de ácido nucleico tiene la estructura de la siguiente fórmula (II). La descripción con respecto a la molécula de PNmc de la presente invención también se aplica al monómero, a menos que se establezca de otro modo.



• • • (I I)

Por el uso de un monómero tal en la síntesis de la molécula de PNmc de la presente invención, las regiones de ligador (Lx) y (Ly) representadas por la fórmula (I) pueden sintetizarse fácilmente. El monómero puede usar un amidito para, por ejemplo, la síntesis de ácidos nucleicos automatizada y es aplicable, por ejemplo, a sintetizadores de ácidos nucleicos automatizados generales. Ejemplos del procedimiento de síntesis incluyen un procedimiento de fosforamidito y un H-fosfonato.

En la fórmula,

X¹ y X² son cada uno independientemente H₂, O, S o NH;

Y¹ y Y² son cada uno independientemente un enlace sencillo, CH₂, NH, O o S;

R¹ y R² son cada uno independientemente H, un grupo protector o un grupo protector de fosfato;

R³ es un átomo de hidrógeno o sustituyente que está unido a C-3, C-4, C-5 o C-6 sobre un anillo A;

L¹ es una cadena de alquileo compuesta por n átomos, y átomo(s) de hidrógeno sobre átomo(s) de carbono del alquileo puede(n) o puede(n) no estar sustituido(s) con OH, OR^a, NH₂, NHR^a, NR^aR^b, SH o SR^a, o,

L² es una cadena de poliéter obtenida sustituyendo al menos un átomo de carbono sobre la cadena de alquileo con un átomo de oxígeno,

a condición de que: cuando Y¹ sea NH, O o S, un átomo unido a Y¹ en L¹ sea carbono, un átomo unido a OR¹ en L¹ sea carbono y los átomos de oxígeno no sean adyacentes entre sí;

L¹ es una cadena de alquileo compuesta por m átomos, y átomo(s) de hidrógeno sobre átomo(s) de carbono del alquileo puede(n) o puede(n) no estar sustituido(s) con OR, OR^c, NH₂, NHR^c, NR^cR^d, SH o SR^c, o

L² es una cadena de poliéter obtenida sustituyendo al menos un átomo de carbono sobre la cadena de alquileo con un átomo de oxígeno,

a condición de que: cuando Y² sea NH, O o S, un átomo unido a Y² en L² sea carbono, un átomo unido a OR² en L² sea carbono y los átomos de oxígeno no sean adyacentes entre sí;

R^a, R^b, R^c y R^d son cada uno independientemente un sustituyente o un grupo protector;

l es 1 o 2;

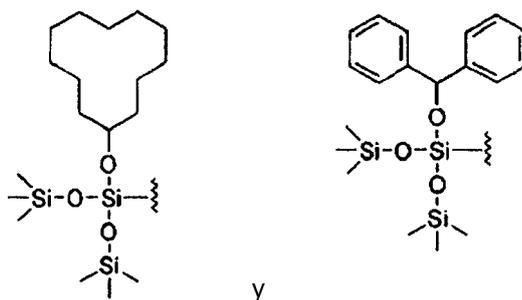
m es un número entero en el intervalo de 0 a 30; y

n es un número entero en el intervalo de 0 a 30.

En cuanto a las porciones en común entre la fórmula (II) y la fórmula (I), las descripciones establecidas anteriormente con respecto a la fórmula (I) también se aplican a la fórmula (II). Específicamente, en la fórmula (II), en cuanto a, por ejemplo, X¹, X², Y¹, Y², R³, L¹, L², l, m, n y el anillo A, se aplican todas las descripciones sobre ellos establecidas anteriormente con respecto a la fórmula (I).

En la fórmula (II), R¹ y R² son cada uno independientemente H, un grupo protector o un grupo protector de fosfato, como se ha descrito anteriormente.

El grupo protector es como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, con respecto a la fórmula (I). Específicamente, el grupo protector puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo I. El grupo I incluye, por ejemplo, un grupo dimetoxitritilo (DMTr), un grupo TBDMS, un grupo ACE, un grupo TOM, un grupo CEE, un grupo CEM, un grupo TEM y grupos que contienen sililo representados por la siguiente fórmula. En particular, es preferible que el grupo protector sea el grupo DMTr o cualquiera de los grupos que contienen sililo.



El grupo protector de fosfato puede representarse, por ejemplo, por la siguiente fórmula



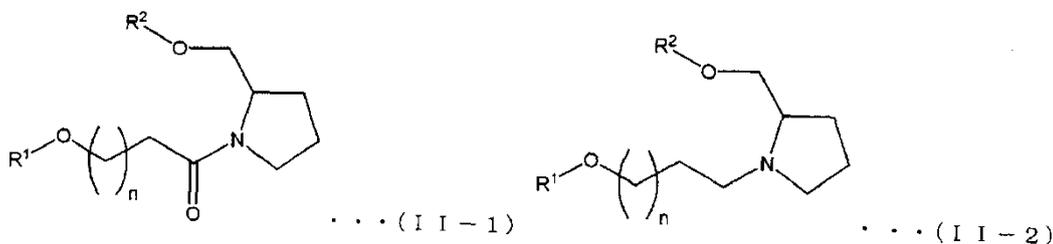
En la fórmula, R^6 es un átomo de hidrógeno o cualquier sustituyente. El sustituyente R^6 es preferentemente un grupo de hidrocarburo, y el grupo de hidrocarburo puede o puede no estar sustituido, por ejemplo, con un grupo aceptor de electrones. Ejemplos del sustituyente R^6 incluyen halógenos, haloalquilos, heteroarilos, hidroxialquilos, alcoxialquilos, aminoalquilos, sililos, sililoxialquilos, heterociclilalquenos, heterociclilalquilos, heteroarilalquilos e hidrocarburos tales como alquilos, alquenos, alquinos, arilos, arilalquilos, cicloalquilos, cicloalquenos, cicloalquilalquilos y ciclilalquilos. Además, el sustituyente R^6 puede o puede no estar sustituido con un grupo aceptor de electrones. Ejemplos específicos del sustituyente R^6 incluyen un grupo β -cianoetilo, un grupo nitrofeniletilo y un grupo metilo.

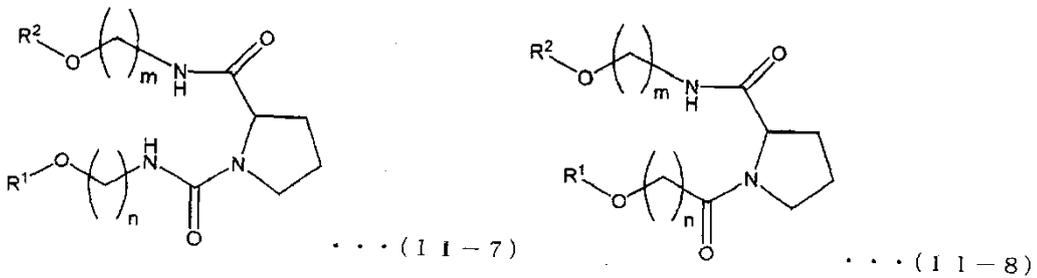
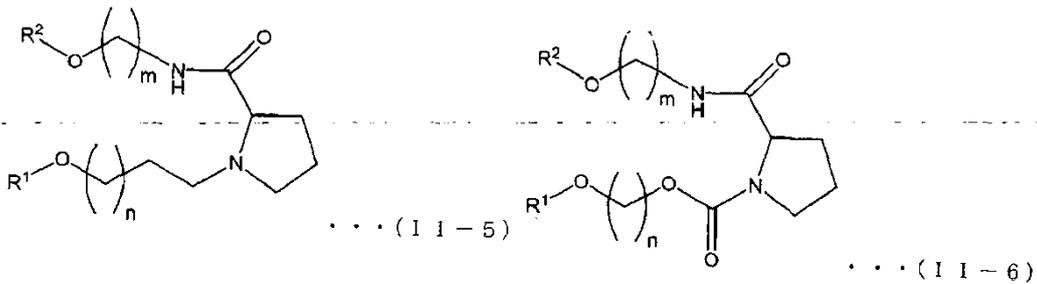
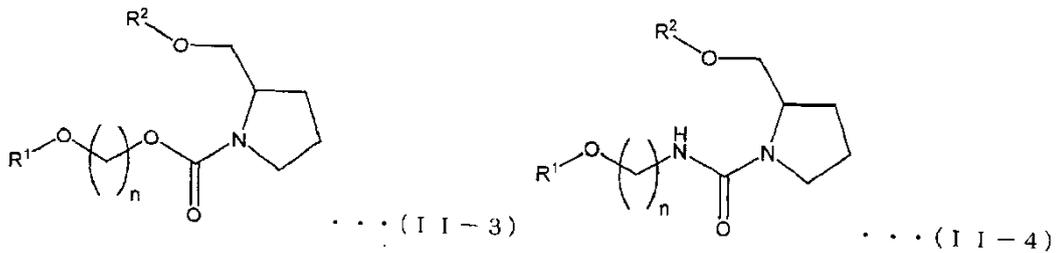
15 R^7 y R^8 son cada uno un átomo de hidrógeno o cualquier sustituyente, y pueden ser iguales o diferentes. Los sustituyentes R^7 y R^8 son preferentemente cada uno un grupo de hidrocarburo, y el grupo de hidrocarburo puede o puede no estar sustituido con cualquier sustituyente. Ejemplos del grupo de hidrocarburo son los mismos que aquellos enumerados en la descripción anterior con respecto a R^6 , y el grupo de hidrocarburo es preferentemente un grupo metilo, un grupo etilo o un grupo isopropilo. En este caso, ejemplos específicos de $-NR^7R^8$ incluyen un grupo diisopropilamino, un grupo dietilamino y un grupo etilmetilamino. Alternativamente, los sustituyentes R^7 y R^8 juntos (es decir, $-NR^7R^8$ en conjunto) pueden formar un anillo que contiene nitrógeno (por ejemplo, un grupo piperidilo, un grupo morfolino o similares) con un átomo(s) de nitrógeno a los que se unen.

25 Específicamente, el grupo protector de fosfato puede seleccionarse del grupo II descrito más adelante. El grupo II incluye, por ejemplo, $-P(OCH_2CH_2CN)(N(i-Pr)_2)$ y $-P(OCH_3)(N(i-Pr)_2)$. En la fórmula anterior, i-Pr indica isopropilo.

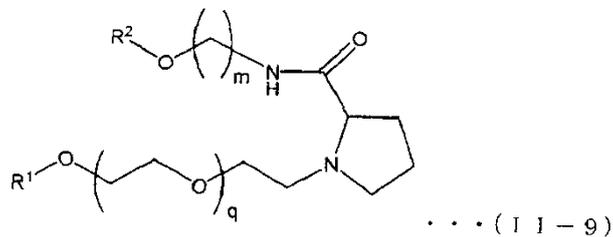
30 En la fórmula (II), por ejemplo, uno de R^1 y R^2 es H o un grupo protector, y el otro es H o un grupo protector de fosfato. Por ejemplo, es preferible que, si R^1 es un grupo protector, R^2 sea H o un grupo protector de fosfato. Específicamente, es preferible que si R^1 está seleccionado del grupo I, R^2 sea H o esté seleccionado del grupo II. Por tanto, es preferible que, por ejemplo, si R^1 es un grupo protector de fosfato, R^2 sea H o un grupo protector. Específicamente, es preferible que si R^1 se selecciona del grupo II, R^2 sea H o se seleccione del grupo I.

35 Ejemplos de la estructura de fórmula (II) incluyen las siguientes fórmulas (II-1) a (II-9). En las siguientes fórmulas, n y m son los mismos que en la fórmula (II). En las siguientes fórmulas, q es un número entero de 0 a 10.



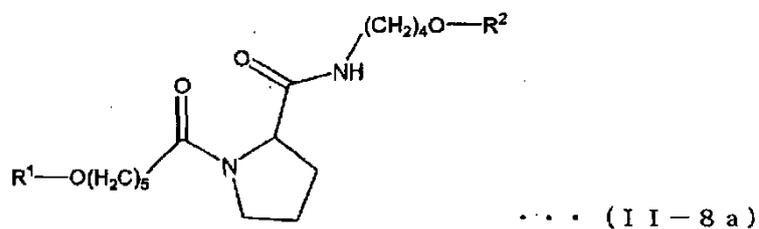
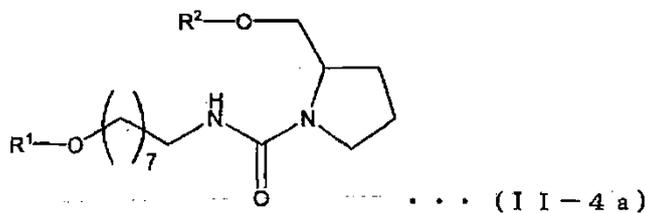


5



En las fórmulas (II-1) a (II-9), n, m y q no están particularmente limitados, y son como se han descrito anteriormente. Ejemplos específicos son del siguiente modo: en la fórmula (II-1), n = 8; en la fórmula (II-2), n = 3; en la fórmula (II-3), n = 4 u 8; en la fórmula (II-4), n = 7 u 8; en la fórmula (II-5), n = 3 y m = 4; en la fórmula (II-6), n = 8 y m = 4; en la fórmula (II-7), n = 8 y m = 4; en la fórmula (II-8), n = 5 y m = 4; y en la fórmula (II-9), q = 1 y m = 4. La siguiente fórmula (II-4a) muestra un ejemplo de fórmula (II-4) (n = 8), y la siguiente fórmula (II-8a) muestra un ejemplo de fórmula (II-8) (n = 5, m = 4).

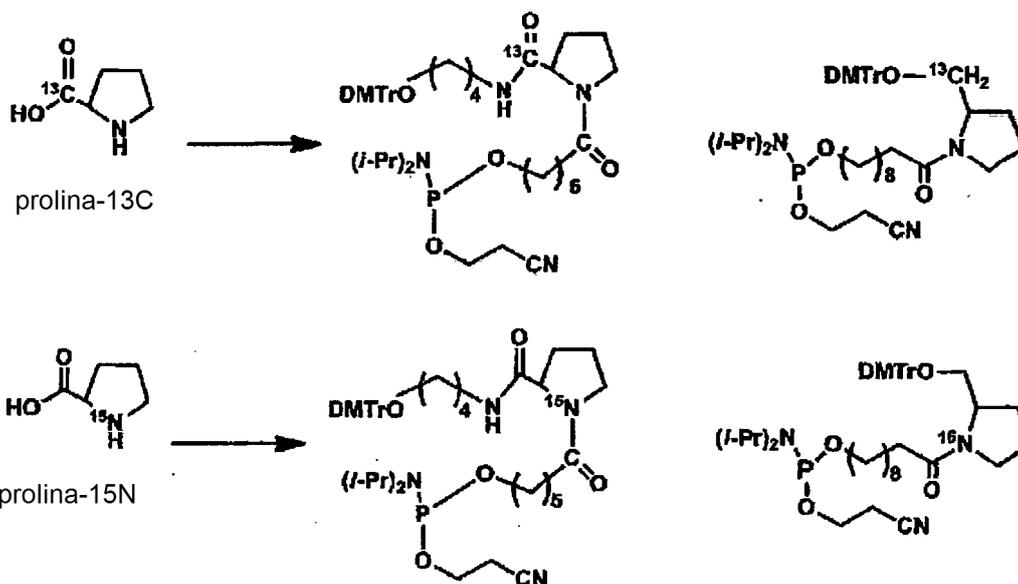
15



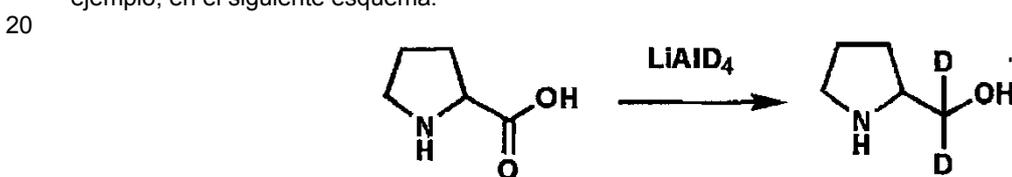
El monómero incluye preferentemente, por ejemplo, la sustancia de marcado anteriormente descrita. Es particularmente preferible que el monómero incluya el isótopo estable anteriormente descrito. La sustancia de marcado es como se ha descrito anteriormente.

- 5 Si el monómero incluye un isótopo tal como el isótopo estable, el isótopo puede introducirse fácilmente, por ejemplo, a la molécula de PNmc de la presente invención. El monómero que incluye un isótopo puede sintetizarse a partir de, por ejemplo, un material de partida que tiene un esqueleto de pirrolidina al que se introduce el isótopo y un material de partida que tiene un esqueleto de piperidina al que se introduce el isótopo. Ejemplos del material de partida que tienen un esqueleto de pirrolidina incluyen prolina y prolinol.

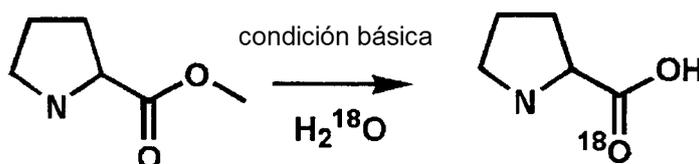
10 Los siguientes esquemas ilustran cómo se sintetizan los monómeros a los que se introduce un isótopo estable usando, como materiales de partida, prolina y prolinol teniendo cada uno el isótopo estable introducido en el mismo. Los siguientes esquemas son únicamente ilustrativos.



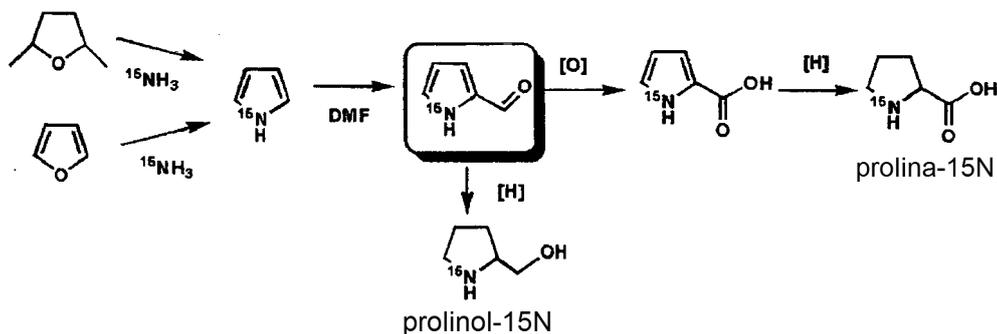
15 El prolinol que tiene un hidrógeno pesado (D) introducido en el mismo, que es un ejemplo de prolinol que tiene un isótopo estable introducido en el mismo, puede prepararse tratando prolina con LiAlD₄ como se muestra, por ejemplo, en el siguiente esquema.



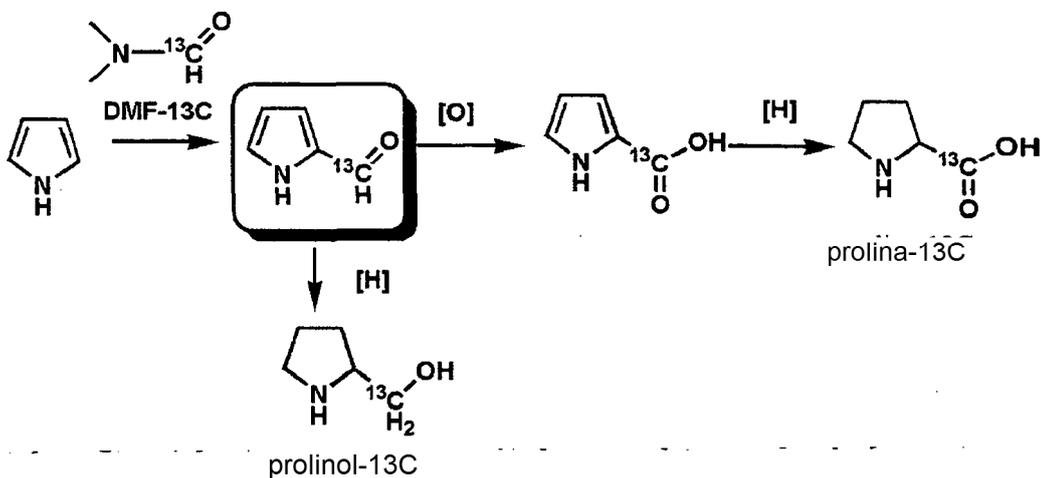
25 La prolina que tiene un hidrógeno pesado (D) introducido en la misma, que es un ejemplo de prolina que tiene un isótopo estable introducido en la misma, puede prepararse haciendo reaccionar éster metílico de prolina con H₂¹⁸O bajo una condición básica, como se muestra, por ejemplo, en el siguiente esquema.



30 Pueden sintetizarse prolina con nitrógeno pesado (¹⁵N) introducido (prolina-¹⁵N) y prolinol con nitrógeno pesado (¹⁵N) introducido (prolinol-¹⁵N), por ejemplo, según el siguiente esquema. Específicamente, primero se hace reaccionar furano o tetrahidrofurano con ¹⁵NH₃ para preparar pirrol con nitrógeno pesado (¹⁵N) introducido. Éste se formula entonces, obteniéndose así 2-formilpirrol con nitrógeno pesado (¹⁵N) introducido. La prolina-¹⁵N puede sintetizarse oxidando ésta a un ácido carboxílico y luego reduciendo el resto de pirrol. Por tanto, el prolinol-¹⁵N puede sintetizarse reduciendo el 2-formilpirrol con nitrógeno pesado (¹⁵N) introducido.



5 Pueden sintetizarse prolina con carbono pesado (^{13}C) introducido (prolina- ^{13}C) y prolinol con carbono pesado (^{13}C) introducido (prolinol- ^{13}C) por ejemplo, según el siguiente esquema. Es decir, primero, el pirrol se formila con DMF con carbono pesado (^{13}C) introducido (DMF- ^{13}C), obteniéndose así 2-formilpirrol con carbono pesado (^{13}C) introducido. La prolina- ^{13}C puede sintetizarse oxidando ésta a un ácido carboxílico y luego reduciendo el resto de pirrol. Por tanto, el prolinol- ^{13}C puede sintetizarse reduciendo el 2-formilpirrol con carbono pesado (^{13}C) introducido.



10

Un monómero que tiene un isótopo estable introducido en el mismo puede sintetizarse en el modo anteriormente descrito. Usando un monómero como amidito para la síntesis de ácidos nucleicos puede sintetizarse una molécula de ácido nucleico en la que un isótopo estable se introduce en la región de ligador.

15

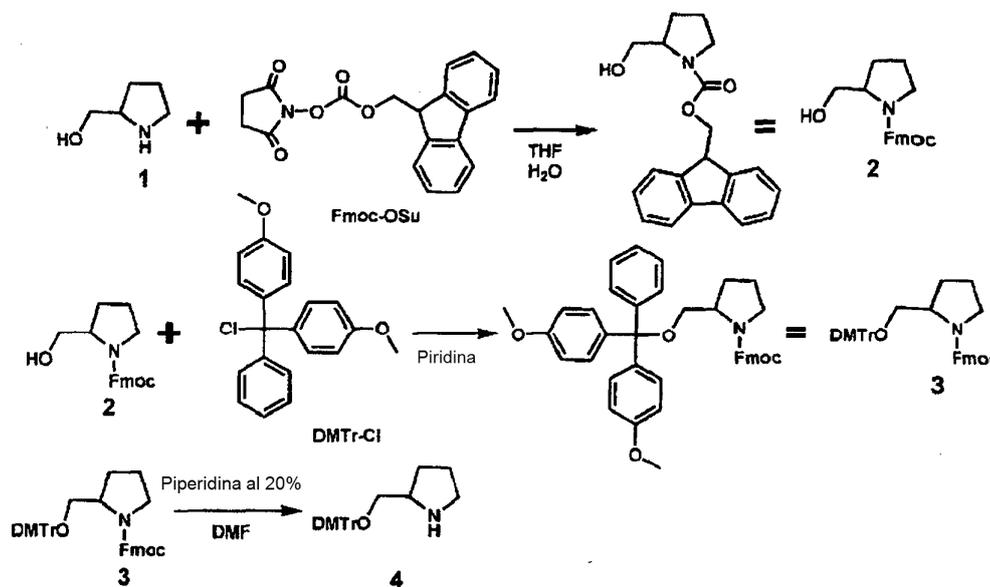
A continuación, la presente invención se describirá en detalle con referencia a ejemplos y similares. Debe observarse, sin embargo, que la presente invención no se limita en absoluto a éstos.

Ejemplos

(Ejemplo A1)

5 1. Síntesis de prolinol

El prolinol protegido con un grupo dimetoxitritilo se sintetizó según el Esquema 1 mostrado a continuación.



Esquema 1

10

(1) Fmoc-L-prolinol (Compuesto 2)

Se disolvió L-prolinol (Compuesto 1) (0,61 g, 6,0 mmoles) en 70 ml de agua pura, preparando así una disolución acuosa de L-prolinol. Se disolvió N-(9-fluorenilmetoxicarbonilo)succinimida (Fmoc-OSu) (2,0 g, 6,0 mmoles) en 10 ml de THF. Esta disolución de THF se añadió a la disolución acuosa de L-prolinol, y ésta se agitó durante 1 hora de manera que reaccionara el L-prolinol y la Fmoc-OSu. La disolución de reacción se separó en una fracción líquida y una fracción precipitada. Estas fracciones se sometieron respectivamente a extracción con acetato de etilo, y se recogieron fases orgánicas respectivamente de las mismas. Las fases orgánicas así obtenidas se mezclaron juntas, y se añadió sulfato de sodio anhidro a las mismas para absorber la humedad (en lo sucesivo este procedimiento se denomina procedimiento de "secado"). Las fases orgánicas se filtraron, y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual obtenida se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: hexano : acetato de etilo = 1:1). Así se obtuvo el Compuesto 2 (1,4 g, rendimiento: 74 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,77 (2H, d, J = 7,7 Hz, Ar-H), 7,60 (2H, d, J = 7,3 Hz, Ar-H), 7,40 (2H, t, J = 7,5 Hz, Ar-H), 7,31 (2H, t, J = 7,6 Hz, Ar-H), 4,40-4,50 (2H, m, COOCH₂), 4,22 (1H, t, J = 6,5 Hz, Ar-CH), 3,20-3,80 (5H, m, H-5, H-6), 1,75 (3H, m, H-3, H-4), 1,40 (1H, m, H-3).

(2) Fmoc-DMTr-L-prolinol (Compuesto 3)

Se disolvió Fmoc-L-prolinol (Compuesto 2) (1,4 g, 4,3 mmoles) en 20 ml de piridina y se destiló azeotrópicamente tres veces. La sustancia residual obtenida se disolvió en 20 ml de piridina. Mientras se agitaba esta disolución en un baño de hielo bajo argón se añadió a la misma cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (DMTr-Cl) (1,8 g, 5,3 mmoles). La reacción en esta disolución de reacción se siguió por CCF usando cloroformo/metanol, y la reacción se dejó avanzar durante 4 horas hasta que ya no se observó una mancha del Fmoc-L-prolinol. Con el fin de extinguir el exceso de DMTr-Cl se añadieron 3 ml de metanol a la disolución de reacción, y ésta se agitó durante 10 minutos. Adicionalmente se añadió cloroformo a la disolución de reacción, y después se recogió una fase orgánica. La fase orgánica recogida se lavó con solución salina saturada, luego con una disolución acuosa al 5 % de hidrogenocarbonato de sodio, y de nuevo con solución salina saturada. La fase orgánica así lavada se secó con sulfato de sodio anhidro. Entonces, la fase orgánica se filtró y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual obtenida se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: cloroformo, 1 % de piridina). Así se obtuvo el Compuesto 3 (2,0 g, rendimiento: 74 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,77 (2H, d, J = 7,7 Hz, Ar-H), 7,60 (2H, d, J = 7,3 Hz, Ar-H), 7,40-7,18 (13H, m, Ar-H), 6,89 (4H,

d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 4,20-4,40 (2H, m, COOCH_2), 4,02 (1H, t, $J = 6,5$ Hz, Ar-CH), 3,80-3,10 (5H, m, H-5, H-6), 3,73 (s, 6H, OCH_3), 1,84 (3H, m, H-3, H-4), 1,58 (1H, m, H-3).

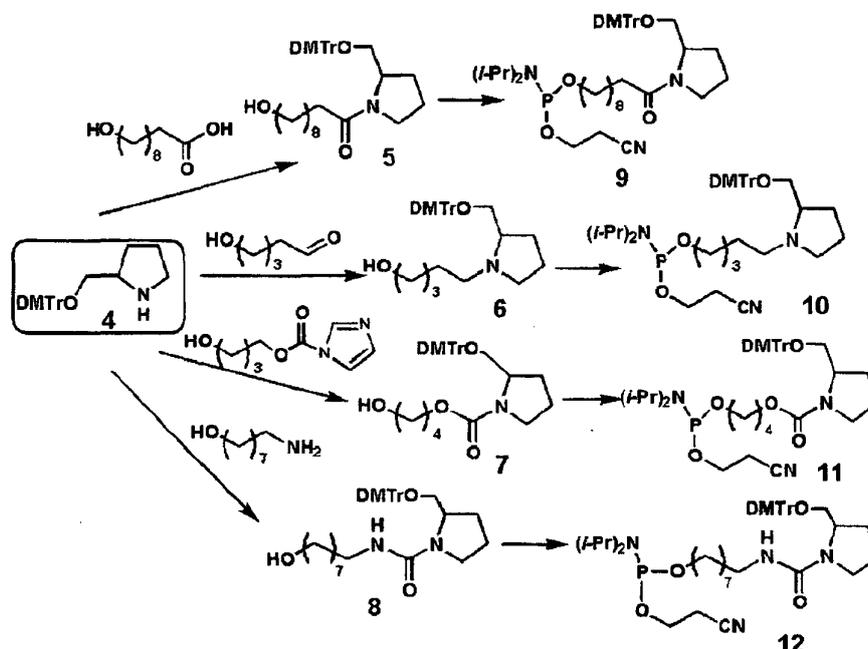
(3) DMTr-L-prolinol (Compuesto 4)

5 Se disolvió Fmoc-DMTr-L-prolinol (Compuesto 3) (2,0 g, 3,2 mmoles) en 25 ml de una disolución de DMF que contenía 20 % de piperidina, y ésta se agitó durante 12 horas. La disolución se concentró a vacío, y la sustancia residual obtenida se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (clorofórmico : metanol = 85 : 15, que contenía 1 % de piridina). Así se obtuvo el Compuesto 4 (1,0 g, rendimiento: 78 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

10 RMN ^1H (CDCl_3) δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s, OCH_3), 3,31 (1H, m, H-6), 3,07 (2H, m, H-2, H-6), 2,90 (2H, m, H-5), 1,84 (3H, m, H-3, H-4), 1,40 (1H, m, H-3).

15 2. Síntesis de derivados de amidito

A continuación, según el Esquema 2 mostrado a continuación, se sintetizaron derivados de amidito que tienen prolinol. En lo sucesivo, el clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida se denomina "EDC" y la N,N-dimetilaminopiridina (4-dimetilaminopiridina) se denomina "DMAP".



Esquema 2

20 (1) DMTr-amida-L-prolinol (Compuesto 5)

25 Se disolvieron DMTr-L-prolinol (Compuesto 4) (0,80 g, 2,0 mmoles), EDC (0,46 g, 2,4 mmoles) y DMAP (0,29 g, 2,4 mmoles) en 20 ml de diclorometano, y ésta se agitó luego. Se añadió ácido 10-hidroxicaproico (0,45 g, 2,4 mmoles) a esta disolución, y ésta se agitó luego. La reacción en esta disolución de reacción se siguió por CCF usando acetato de etilo, y la reacción se dejó avanzar durante 20 horas hasta que ya no se observó una mancha del DMTr-L-prolinol. Entonces se añadió diclorometano a la disolución de reacción, y luego se recogió una fase orgánica. La fase orgánica recogida se lavó con solución salina saturada y luego se secó con sulfato de sodio anhidro. La fase orgánica se filtró y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo, que contenía 1 % de piridina). Así se obtuvo el Compuesto 5 (0,71 g, rendimiento: 62 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

30 RMN ^1H (CDCl_3): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s, OCH_3), 3,68-2,93 (7H, m, H-2, H-5, H-6), 2,27-1,72 (6H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,58 (4H, s, alquilo), 1,30 (10H, s, alquilo).

(2) DMTr-alquil-L-prolinol (Compuesto 6)

40 Se disolvió DMTr-L-prolinol (Compuesto 4) (0,80 g, 2,0 mmoles) en 15 ml de metanol. Se añadió 5-hidroxipentalal (0,31 g, 3,0 mmoles) a la misma, y ésta se agitó luego. Se añadió cianoborohidruro de sodio (0,25 g, 4,0 mmoles) a

esta disolución, y ésta se agitó adicionalmente. La reacción en esta disolución de reacción se siguió por CCF usando acetato de etilo/hexano, y la reacción se dejó avanzar durante 24 horas hasta que ya no se observó una mancha del DMTr-L-prolinol. Se añadió acetato de etilo a la disolución de reacción y se recogió una fase orgánica. La fase orgánica recogida se lavó con solución salina saturada y luego se secó con sulfato de sodio anhidro. La fase orgánica se filtró y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: acetato de etilo = 1 : 1, que contenía 1 % de piridina). Así se obtuvo el Compuesto 6 (0,62 g, rendimiento: 63 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación. RMN ¹H(CDCl₃): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, J = 8,6 Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s, OCH₃), 3,70-2,86 (4H, m, CH₂OH, H-6), 2,06-1,79 (5H, m, alquilo, H-2, H-5), 1,74-1,49 (6H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,45-1,27 (4H, m, alquilo).

(3) DMTr-uretan-L-prolinol (Compuesto 7)

Se disolvió 1,4-butanodiol (0,90 g, 10 mmoles) en 30 ml de diclorometano. Se añadió carbonildiimidazol (1,4 g, 8,6 mmoles) adicionalmente a la misma, y ésta se agitó durante 3 horas. Una fase orgánica de esta disolución de reacción se lavó con solución salina saturada, y luego se secó con sulfato de sodio anhidro. La fase orgánica se filtró y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo : metanol = 9 : 1). Así se obtuvo un compuesto en el que un extremo del 1,4-butanodiol se activó con carbonildiimidazol (0,25 g, 1,5 mmoles). Este compuesto se disolvió en 15 ml de diclorometano. Se añadió DMTr-L-prolinol (Compuesto 4) (0,6 g, 1,5 mmoles) a la misma, y ésta se agitó durante 24 horas. Adicionalmente se añadió acetato de etilo a esta mezcla, y se recogió una fase orgánica. La fase orgánica recogida se lavó con solución salina saturada y luego se secó con sulfato de sodio anhidro. La fase orgánica se filtró y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano : acetato de etilo = 1:1, que contenía 1 % de piridina). Así se obtuvo el Compuesto 7 (0,61 g, rendimiento: 77 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación. RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, J = 8,6 Hz, Ar-H), 4,24-3,94 (2H, m, COOCH₂), 3,78 (s, 6H, OCH₃), 3,72-2,96 (7H, m, alquilo, H-2, H-5, H-6), 2,10-1,30 (8H, m, alquilo, H-3, H-4).

(4) DMTr-ureido-L-prolinol (Compuesto 8)

Se disolvieron DMTr-L-prolinol (Compuesto 4) (0,50 g, 1,2 mmoles) y trifosgeno (0,12 g, 0,40 mmoles) en 8 ml de diclorometano y la mezcla resultante se agitó en un baño de hielo bajo argón. Se añadió N,N-diisopropiletilamina (0,31 g, 2,4 mmoles) a la disolución, y ésta se agitó durante 1 hora. Entonces se añadió 8-amino-1-octanol (0,17 g, 1,2 mmoles) adicionalmente a la misma, y ésta se agitó durante 30 minutos en un baño de hielo del mismo modo que antes. Entonces, ésta se agitó adicionalmente a temperatura ambiente durante 20 horas. Se añadió diclorometano a la disolución y se recogió una fase orgánica. La fase orgánica recogida se lavó con solución salina saturada y luego se secó con sulfato de sodio anhidro. La fase orgánica se filtró y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: acetato de etilo = 4 : 1, que contenía 1 % de trietilamina). Así se obtuvo el Compuesto 8 (0,44 g, rendimiento: 62 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación. RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, m, Ar-H), 3,78 (s, 6H, OCH₃), 3,68-3,25 (9H, m, CH₂NH, CH₂OH, H-2, H-5, H-6), 1,74-1,18 (16H, m, alquilo, H-3, H-4).

(5) Derivados de amidito que tienen prolinol (Compuestos 9 a 12)

Los Compuestos 9 a 12 se sintetizaron del siguiente modo usando los prolinoles modificados (Compuestos 5 a 8), respectivamente, como materiales de partida. Cada uno de los prolinoles modificados y 5-benciltio-1H-tetrazol se disolvieron en 3 ml de acetonitrilo. La cantidad del prolinol modificado usado fue la siguiente: Compuesto 5: 0,69 g (1,2 mmoles); Compuesto 6: 0,60 g (1,2 mmoles); Compuesto 7: 0,60 g (1,2 mmoles); y Compuesto 8: 0,25 g (0,43 mmoles). La cantidad de 5-benciltio-1H-tetrazol usada fue: 0,15 g (0,78 mmoles) para los Compuestos 5 a 7; y 54 mg (0,15 mmoles) para el Compuesto 8. Bajo argón se añadió N,N,N',N'-tetraaisopropilfosforodiamidito de 2-cianoetilo a la disolución, y ésta se agitó durante 2 horas. La cantidad de N,N,N',N'-tetraaisopropilfosforodiamidito de 2-cianoetilo añadida fue: 0,54 g (1,8 mmoles) en sistemas usando los Compuestos 5 a 7; y 0,19 g (0,64 mmoles) en un sistema usando el Compuesto 8. Entonces se añadió una disolución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio a la disolución y se extrajo una fase orgánica con diclorometano y se recogió. La fase orgánica recogida se secó con sulfato de sodio anhidro. La fase orgánica se filtró y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano : acetato de etilo = 1 : 1, que contenía 1 % de trietilamina). Así se obtuvieron los Compuestos 9 a 12. Los resultados del análisis de RMN con respecto a estos compuestos se muestran a continuación.

Amidito de DMTr-amida-L-prolinol (Compuesto 9, 0,60 g, rendimiento: 55 %). RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, J = 8,6 Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s, OCH₃), 3,68-2,93 (11H, m, CH₂O, POCH₂, CHCH₃, H-2, H-5, H-6), 2,58 (2H, m, CH₂CN), 2,27-1,72 (6H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,58 (4H, s, alquilo), 1,30 (22H, s, alquilo, CHCH₃).

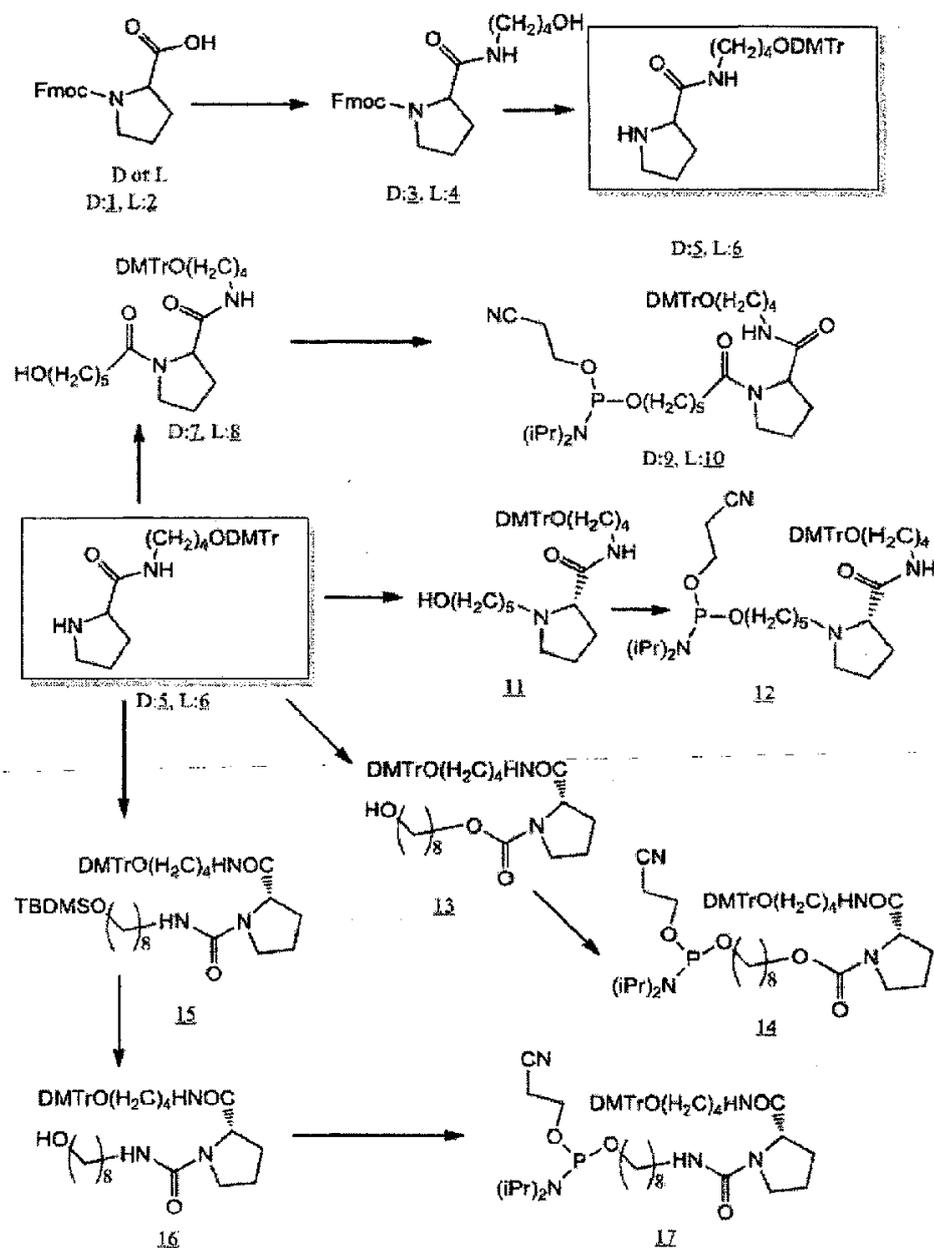
Amidito de DMTr-alkil-L-prolinol (Compuesto 10, 0,71 g, rendimiento: 60 %). RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, J = 8,6 Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s, OCH₃), 3,70-2,86 (8H, m, CH₂O, POCH₂, CHCH₃, H-6), 2,58 (2H, m, CH₂CN), 2,06-1,79 (5H, m, alquilo, H-2, H-5), 1,74-1,49 (6H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,37-1,10 (16H, m, alquilo, CHCH₃).

5 Amidito de DMTr-uretan-L-prolinol (Compuesto 11, 0,67 g, rendimiento: 52 %) RMN ¹H (CDCl₃): 87,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, J = 8,6 Hz, Ar-H), 4,24-3,94 (2H, m, COOCH₂), 3,78 (s, 6H, OCH₃), 3,72-2,96 (11H, m, CH₂O, POCH₂, CHCH₃, H-2, H-5, H-6), 2,58 (2H, m, CH₂CN), 2,10-1,46 (8H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,34-1,10 (12H, m, CHCH₃).

10 Amidito de DMTr-ureido-L-prolinol (Compuesto 12, 0,20 g, rendimiento: 61 %). RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, m, Ar-H), 3,78 (s, 6H, OCH₃), 3,65-3,25 (13H, m, CH₂O, POCH₂, CHCH₃, H-2, CH₂NH, CH₂OH, H-2, H-5, H-6), 2,73 (2H, m, CH₂CN), 2,10-1,48 (16H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,35-1,10 (12H, m, CHCH₃).

15 (Ejemplo A2)

A continuación se sintetizaron derivados de amidito que tienen L-prolina según el Esquema 3 mostrado a continuación.



(1) DMTr-hidroxiáamida-amino-L-prolina (Compuesto 11)

Se añadió tampón de ácido acético (7 ml) a una disolución de etanol (7 ml) que contenía DMTr-amida-L-prolina (Compuesto 6) (1,00 g, 2,05 mmoles) y 5-hidroxipentalal (0,33 g, 3,07 mmoles) bajo enfriamiento con hielo. La mezcla resultante se agitó durante 20 minutos bajo enfriamiento con hielo. Después se añadió adicionalmente cianoborohidruro de sodio (0,77 g, 12,28 mmoles) a la misma, y ésta se agitó durante 7 horas a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con diclorometano, se lavó con agua y luego se lavó adicionalmente con solución salina saturada. Entonces, la fase orgánica se recogió y se secó con sulfato de sodio. La fase orgánica se filtró y el disolvente en el filtrado resultante se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂ : CH₃OH = 98 : 2, que contenía 0,05 % de piridina). Entonces, el producto obtenido se aplicó a cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂ : CH₃OH = 98 : 2, que contenía 0,05 % de piridina) y el producto obtenido se sometió adicionalmente a cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: diclorometano : acetona = 7 : 3, que contenía 0,05 % de piridina). Así se obtuvo el Compuesto 11 en forma de un jarabe incoloro (0,49 g, rendimiento: 41 %). EM (FAB+): m/z 575 (M⁺), 303 (DMTr⁺)

(2) Amidito de DMTr-amida-amino-L-prolina (Compuesto 12)

La DMTr-hidroxiáamida-amino-L-prolina así obtenida (Compuesto 11) (0,50 g, 0,87 mmoles) se mezcló con acetonitrilo anhidro y la mezcla se secó azeotrópicamente a temperatura ambiente. A la sustancia residual obtenida se añadió tetrazolida de diisopropilamonio (178 mg, 1,04 mmoles). La mezcla resultante se desaireó a presión reducida y se llenó con argón gas. Se añadió acetonitrilo anhidro (1 ml) a la mezcla, y a la misma se añadió adicionalmente una disolución de acetonitrilo anhidro (1 ml) de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidito (313 mg, 1,04 mmoles). Esta mezcla se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Entonces, la mezcla se diluyó con diclorometano y ésta se lavó con disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico y luego con solución salina saturada. Se recogió una fase orgánica y se secó con sulfato de sodio. Después, la fase orgánica se filtró. El disolvente en el filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía en columna usando aminosilíce como carga (eluyente: hexano : acetona = 7 : 3, que contenía 0,05 % de piridina). Así se obtuvo el Compuesto 12 en forma de un jarabe incoloro (0,57 g, pureza: 93 %, rendimiento: 79 %). La pureza se midió por HPLC (en lo sucesivo igual). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,41-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,28-7,32 (m, 4H, Ar-H), 7,25-7,27 (m, 2H, Ar-H), 7,18-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,80-6,84 (m, 4H, Ar-H), 3,73-3,84 (m, 1H), 3,79 (s, 6H, OCH₃), 3,47-3,64 (m, 3H), 3,12-3,26 (m, 2H), 3,05 (t, J = 6,4 Hz, 2H, CH₂), 2,98-2,02 (m, 2H), 2,61 (t, J = 5,8 Hz, 2H, CH₂), 2,55-2,63 (m, 2H), 2,27-2,42 (m, 1H, CH), 2,31 (t, 7,8 Hz, 2H, CH₂), 2,03-2,19 (m, 1H, CH), 1,40-1,90 (m, 8H), 1,23-1,33 (m, 5H), 1,14-1,20 (m, 12H, CH₃);

RMN P (CDCl₃): δ 146,91;

EM (FAB+): m/z 774 (M⁺), 303 (DMTr⁺), 201 (C₈H₁₉N₂OP⁺).

(3) DMTr-hidroxiáamida-carbamoiil-L-prolina (Compuesto 13)

A una disolución de acetonitrilo anhidro (10 ml) en la que se había disuelto la DMTr-amida-L-prolina (Compuesto 6) (1,00 g, 2,05 mmoles) se añadió disolución de acetonitrilo anhidro (20 ml) en la que se había disuelto 1-imidazolilcarboniloxi-8-hidroxiocetano (1,12 g, 4,92 mmoles) a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Esta mezcla se calentó a 40 °C a 50 °C durante 2 días, y luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 días. El disolvente en la mezcla se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: diclorometano : acetona = 4 : 1, que contenía 0,05 % de piridina). Así se obtuvo el Compuesto 13 en forma de un jarabe incoloro (0,68 g, rendimiento: 50 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,40-7,42 (m, 2H, Ar-H), 7,27-7,31 (m, 6H, Ar-H), 7,17-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,79-6,82 (m, 4H, Ar-H), 4,23-4,30 (m, 1H), 4,05-4,10 (m, 2H), 3,79 (s, 6H, OCH₃), 3,60-3,65 (m, 2H), 3,32-3,55 (m, 2H), 3,16-3,29 (m, 2H), 3,01-3,07 (m, 2H), 2,38-2,40 (m, 1H, CH), 1,83-1,90 (m, 2H), 1,57-1,69 (m, 8H), 1,26-1,36 (m, 2H);

EM (FAB+): m/z 602 (M⁺), 303 (DMTr⁺).

(4) Amidito de DMTr-amida-carbamoiil-L-prolina (Compuesto 14)

La DMTr-hidroxiáamida-carbamoiil-L-prolina así obtenida (Compuesto 13) (0,63 g, 1,00 mmoles) se mezcló con piridina anhidra, y la mezcla resultante se secó azeotrópicamente a temperatura ambiente. Se añadió tetrazolida de diisopropilamonio (206 mg, 1,20 mmoles) a la sustancia residual obtenida, y la mezcla resultante se desaireó a presión reducida y se llenó con argón gas. Se añadió acetonitrilo anhidro (1 ml) a la mezcla, y adicionalmente se añadió a la misma una disolución de acetonitrilo anhidro (1 ml) de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidito (282 mg, 1,12 mmoles). Esta mezcla se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Entonces, la mezcla se diluyó con diclorometano y ésta se lavó con disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico y luego con solución salina saturada. Se recogió una fase orgánica y se secó con sulfato de sodio. Después, la fase orgánica se filtró. El disolvente en el filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía en columna usando aminosilíce como carga (eluyente: hexano : acetona = 7 : 3, que contenía 0,5 % de piridina). Así se obtuvo el

Compuesto 14 en forma de un jarabe incoloro (0,74 g, pureza: 100 %, rendimiento: 87 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

RMN P (CDCl₃): δ 147,19;

EM (FAB+): m/z 860 (M⁺), 303 (DMTr⁺), 201 (C₈H₁₉N₂OP⁺).

5

(5) DMTr-t-butil-dimetil-siloxi-amida-ureido-L-prolina (Compuesto 15)

Se añadió una disolución de tetrahidrofurano anhidro (10 ml) a trifosgeno (1,22 g, 4,10 mmoles) bajo enfriamiento con hielo en una atmósfera de argón. Una disolución de tetrahidrofurano anhidro (10 ml) en la que se habían disuelto DMTr-amida-L-prolina (Compuesto 6) (1,00 g, 2,05 mmoles) y DIEA (9,80 g, 75,8 mmoles) se instiló en esta mezcla bajo enfriamiento con hielo en una atmósfera de argón durante 30 minutos. Después, ésta se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Una disolución de tetrahidrofurano anhidro (20 ml) en la que se había disuelto 10-amino-1-t-butildimetilsiloxidecano (2,66 g, 10,25 mmoles) y DIEA (3,20 g, 24,76 mmoles) se instiló en la mezcla bajo enfriamiento con hielo en una atmósfera de argón durante 45 minutos. Entonces, la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Esta mezcla se diluyó con acetato de etilo (200 ml) y se recogió una fase orgánica. La fase orgánica se lavó con disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico y luego se lavó adicionalmente con solución salina saturada. Entonces, la fase orgánica se recogió y se secó con sulfato de sodio. La fase orgánica se filtró y el disolvente en el filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: diclorometano acetona = 4 : 1, que contenía 0,05 % de piridina). Así se obtuvo el Compuesto 15 en forma de un jarabe incoloro (0,87 g, rendimiento: 55 %).

10

15

20

(6) Compuesto de DMTr-hidroxi-amida-ureido-L-prolina (16)

A la DMTr-t-butil-dimetil-siloxi-amida-ureido-L-prolina así obtenida (15) (0,87 g, 1,12 mmoles) se añadió una disolución de tetrahidrofurano anhidro- diclorometano (10 ml) a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. A la mezcla se añadió una disolución de tetrahidrofurano que contenía 1 mol/l de fluoruro de tetrabutilamonio (4,69 ml, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.), y ésta se agitó durante 3 días a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. La mezcla se diluyó con diclorometano (150 ml), y ésta se lavó con agua y luego adicionalmente se lavó con solución salina saturada. Se recogió una fase orgánica y se secó con sulfato de sodio. Después, la fase orgánica se filtró. El disolvente en el filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: diclorometano : acetona = 1 : 1, que contenía 0,05 % de piridina). Así se obtuvo el Compuesto 16 en forma de un jarabe incoloro (0,68 g, rendimiento: 92 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

25

30

35

RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,41-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,27-7,31 (m, 4H, Ar-H), 7,19-7,26 (m, 2H, Ar-H), 7,19-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,80-6,83 (m, 4H, Ar-H), 4,34 (t, 2H, CH₂), 3,79 (s, 6H, OCH₃), 3,63 (d, 1H, J = 6,4 Hz, CH₂), 3,61 (d, 1H, J = 6,4 Hz, CH₂), 3,34-3,37 (m, 1H, CH), 3,16-3,27 (m, 5H), 3,04 (t, J = 5,9 Hz, 2H, CH₂), 2,38-2,45 (m, 1H, CH), 1,83-2,05 (m, 3H), 1,45-1,64 (m, 8H), 1,25-1,38 (m, 7H).

40

(7) Amidito de DMTr-amida-ureido-L-prolina (Compuesto 17)

La DMTr-hidroxi-amida-ureido-L-prolina así obtenida (Compuesto 16) (0,62 g, 0,94 mmoles) se mezcló con acetonitrilo anhidro, y la mezcla resultante se secó azeotrópicamente a temperatura ambiente. Se añadió tetrazolida de diisopropilamonio (192 mg, 1,12 mmoles) a la sustancia residual obtenida, y la mezcla resultante se desaireó a presión reducida y se llenó con argón gas. Se añadió acetonitrilo anhidro (1 ml) a la mezcla, y adicionalmente se añadió a la misma una disolución de acetonitrilo anhidro (1 ml) de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidito (282 mg, 1,12 mmoles). Ésta se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Entonces, la mezcla se diluyó con diclorometano y ésta se lavó con disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico y luego con solución salina saturada. Se recogió una fase orgánica y se secó con sulfato de sodio. Después, la fase orgánica se filtró. El disolvente en el filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía en columna usando aminosílice como carga (eluyente: hexano : acetona = 1 : 1, que contenía 0,05 % de piridina). Así se obtuvo el Compuesto 17 en forma de un jarabe incoloro (0,77 g, pureza: 88 %, rendimiento: 84 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

45

50

55

RMN P (CDCl₃): δ 147,27;

EM (FAB+): m/z 860 (M⁺+1), 303 (DMTr⁺), 201 (C₈H₁₉N₂OP⁺).

(Ejemplo A3) Síntesis de prolina-diamida-amidito

60

Con el fin de producir una molécula de ácido nucleico de la presente invención que incluyera un ligador que tiene un esqueleto de prolina, L-prolina-diamida-amidito y D-prolina-diamida-amidito se sintetizaron según el Esquema 3.

(A3-1) L-prolina-diamida-amidito

(1) Fmoc-hidroxi-amida-L-prolina (Compuesto 4)

5 Se usó el Compuesto 2 (Fmoc-L-prolina) en el Esquema 3 como material de partida. Se mezclaron juntos el Compuesto 2 (10,00 g, 29,64 mmoles), 4-amino-1-butanol (3,18 g, 35,56 mmoles) y 1-hidroxibenzotriazol (10,90 g, 70,72 mmoles). La mezcla se desaireó a presión reducida y se llenó con argón gas. Se añadió acetonitrilo anhidro (140 ml) a la mezcla a temperatura ambiente, y adicionalmente se añadió a la misma una disolución de acetonitrilo anhidro (70 ml) de dicitclohexilcarbodiimida (7,34 g, 35,56 mmoles). Después, ésta se agitó durante 15 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Después de completarse la reacción, el precipitado generado se eliminó por filtración, y el disolvente en el filtrado recogido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. Se añadió diclorometano (200 ml) a la sustancia residual obtenida y la mezcla se lavó con disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico (200 ml). Entonces se recogió una fase orgánica y se secó con sulfato de magnesio. Después, la fase orgánica se filtró y el disolvente en el filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. Se añadió éter dietílico (200 ml) a la sustancia residual, convirtiéndose así la sustancia residual en polvo. El polvo así obtenido se recogió por filtración. Así se obtuvo el Compuesto 4 en forma de polvo incoloro (10,34 g, rendimiento: 84 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

10 RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,76-7,83 (m, 2H, Ar-H), 7,50-7,63 (m, 2H, Ar-H), 7,38-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,28-7,33 (m, 2H, Ar-H), 4,40-4,46 (m, 1H, CH), 4,15-4,31 (m, 2H, CH₂), 3,67-3,73 (m, 2H, CH₂), 3,35-3,52 (m, 2H, CH₂), 3,18-3,30 (m, 2H, CH₂), 2,20-2,50 (m, 4H), 1,81-2,03 (m, 3H), 1,47-1,54 (m, 2H);

15 EM (FAB+): m/z 409 (M+H⁺).

(2) DMTr-amida-L-prolina (Compuesto 6)

25 Se mezcló Fmoc-hidroxi amida-L-prolina (Compuesto 4) (7,80 g, 19,09 mmoles) con piridina anhidra (5 ml) y la mezcla resultante se secó azeotrópicamente dos veces a temperatura ambiente. A la sustancia residual obtenida se añadieron cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (8,20 g, 24,20 mmoles), DMAP (23 mg, 0,19 mmoles) y piridina anhidra (39 ml). Esta mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se añadió metanol (7,8 ml) a la misma, y ésta se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Esta mezcla se diluyó con diclorometano (100 ml) y se lavó con disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico (150 ml). Después se separó una fase orgánica. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio y luego se filtró. El disolvente en el filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. Se añadieron dimetilformamida anhidra (39 ml) y piperidina (18,7 ml, 189 mmoles) a la sustancia residual sin purificar así obtenida, y ésta se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de completarse la reacción, el disolvente en la mezcla se eliminó mediante evaporación a presión reducida a temperatura ambiente. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía en columna de gel de sílice (marca registrada: Wakogel C-300, eluyente: CH₂Cl₂ : CH₃OH = 9 : 1, que contenía 0,05 % de piridina). Así se obtuvo el Compuesto 6 en forma de un aceite amarillo claro (9,11 g, rendimiento: 98 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

30 RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,39-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,30 (d, J = 8,8 Hz, 4H, Ar-H), 7,21 (tt, 1H, 4,9, 1,3 Hz, Ar-H), 6,81 (d, J = 8,8 Hz, 4H, Ar-H), 3,78 (s, 6H, OCH₃), 3,71 (dd, H, J = 6,3 Hz, 5,4 Hz, CH), 3,21 (2H, 12,9, 6,3 Hz, 2H, CH₂), 3,05 (t, J = 6,3 Hz, 2H, CH₂), 2,85-2,91 (m, 2H, CH₂), 2,08-2,17 (m, 1H, CH), 1,85-2,00 (m, 3H), 1,55-1,65 (m, 5H);

35 EM (FAB+); m/z 489 (M+H⁺), 303 (DMTr⁺).

(3) DMTr-hidroxi-diamida-L-prolina (Compuesto 8)

45 Se preparó una disolución de diclorometano anhidro mezclando la DMTr-amida-L-prolina así obtenida (Compuesto 6) (6,01 g, 12,28 mmoles), EDC (2,83 g, 14,74 mmoles), 1-hidroxibenzotriazol (3,98 g, 29,47 mmoles) y trietilamina (4,47 g, 44,21 mmoles) en diclorometano anhidro (120 ml). A esta disolución se añadió adicionalmente ácido 6-hidroxihexanoico (1,95 g, 14,47 mmoles) a temperatura ambiente en una atmósfera de argón, y ésta se agitó luego durante 1 hora a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. La mezcla se diluyó con diclorometano (600 ml), y ésta se lavó tres veces con solución salina saturada (800 ml). Entonces se recogió una fase orgánica. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio y luego se filtró. El disolvente en el filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. Así se obtuvo el Compuesto 8 en forma de una espuma amarilla clara (6,29 g, rendimiento: 85 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

50 RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,41-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,27-7,31 (m, 4H, Ar-H), 7,19-7,26 (m, 2H, Ar-H), 7,17-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,79-6,82 (m, 4H, Ar-H), 4,51-4,53 (m, 1H, CH), 3,79 (s, 6H, OCH₃), 3,61 (t, 2H, J = 6,4 Hz, CH₂), 3,50-3,55 (m, 1H, CH), 3,36-3,43 (m, 1H, CH), 3,15-3,24 (m, 2H, CH₂), 3,04 (t, J = 6,3 Hz, 2H, CH₂), 2,38-2,45 (m, 1H, CH), 2,31 (t, 6,8 Hz, 2H, CH₂), 2,05-2,20 (m, 1H, CH), 1,92-2,00 (m, 1H, CH), 1,75-1,83 (m, 1H, CH), 1,48-1,71 (m, 8H), 1,35-1,44 (m, 2H, CH₂);

55 EM (FAB+): m/z 602 (M⁺), 303 (DMTr⁺).

(4) Amidito de DMTr-diamida-L-prolina (Compuesto 10)

65 La DMTr-hidroxi-diamida-L-prolina así obtenida (Compuesto 8) (8,55 g, 14,18 mmoles) se mezcló con acetonitrilo anhidro, y la mezcla resultante se secó azeotrópicamente tres veces a temperatura ambiente. A la sustancia residual obtenida se añadió tetrazolida de diisopropilamonio (2,91 g, 17,02 mmoles). La mezcla resultante se desaireó a

presión reducida y se llenó con gas argón. Se añadió acetonitrilo anhidro (10 ml) a la mezcla, y adicionalmente se añadió a la misma una disolución de acetonitrilo anhidro (7 ml) de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropilfosforodiamidito (5,13 g, 17,02 mmoles). Esta mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Entonces, la mezcla se diluyó con diclorometano y ésta se lavó tres veces con disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico (200 ml) y luego con solución salina saturada (200 ml). Se recogió una fase orgánica y se secó con sulfato de sodio. Después, la fase orgánica se filtró. El disolvente en el filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía en columna usando gel de aminosilice como carga (eluyente: hexano : acetato de etilo = 1 : 3, que contenía 0,05 % de piridina). Así se obtuvo el Compuesto 10 en forma de un jarabe incoloro (10,25 g, pureza: 92 %, rendimiento: 83 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,40-7,42 (m, 2H, Ar-H), 7,29-7,31 (m, 4H, Ar-H), 7,25-7,27 (m, 2H, Ar-H), 7,17-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,80-6,82 (m, 4H, Ar-H), 4,51-4,53 (m, 1H, CH), 3,75-3,93 (m, 4H), 3,79 (s, 6H, OCH₃), 3,45-3,60 (m, 4H), 3,35-3,45 (m, 1H, CH), 3,20-3,29 (m, 1H), 3,04 (t, J = 6,4 Hz, 2H, CH₂), 2,62 (t, J = 5,8 Hz, 2H, CH₂), 2,40-2,44 (m, 1H, CH), 2,31 (t, 7,8 Hz, 2H, CH₂), 2,03-2,19 (m, 1H, CH), 1,92-2,02 (m, 1H, CH), 1,70-1,83 (m, 1H, CH), 1,51-1,71 (m, 8H), 1,35-1,44 (m, 2H, CH₂), 1,18 (d, J = 6,8 Hz, 6H, CH₃), 1,16 (d, J = 6,8 Hz, 6H, CH₃);

RMN P (CDCl₃): Msδ 147,17;

EM (FAB+): m/z 802 (M⁺), 303 (DMTr⁺), 201 (C₈H₁₉N₂OP⁺).

(A3-2) D-prolina-diamida-amidito

(1) Fmoc-hidroxiamida-D-prolina (Compuesto 3)

Se usó el Compuesto 1 (Fmoc-D-prolina) en el Esquema 3 como material de partida. La mezcla de Compuesto 1 (1,5 g, 4,45 mmoles), diciclohexilcarbodiimida (1,1 g, 5,34 mmoles) y 1-hidroxibenzotriazol (1,5 g, 10,69 mmoles) se desaireó a presión reducida y se llenó con argón gas. Se añadió acetonitrilo anhidro (24 ml) a la mezcla a temperatura ambiente, y adicionalmente se añadió a la misma una disolución de acetonitrilo anhidro (6 ml) de 4-amino-1-butanol (0,48 g, 5,34 mmoles). Después, ésta se agitó durante 15 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Después de completarse la reacción, el precipitado generado se eliminó por filtración, y el disolvente en el filtrado recogido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. Se añadió diclorometano a la sustancia residual obtenida, y la mezcla se lavó tres veces con tampón de ácido acético (pH4,0) y adicionalmente se lavó tres veces con disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico. Entonces se recogió una fase orgánica y se secó con sulfato de magnesio. Después, la fase orgánica se filtró y el disolvente en el filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. Se añadió éter dietílico (50 ml) a la sustancia residual, convirtiéndose así la sustancia residual en polvo. El polvo así obtenido se recogió por filtración. Así se obtuvo el Compuesto 3 en forma de un polvo blanco. El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,77 (d, J = 7,3 Hz, 2H); 7,58 (a, 2H); 7,41 (t, J = 7,3 Hz, 2H); 7,32 (t, J = 7,3 Hz, 2H); 4,25-4,43 (m, 4H); 3,25-3,61 (m, 6H); 1,57-1,92 (m, 8H).

EM (FAB+): m/z 409 (M+H⁺).

(2) DMTr-amida-D-prolina (Compuesto 5)

Se mezcló Fmoc-hidroxiamida-D-prolina (Compuesto 3) (1,0 g, 2,45 mmoles) con piridina anhidra (5 ml), y la mezcla resultante se secó azeotrópicamente dos veces a temperatura ambiente. A la sustancia residual obtenida se añadieron cloruro de 4,4'-dimetoxitriilo (1,05 g, 3,10 mmoles), DMAP (3 mg, 0,024 mmoles) y piridina anhidra (5 ml). Esta mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se añadió metanol (1 ml) a la misma, y ésta se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Esta mezcla se diluyó con diclorometano y ésta se lavó con disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico. Después se separó una fase orgánica. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio y luego se filtró. El disolvente en el filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. Se añadieron dimetilformamida anhidra (5 ml) y piperidina (2,4 ml, 24 mmoles) a la sustancia residual sin purificar así obtenida, y ésta se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de completarse la reacción, el disolvente en la mezcla se eliminó mediante evaporación a presión reducida a temperatura ambiente. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía en columna de gel de sílice (marca registrada Wakogel C-300, eluyente: CH₂Cl₂ : CH₃OH = 9 : 1, que contenía 0,05 % de piridina). Así se obtuvo el Compuesto 5 en forma de un aceite amarillo claro (1,26 g, rendimiento: 96 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,62 (a, 1H); 7,41-7,44 (m, 2H); 7,26-7,33(m, 6H); 7,17-7,22 (m, 1H); 6,80-6,84 (m, 4H); 3,78 (s, 6H); 3,71 (dd, J = 8,8, 5,4 Hz, 1H); 3,22 (q, 6,5 Hz, 2H); 3,07 (t, J = 6,1 Hz, 2H); 2,97-3,03 (m, 1H); 2,85-2,91 (m, 1H); 1,85-2,15 (m, 3H); 1,55-1,73 (m, 6H).

EM (FAB+): m/z 489 (M+H⁺), 303 (DMTr⁺).

(3) DMTr-hidroxidiamida-D-prolina (Compuesto 7)

Se preparó una disolución de diclorometano anhidro mezclando la DMTr-amida-D-prolina así obtenida (Compuesto 5) (1,2 g, 2,45 mmoles), EDC (566 mg, 2,95 mmoles), 1-hidroxibenzotriazol (796 mg, 5,89 mmoles) y trietilamina (1,2 ml, 8,84 mmoles) en diclorometano anhidro (24 ml). A esta disolución se añadió adicionalmente ácido 6-hidroxihexanoico (390 mg, 2,95 mmoles) a temperatura ambiente en una atmósfera de argón, y ésta se agitó luego

durante 1 hora a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. La mezcla se diluyó con diclorometano y ésta se lavó tres veces con disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico. Se recogió una fase orgánica y se secó con sulfato de sodio. Después, la fase orgánica se filtró. El disolvente en el filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. Así se obtuvo el Compuesto 7 en forma de un aceite amarillo claro (1,4 g, rendimiento: 95 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,40-7,43 (m, 2H); 7,25-7,32 (m, 6H); 7,17-7,22 (m, 1H); 6,79-6,83 (m, 4H); 3,79 (s, 6H); 3,58-3,63 (m, 2H); 3,49-3,55 (m, 1H); 3,15-3,26 (m, 2H); 3,02-3,07 (m, 2H); 2,30-2,33 (m, 2H); 2,11-2,20 (m, 1H); 1,50-1,99 (m, 13H); 1,36-1,43 (m, 2H);
EM (FAB+): m/z 602 (M⁺), 303 (DMTr⁺).

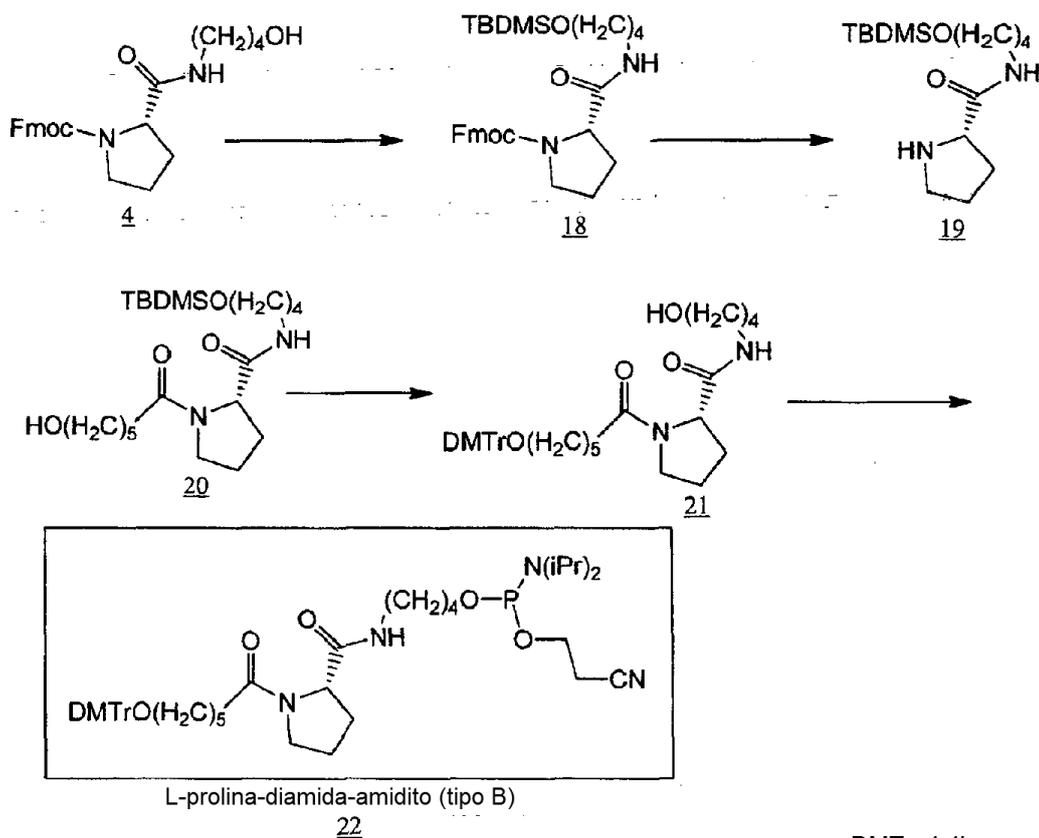
(4) Amidito de DMTr-diamida-D-prolina (Compuesto 9)

La DMTr-hidroxi-diamida-D-prolina así obtenida (Compuesto 7) (1,2 g, 1,99 mmoles) se mezcló con acetonitrilo anhidro, y la mezcla resultante se secó azeotrópicamente tres veces a temperatura ambiente. Se añadió tetrazolida de diisopropilamonio (410 mg, 2,40 mmoles) a la sustancia residual obtenida. La mezcla resultante se desaireó a presión reducida y se llenó con argón gas. Se añadió acetonitrilo anhidro (2,4 ml) a la mezcla, y adicionalmente se añadió a la misma 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropilfosforodiamidito (722 mg, 2,40 mmoles). Esta mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Entonces, la mezcla se diluyó con diclorometano y ésta se lavó tres veces con disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico y luego se lavó con solución salina saturada. Se recogió una fase orgánica y se secó con sulfato de sodio. Después, la fase orgánica se filtró. El disolvente en el filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía en columna usando gel de aminosilice como carga (eluyente: hexano : acetato de etilo = 1 : 3). Así se obtuvo el Compuesto 9 en forma de un aceite incoloro (1,4 g, pureza: 95 %, rendimiento: 83 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,40-7,43 (m, 2H); 7,25-7,32 (m, 6H); 7,14-7,21 (m, 1H); 6,80-6,83 (m, 4H); 3,80-3,85 (m, 2H); 3,79 (s, 6H); 3,49-3,65 (m, 5H); 3,02-3,06 (m, 2H); 2,60-2,63 (m, 2H); 2,29-2,33 (m, 2H); 1,77-1,82 (m, 2H); 1,56-1,68 (m, 8H); 1,38-1,43 (m, 2H); 1,15-1,29 (m, 18H);
RMN ³¹P (162 MHz, CDCl₃): δ 146,94;
EM (FAB+): m/z 802 (M⁺), 303 (DMTr⁺), 201 (C₈H₁₉N₂OP⁺).

(Ejemplo A4)

Con el fin de producir una molécula de ácido nucleico de la presente invención que incluyera un ligador que tiene un esqueleto de prolina, L-prolina-diamida-amidito (tipo B) se sintetizó según el Esquema 4 mostrado a continuación.



Fmoc: 9-fluorenilmetoxicarbonilo

TBDMS: terc-butildimetilsililo

DMTr: 4,4'-
dimetoxitritilo

Esquema 4

(1) Fmoc-t-butil-dimetil-siloxi-amida-L-prolina (Compuesto 18)

5 Se mezclaron juntos Fmoc-hidroxi-amida-L-prolina (Compuesto 4) (2,00 g, 30 mmoles), cloruro de t-butildimetilsililo (1,11 g, 35 mmoles) e imidazol (10,90 g, 71 mmoles). La mezcla se desaireó a presión reducida y se llenó con argón gas. Se añadió acetonitrilo anhidro (20 ml) a la mezcla a temperatura ambiente, y ésta se agitó durante la noche a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Después de completarse la reacción se añadió diclorometano (150 ml) a la mezcla. La mezcla resultante se lavó tres veces con agua y luego con solución salina saturada. Se

10 recogió una fase orgánica y se secó con sulfato de magnesio. Después, la fase orgánica se filtró. El disolvente en el filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida, y la sustancia residual se aplicó a cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂: CH₃OH = 95 : 5). Así se obtuvo el Compuesto 18 en forma de un jarabe incoloro (2,35 g, rendimiento: 92 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

15 RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,76-7,78 (m, 2H, Ar-H), 7,50-7,63 (m, 2H, Ar-H), 7,38-7,42 (m, 2H, Ar-H), 7,29-7,34 (m, 2H, Ar-H), 4,10-4,46 (m, 4H, CH₂), 3,47-3,59 (m, 4H, CH₂), 3,20-3,26 (m, 2H, CH), 1,85-1,95 (m, 2H), 1,42-1,55 (m, 6H), 0,96 (s, 9H, t-Bu), 0,02 (s, 6H, SiCH₃);
EM (FAB+): m/z 523 (M+H⁺).

(2) t-butil-dimetil-siloxi-amida-L-prolina (Compuesto 19)

20 A la Fmoc-t-butil-dimetil-siloxi-amida-L-prolina así obtenida (Compuesto 18) (1,18 g, 2,5 mmoles) se añadieron acetonitrilo anhidro (5 ml) y piperidina (2,4 ml), y ésta se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de completarse la reacción se añadió acetonitrilo (50 ml) a la mezcla, y la materia insoluble se eliminó por filtración. El disolvente en el filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida

25 se aplicó a cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂ : CH₃OH = 9 : 1). Así se obtuvo el Compuesto 19 en forma de un jarabe incoloro (0,61 g, rendimiento: 90 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

30 RMN ¹H (CDCl₃): δ 3,71 (dd, 1H, J = 9,0 Hz, 5,2 Hz, CH), 3,61-3,64 (m, 2H, CH₂), 3,22-3,28 (m, 2H, CH₂), 2,98-3,04 (m, 1H, CH), 2,86-2,91 (m, 1H, CH), 2,08-2,17 (m, 1H, CH), 1,86-1,93 (m, 1H, CH), 1,66-1,75 (m, 2H, CH₂), 1,52-1,57 (m, 4H), 0,89 (s, 9H, t-Bu), 0,05 (s, 6H, SiCH₃);
EM (FAB+); m/z 301 (M+H⁺).

(3) t-butil-dimetil-siloxi-amida-hidroxi-amida-L-prolina (Compuesto 20)

Se preparó una disolución de diclorometano anhidro mezclando la t-butil-dimetil-siloxi-amida-L-prolina así obtenida (Compuesto 19) (550 mg, 1,8 mmoles), ácido 6-hidroxihexanoico (300 mg, 2,3 mmoles), EDC (434 mg, 2,3 mmoles) y 1-hidroxibenzotriazol (695 mg, 4,5 mmoles) en diclorometano anhidro (20 ml). Se añadió trietilamina (689 mg, 6,8 mmoles) a esta disolución a temperatura ambiente en una atmósfera de argón, y entonces ésta se agitó durante la noche a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. La mezcla se lavó con solución salina saturada. Se recogió una fase orgánica, y la fase orgánica recogida se secó con sulfato de sodio. Después, la fase orgánica se filtró. El disolvente en el filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂ : CH₃OH = 9 : 1). Así se obtuvo el Compuesto 20 en forma de un jarabe incoloro (696 mg, rendimiento: 92 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

RMN ¹H (CDCl₃): δ 4,54 (d, 1H, CH), 3,58-3,67 (m, 5H), 3,52-3,56 (m, 1H, CH), 3,32-3,39 (m, 1H), 3,20-3,25 (m, 2H), 2,40-2,43 (m, 1H, CH), 2,33 (t, J = 7,3 Hz, 2H, CH₂), 2,05-2,25 (m, 2H), 1,93-2,03 (m, 1H, CH), 1,75-1,85 (m, 1H, CH), 1,50-1,73 (m, 8H), 1,37-1,46 (m, 2H, CH₂), 0,87 (s, 9H, t-Bu), 0,04 (s, 6H, SiCH₃);
EM (FAB+): m/z 415 (M⁺+1).

(4) DMTr-hidroxi-diamida-L-prolina (tipo B) (Compuesto 21)

La t-butil-dimetil-siloxi-amida-hidroxi-amida-L-prolina así obtenida (Compuesto 20) (640 mg, 1,54 mmoles) se mezcló con piridina anhidra (1 ml) y ésta se secó azeotrópicamente a temperatura ambiente. A la sustancia residual obtenida se añadieron cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (657 mg, 1,85 mmoles), DMAP (2 mg) y piridina anhidra (5 ml), y ésta se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. Después se añadió metanol (1 ml) a la misma, y ésta se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con diclorometano y ésta se lavó con disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico. Se recogió una fase orgánica y se secó con sulfato de sodio. Después, la fase orgánica se filtró. El disolvente en el filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. A la sustancia residual obtenida se añadieron acetonitrilo anhidro (5 ml) y una disolución de tetrahydrofurano que contenía 1 mol/l de fluoruro de tetrabutilamonio (1,42 ml, fluoruro de tetrabutilamonio 1,42 mmoles), y ésta se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Después de completarse la reacción se añadió acetato de etilo (100 ml) a la mezcla. La mezcla resultante se lavó con agua y luego con solución salina saturada. Se recogió una fase orgánica y se secó con sulfato de sodio. Después, la fase orgánica se filtró. El disolvente en el filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂ : CH₃OH = 95 : 5, que contenía 0,05 % de piridina). Así se obtuvo el Compuesto 21 en forma de un jarabe incoloro (680 mg, rendimiento: 73 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,41-7,44 (m, 2H, Ar-H), 7,26-7,33 (m, 4H, Ar-H), 7,18-7,21 (m, 2H, Ar-H), 7,17-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,80-6,84 (m, 4H, Ar-H), 4,51-4,53 (d, 6,8 Hz, 1H, CH), 3,79 (s, 6H, OCH₃), 3,61 (dd, 2H, J = 11 Hz, 5,4 Hz, CH₂), 3,50-3,54 (m, 1H, CH), 3,36-3,43 (m, 1H, CH), 3,20-3,26 (m, 2H, CH₂), 3,05 (t, J = 6,4 Hz, 2H, CH₂), 2,38-2,45 (m, 1H, CH), 2,30 (t, J = 7,8 Hz, 2H, CH₂), 2,05-2,25 (m, 1H, CH), 1,92-2,00 (m, 1H, CH), 1,75-1,83 (m, 1H, CH), 1,52-1,67 (m, 8H), 1,35-1,45 (m, 2H, CH₂);
EM (FAB+): m/z 602 (M⁺), 303 (DMTr⁺).

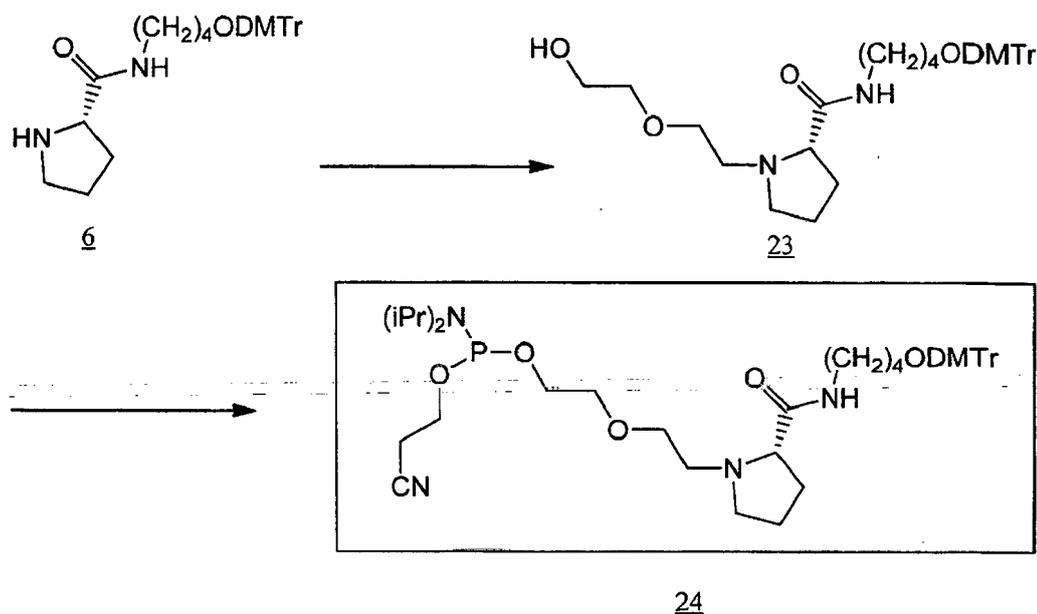
(5) Amidito de DMTr-diamida-L-prolina (tipo B) (Compuesto 22)

La DMTr-hidroxi-diamida-L-prolina así obtenida (tipo B) (Compuesto 21) (637 mg, 1,06 mmoles) se mezcló con acetonitrilo anhidro, y la mezcla resultante se secó azeotrópicamente a temperatura ambiente. A la sustancia residual obtenida se añadió tetrazolida de diisopropilamonio (201 mg, 1,16 mmoles), y la mezcla resultante se desaireó a presión reducida y se llenó con argón gas. Se añadió acetonitrilo anhidro (1 ml) a la mezcla, y adicionalmente se añadió a la misma una disolución de acetonitrilo anhidro (1 ml) de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidito (350 mg, 1,16 mmoles). Esta mezcla se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. La mezcla se diluyó con diclorometano y ésta se lavó con disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico y solución salina saturada. Se recogió una fase orgánica y se secó con sulfato de sodio. Después, la fase orgánica se filtró. El disolvente en el filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía en columna usando gel de aminosilíce como carga (eluyente: hexano : acetona = 7 : 3). Así se obtuvo el Compuesto 22 en forma de un jarabe incoloro (680 mg, pureza: 95 %, rendimiento: 76 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,41-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,25-7,32 (m, 4H, Ar-H), 7,17-7,22 (m, 2H, Ar-H), 6,80-6,83 (m, 4H, Ar-H), 4,53 (d, J = 7,8 Hz, 1H, CH), 3,75-3,93 (m, 3H), 3,79 (s, 6H, OCH₃), 3,46-3,68 (m, 5H), 3,34-3,41 (m, 1H, CH), 3,10-3,31 (m, 1H, CH), 3,05 (t, J = 6,3 Hz, 2H, CH₂), 2,62 (t, J = 6,3 Hz, 2H, CH₂), 2,39-2,46 (m, 1H, CH), 2,29 (t, 7,3 Hz, 2H, CH₂), 2,03-2,19 (m, 1H, CH), 1,90-2,00 (m, 1H, CH), 1,70-1,83 (m, 1H, CH), 1,51-1,71 (m, 8H), 1,35-1,45 (m, 2H, CH₂), 1,18 (d, J = 6,4 Hz, 6H, CH₃), 1,16 (d, J = 6,4 Hz, 6H, CH₃); RMN P (CH₃CN): δ 146,90;
EM (FAB+): m/z 803 (M⁺+1), 303 (DMTr⁺).

(Ejemplo A5)

Con el fin de producir una molécula de ácido nucleico de la presente invención que incluyera un ligador que tiene un esqueleto de prolina, amidito de DMTr-amida-etilen-oxi-etil-amino-L-prolina (denominado en lo sucesivo "tipo de espaciador PEG") se sintetizó según el Esquema 5 mostrado a continuación.



(1) DMTr-amida hidroxi-etoxi-etil-amino-L-prolina (Compuesto 23)

10 Se mezclaron juntos DMTr-amida-L-prolina (Compuesto 6) (1,00 g, 2,05 mmoles), éster 2-(2-hidroxietoxi)etilico de ácido 4-toluenosulfónico (3,10 g, 12,30 mmoles) y disolución de dimetilformamida anhidro (10 ml) de carbonato de potasio (0,85 g, 6,15 mmoles), y la mezcla resultante se agitó durante 4 días a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El disolvente en la mezcla se eliminó mediante evaporación a temperatura ambiente a presión reducida. Después se añadió diclorometano (20 ml) a la misma, y la mezcla resultante se filtró. El filtrado se concentró, y la sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía en columna de gel de sílice. Como eluyentes en la cromatografía en columna de gel de sílice se usó, primero, acetato de etilo que contenía 0,05 % de piridina, y luego se usó una mezcla de CH₂Cl₂ y CH₃OH (CH₂Cl₂ : CH₃OH = 9 : 1) que contenía 0,05 % de piridina. Como resultado se obtuvo el Compuesto 23 en forma de un jarabe incoloro (1,15 g, rendimiento: 97 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

15

20 RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,41-7,45 (m, 2H, Ar-H), 7,27-7,31 (m, 6H, Ar-H), 7,17-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,79-6,82 (m, 4H, Ar-H), 3,79 (s, 6H, OCH₃), 3,60-3,70 (m, 2H), 3,39-3,67 (m, 4H), 3,13-3,27 (m, 3H), 3,07-3,08 (m, 2H), 2,71-2,84 (m, 1H), 2,38-2,46 (m, 1H), 2,14-2,19 (m, 1H), 1,84-1,87 (m, 1H), 1,57-1,76 (m, 8H).

(2) Amidito de DMTr-amida-etilen-oxi-etil-amino-L-prolina (Compuesto 24)

25 La DMTr-amida-hidroxi-etoxi-etil-amino-L-prolina así obtenida (Compuesto 23) (0,63 g, 1,00 mmoles) se mezcló con piridina anhidra, y la mezcla resultante se secó azeotrópicamente a temperatura ambiente. A la sustancia residual obtenida se añadió tetrazolida de diisopropilamonio (206 mg, 1,20 mmoles). La mezcla resultante se desaireó a presión reducida y se llenó con argón gas. Se añadió acetonitrilo anhidro (1 ml) a la mezcla, y adicionalmente se añadió a la misma una disolución de acetonitrilo anhidro (1 ml) de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidito (282 mg, 1,12 mmoles). Esta mezcla se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Entonces, la mezcla se diluyó con diclorometano y ésta se lavó con disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico y solución salina saturada. Se recogió una fase orgánica y se secó con sulfato de sodio. Después, la fase orgánica se filtró. El disolvente en el filtrado obtenido se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía en columna usando gel de aminosílice como carga (eluyente: hexano : acetona = 7 : 3, que contenía 0,05 % de piridina). Así se obtuvo el Compuesto 24 en forma de un jarabe incoloro (0,74 g, pureza: 100 %, rendimiento: 87 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

30

35

40 RMN ¹H (CD₃CN): δ 7,41-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,28-7,31 (m, 6H, Ar-H), 7,18-7,22 (m, 1H, Ar-H), 6,84-6,86 (m, 4H, Ar-H), 3,73-3,84 (m, 2H, CH₂), 3,79 (s, 6H, OCH₃), 3,47-3,64 (m, 7H), 3,15-3,23 (m, 1H), 3,11 (t, J = 6,4 Hz, 2H, CH₂), 3,01 (t, J = 5,9 Hz, 2H, CH₂), 2,95-2,99 (m, 1H), 2,58-2,63 (m, 2H), 2,31-2,35 (m, 1H, CH), 2,03-2,19 (m, 1H, CH), 1,48-1,78 (m, 10H), 1,12-1,57 (m, 12H, CH₃);

RMN P (CD₃CN): δ 148,00;
EM (FAB+): m/z 776 (M⁺), 303 (DMTr⁺) 201 (C₈H₁₉N₂OP⁺).

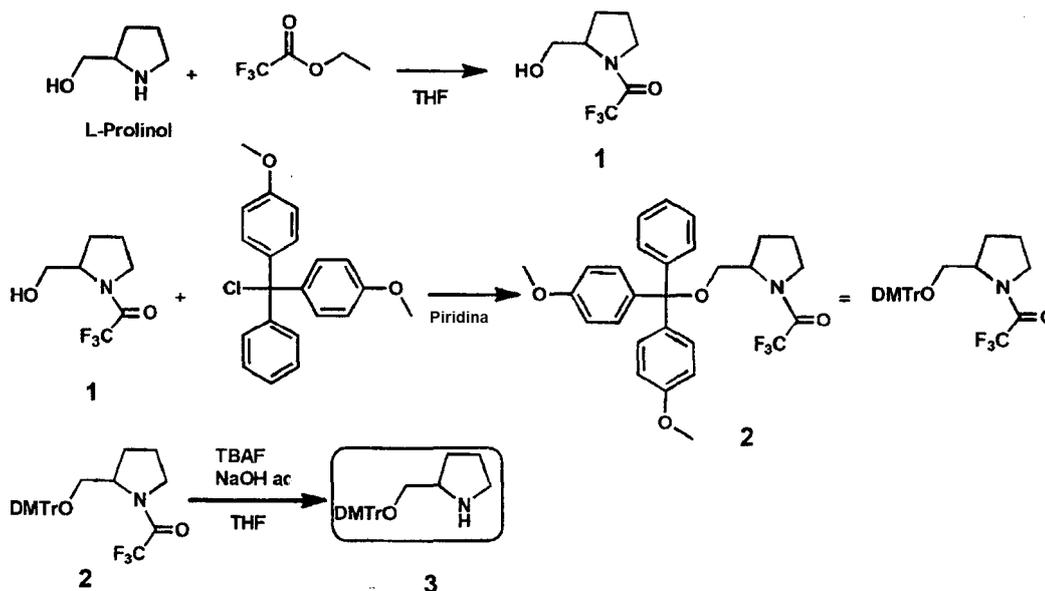
(Ejemplo A6)

5

1. Síntesis de prolinol protegido

El prolinol protegido con un grupo dimetoxitritilo (Compuesto 3) se sintetizó según el Esquema 6 mostrado a continuación,.

10



Esquema 6

(1) Trifluoroacetil-L-prolinol (Compuesto 1)

15 Se disolvió L-prolinol (2,0 g, 20 mmoles) en 20 ml de THF. Por otra parte, trifluoroacetato de etilo (3,0 g, 21 mmoles) se disolvió en 20 ml de THF. Entonces, la última disolución de THF se instiló en la primera disolución de THF que contenía el L-prolinol, y ésta se agitó durante 12 horas. Esta disolución de reacción se concentró a vacío. Así se obtuvo el Compuesto 1 (3,7 g, rendimiento: 97 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

20 RMN ¹H (CDCl₃): δ 4,28-4,23 (1,0H, m, OH), 3,90-3,41 (5H, H-2, H-5, H-6, m), 2,27-1,77 (4H, H-3, H-4, m).

(2) Trifluoroacetil-DMTr-L-prolinol (Compuesto 2)

25 El trifluoroacetil-L-prolinol así obtenido (Compuesto 1) (3,7 g, 19 mmoles) se disolvió en piridina, y la mezcla resultante se secó azeotrópicamente tres veces a temperatura ambiente. La sustancia residual obtenida se disolvió en 15 ml de piridina, y a esta mezcla se añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (DMTr-Cl) (8,1 g, 24 mmoles) mientras se agitaba la mezcla en un baño de hielo bajo argón. Se dejaron reaccionar adicionalmente durante 4 horas a temperatura ambiente. Entonces, con el fin de extinguir el exceso de DMTr-Cl, adicionalmente se añadieron 10 ml de metanol a la disolución de reacción, y ésta se agitó durante 10 minutos. Después se añadió diclorometano a la disolución de reacción, y la mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y solución salina saturada. Una fase orgánica recogida después del lavado se secó con sulfato de sodio. La fase orgánica se filtró y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente CH₂Cl₂: CH₃OH = 95 : 5, que contenía 0,1 % de piridina). Así se obtuvo el Compuesto 2 (8,5 g, rendimiento: 89 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

35 RMN ¹H, (CDCl₃): δ 7,39-7,18 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, J = 8,6 Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s, OCH₃), 3,70-3,41 (5H, H-2, H-5, H-6, m), 2,19-1,85 (4H, H-3, H-4, m).

(3) DMTr-L-prolinol (Compuesto 3)

40

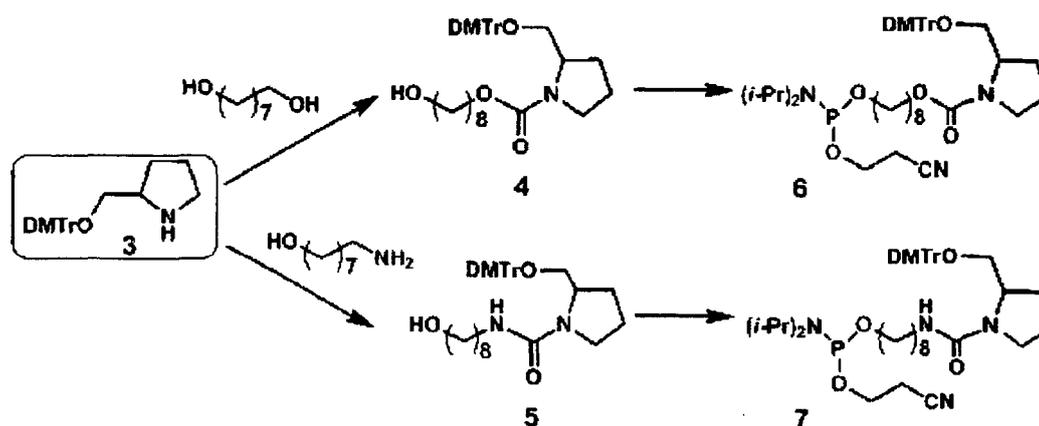
El trifluoroacetil-DMTr-L-prolinol así obtenido (Compuesto 2) (5 g, 10 mmoles) se disolvió en 100 ml de THF. 100 ml de una disolución acuosa al 5 % de hidróxido sódico se añadió a esta disolución de THF, y ésta se agitó luego. Se añadieron 5 ml de disolución 1 M de fluoruro de tetra-n-butilamonio (TBAF) a esta disolución, y ésta se agitó durante

12 horas a temperatura ambiente. Esta disolución de reacción se lavó con una disolución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y solución salina saturada. Se recogió una fase orgánica después de secarse el lavado con sulfato de sodio. La fase orgánica se filtró y el filtrado obtenido se concentró a vacío. Así se obtuvo el Compuesto 3 (3,6 g, rendimiento: 90 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

RMN ^1H , (CDCl_3): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s, OCH_3), 3,31 (1H, m, H-6), 3,07 (2H, m, H-2, H-6), 2,90 (2H, m, H-5), 1,84 (3H, m, H-3, H-4), 1,40 (1H, m, H-3).

2. Síntesis de derivado de amidito

Usando el prolinol protegido (Compuesto 3) sintetizado en el punto "1" anterior, los derivados de amidito que tienen prolinol unido en diversas formas de unión se sintetizaron según el Esquema 7 mostrado a continuación.



Esquema 7

15 (1) DMTr-uretan-L-prolinol (Compuesto 4)

Se disolvió 1,8-octanodiol (9,0 g, 62 mmoles) en 90 ml de THF, y esta disolución se dispuso bajo argón. Por otra parte, se disolvió carbonildiimidazol (2,0 g, 12 mmoles) en 10 ml de THF. La última disolución de THF se añadió a la primera disolución de THF, y ésta se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Esta disolución de reacción se lavó con agua hasta que ya no se observó una mancha del 1,8-octanodiol en CCF. Además, se recogió una fase orgánica después de que el líquido lavado se lavara con solución salina saturada y se secase con sulfato de sodio anhidro. La fase orgánica se filtró y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 95 : 5$). Así se obtuvo el compuesto del título purificado. En este compuesto, un extremo del 1,8-octanodiol se activó con carbonildiimidazol (2,3 g, rendimiento: 77 %).

Se disolvieron 0,9 g del compuesto en 10 ml de acetonitrilo, y esta disolución se puso bajo argón. Por otra parte, se disolvió DMTr-L-prolinol (Compuesto 3) (1,9 g, 4,8 mmoles) en 20 ml de acetonitrilo. La última disolución de acetonitrilo se añadió a la primera disolución de acetonitrilo, y ésta se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. Entonces, esta disolución de reacción se lavó con una disolución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y solución salina saturada. Se recogió una fase orgánica y se secó con sulfato de sodio anhidro. La fase orgánica se filtró y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: diclorometano : acetona = 9 : 1, que contenía 0,1 % de piridina). Así se obtuvo el Compuesto 4 purificado (prolinol-uretan-amidito) (1,5 g, rendimiento: 65 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

RMN ^1H (CDCl_3): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 4,24-3,94 (2H, m, COOCH_2), 3,78 (s, 6H, OCH_3), 3,72-2,96 (7H, m, alquilo, H-2, H-5, H-6), 2,10-1,30 (16H, m, alquilo, H-3, H-4);
EM-FAB: 576 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

40 (2) DMTr-ureido-L-prolinol (Compuesto 5)

Bajo argón, se disolvió trifosgeno (2,0 g, 6,7 mmoles) en 10 ml de THF, y ésta se agitó a 0 °C. Por otra parte, DMTr-L-prolinol (Compuesto 3) (1,3 g, 3,2 mmoles) y N,N-diisopropiletilamina (16 g, 124 mmoles) se disolvieron en 10 ml de THF, y esta disolución se instiló en la disolución de THF de trifosgeno. Esta disolución de reacción se agitó durante 1 hora a 0 °C y luego durante 2 horas a temperatura ambiente. Entonces, 8-amino-1-octanol (2,3 g, 16 mmoles) y N,N-diisopropiletilamina (5,0 g, 38 mmoles) se disolvieron en 30 ml de THF. La disolución de reacción que se había agitado se instiló en esta disolución de THF, y ésta se agitó durante 1 hora a 0 °C y luego durante 48 horas a temperatura ambiente. Esta disolución de reacción se concentró a vacío, y la sustancia residual obtenida se

disolvió en diclorometano. Esta disolución se lavó con una disolución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y solución salina saturada. Se recogió una fase orgánica y se secó con sulfato de sodio anhidro. La fase orgánica se filtró y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual obtenida se purificó aplicándola a cromatografía en columna de gel de sílice en fase inversa. En este momento, el eluyente usado fue un disolvente mixto de acetona y agua, que contenía 0,1 % de piridina, y la relación de mezcla entre la acetona y el agua se cambió de forma escalonada. Específicamente, la relación molar entre la acetona y el agua (acetona : agua) se cambió gradualmente de manera que fuera 2 : 8, 3 : 7, 4 : 6, y 5 : 5 en este orden. Una fracción que contiene el Compuesto 5 como compuesto diana se extrajo con diclorometano, y la fase orgánica así obtenida se secó con sulfato de sodio anhidro. La fase orgánica se filtró y el filtrado obtenido se concentró a vacío. Así se obtuvo el Compuesto 5 (prolinol-ureido-amidito) (0,9 g, rendimiento: 49 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, m, Ar-H), 3,78 (s, 6H, OCH₃), 3,68-3,25 (9H, m, CH₂NH, CH₂OH, H-2, H-5, H-6), 1,74-1,18 (16H, m, alquilo, H-3, H-4);
EM-FAB: 575 [M+H]⁺.

(3) Derivados de amidito que tienen prolinol (Compuestos 6 y 7)

Como un prolinol modificado, el Compuesto 4 así obtenido (0,80 g, 1,4 mmoles) se disolvió en acetonitrilo, y la mezcla resultante se secó azeotrópicamente tres veces a temperatura ambiente. La sustancia residual obtenida se disolvió en 1 ml de acetonitrilo, y la disolución se puso bajo argón. Se añadió tetrazolida de diisopropilamonio (0,24 g, 1,4 mmoles) a esta disolución de acetonitrilo, proporcionando así una disolución de reacción. Por otra parte, N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidito de 2-cianoetilo (0,50 g, 1,7 mmoles) se disolvió en 1 ml de acetonitrilo. Ésta se añadió a la disolución de reacción, y la mezcla resultante se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. Se añadió diclorometano a la disolución de reacción, y la mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y solución salina saturada. Se recogió una fase orgánica después de secar el líquido de lavado con sulfato de sodio anhidro. La fase orgánica se filtró y el filtrado obtenido se concentró a vacío. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía en columna de gel de aminosílice (eluyente: hexano : acetona = 10 : 1, que contenía 0,1 % de piridina). Así se obtuvo el Compuesto 6 purificado (amidito de DMTr-uretan-L-prolinol) (0,90 g, rendimiento: 83 %). El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación. RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, J = 8,6 Hz, Ar-H), 4,24-3,94 (2H, m, COOCH₂), 3,78 (s, 6H, OCH₃), 3,72-2,96 (11H, m, CH₂O, POCH₂, CHCH₃, H-2, H-5, H-6), 2,58 (2H, m, CH₂CN), 2,10-1,46 (16H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,34-1,10 (12H, m, CHCH₃); RMN ³¹P: (CD₃CN) δ 146,82; EM-FAB: 776 [M+H]⁺.

El Compuesto 7 purificado (amidito de DMTr-ureido-L-prolinol) (0,80 g, rendimiento: 74 %) se obtuvo del mismo modo que antes, excepto que, como prolinol modificado, se usó el Compuesto 5 en lugar del Compuesto 4. El resultado del análisis de RMN con respecto a este compuesto se muestra a continuación.

RMN ¹H (CDCl₃): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, m, Ar-H), 3,78 (s, 6H, OCH₃), 3,65-3,25 (13H, m, CH₂O, POCH₂, CHCH₃, H-2, CH₂NH, CH₂OH, H-2, H-5, H-6), 2,73 (2H, m, CH₂CN), 2,10-1,48 (16H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,35-1,10 (12H, m, CHCH₃);
RMN ³¹P (CD₃CN) δ 146,83;
EM-FAB: 775 [M+H]⁺.

(Ejemplo B1) Síntesis en fase sólida de ARN (no de la invención)

Se sintetizó ARN que tenía un ligador. El ARN se sintetizó a partir de su lado 3' hacia su lado 5' basándose en un procedimiento de fosforamidito con el uso de un sintetizador de ácidos nucleicos (marca registrada: ABI Expedite (registered trademark) 8909 Nucleic Acid Synthesis System, Applied Biosystems). En la síntesis, RNA Phosphoramidites (2'-O-TBDMSi, marca registrada, Samchully Pharm. Co., Ltd.) se usaron como amiditos de ARN (lo mismo se aplica en lo sucesivo). Los amiditos se desprotegeron mediante un procedimiento convencional, y los ARN sintetizados se purificaron por HPLC. En los siguientes ejemplos, la síntesis de ARN se llevó a cabo del mismo modo que en el presente ejemplo, a menos que se establezca de otro modo.

Específicamente, como ARN (Ex) del presente ejemplo se sintetizó ARNmc (PH-0001) que tiene el Compuesto 12 mostrado en el Esquema 2 como ligador. Primero se sintetizó el ARN que tiene una secuencia mostrada en SEC ID N°: 1, a continuación. Entonces, el Compuesto 12 se ligó al extremo 5' del ARN. Además, en el lado 5' del ARN mostrado en SEC ID N°: 1 se sintetizó ARN que tenía una secuencia mostrada en SEC ID N°: 2, a continuación, mediante el Compuesto 12.

5'-GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUU-3' (SEC ID N°: 1)
5'-CCAUGAGAAGUAUGACAACAGCC-3' (SEC ID N°: 2)

El ARNmc así sintetizado se denomina ARNmc (PH-0001) del presente ejemplo. Como se muestra en SEC ID N°: 3 más adelante, la estructura de PH-0001 es de forma que: la secuencia de ARN de SEC ID N°: 2 está en su lado 5'; la secuencia de ARN de SEC ID N°: 1 está en su lado 3'; y estas secuencias de ARN están ligadas entre sí mediante el

ligador Lx (es decir, el Compuesto 12). Además, como se muestra en la siguiente secuencia, la secuencia de ARN de SEC ID N°: 2 es complementaria a la secuencia de ARN de SEC ID N°: 1. Así, como se muestra en la fórmula mostrada a continuación, PH-0001 tiene una estructura de tallo como resultado de la autohibridación. En la siguiente secuencia, la parte subrayada "GUUGUCAUACUUCUCAUGG" (SEC ID N°: 4) es una región que participa en la inhibición de la expresión del gen GAPDH.

Ex: PH-0001 (SEC ID N°: 3)

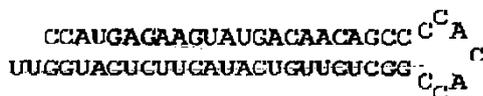
5'-CCAUGAGAAGUAUGACAACAGCC-Lx-GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUU-3'



Por otra parte, como ARN de un ejemplo comparativo sin un ligador, el siguiente ARNhs (NH-0001) se sintetizó como un control positivo de iARN (Pc). Como se muestra a continuación, en este NH-0001, la secuencia de la región 5' indicada con letras mayúsculas es la misma que en PH-0001, es decir, la secuencia de ARN de SEC ID N°: 2 y la secuencia de la región 3' indicada con letras mayúsculas es la misma que en PH-0001, es decir, la secuencia de ARN de SEC ID N°:1. Entre la secuencia de ARN de SEC ID N°: 2 y la secuencia de ARN de SEC ID N°: 1, NH-0001 tiene la secuencia de ARN indicada con letras minúsculas como ligador, en lugar del Compuesto 12. Similarmente a PH-0001, NH-0001 forma un tallo por autohibridación, teniendo así una estructura de ARNhc, como se muestra en la fórmula mostrada a continuación. En la siguiente secuencia, la parte subrayada "GUUGUCAUACUUCUCAUGG" (SEC ID N°: 4) es una región que participa en la inhibición de la expresión.

Pc: NH-0001(SEC ID N°: 5)

5'-CCAUGAGAAGUAUGACAACAGCCcaccaccGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUU-3'



(Ejemplo B2) Efecto inhibitor sobre la expresión del gen GAPDH en células HCT116 (no de la invención)

Se examinó la inhibición de la expresión del gen GAPDH *in vitro*.

(1) Materiales y procedimiento

Como ARN (Ex) del presente ejemplo se usó ARNmc (PH-0001) del Ejemplo B1. Se prepararon disoluciones de ARN disolviendo el ARN en agua destilada para inyección (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., en lo sucesivo igual) de manera que se logaran las concentraciones deseadas (1 µmol/l, 5 µmol/l y 25 µmol/l).

Se usaron células HCT116 (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) como células. Se usó medio McCoy's 5A que contenía 10 % de SBF (Invitrogen) como medio. Las condiciones de cultivo se fijaron a 37 °C y 5 % de CO₂.

Primero, las células HCT116 se cultivaron en el medio y se dispensaron a una placa de 24 pocillos de manera que cada pocillo contuviera 400 µl del medio para lograr una densidad de 2 × 10⁴ células/pocillo. Las células en el pocillo se cultivaron durante otras 24 horas. Después, las células se transfectaron con el ARN usando el reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según el protocolo suministrado con el mismo. Específicamente, la transfección se llevó a cabo fijando la composición por pocillo del siguiente modo. La concentración final del ARN en el pocillo se fijó a 1 nmol/l, 5 nmol/l o 25 nmol/l.

[Tabla 1]
(Composición por pocillo: µl)

Medio	400
(A) Lipofectamine 2000	1,5
(B) Opti-MEM (Invitrogen)	98
(C) Disolución de ARN	0,5
Total	500

Después de la transfección, las células en los pocillos se cultivaron durante 24 horas, y luego se recogió el ARN usando el kit RNeasy Mini (Qiagen, Los Países Bajos) según el protocolo suministrado con el mismo. Posteriormente, el ADNc se sintetizó a partir del ARN usando una transcriptasa inversa (marca registrada: SuperScript III, Invitrogen) según el protocolo suministrado con la misma. Entonces, como se describe más adelante, la PCR se llevó a cabo usando el ADNc así sintetizado como molde, y se midieron el nivel de expresión del gen GAPDH y el del gen β -actina como patrón interno. El nivel de expresión del gen GAPDH se corrigió con referencia al del gen β -actina.

La PCR se llevó a cabo usando LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (marca registrada, Roche) como reactivo y Light Cycler DX400 (marca registrada, Roche) como instrumento (en lo sucesivo igual). El gen GAPDH y el gen β -actina se amplificaron usando los siguientes conjuntos de cebadores, respectivamente.

Conjunto de cebadores de PCR para el gen GAPDH

5'-GGAGAAGGCTGGGGCTCATTTGC-3' (SEC ID N°: 7)
5'-TGGCCAGGGGTGCTAAGCAGTTG-3' (SEC ID N°: 8)

Conjunto de cebadores para el gen β -actina

5'-GCCACGGCTGCTTCCAGCTCCTC-3' (SEC ID N°: 9)
5'-AGGCTTTGCGGATGTCCACGTCAC-3' (SEC ID N°: 10)

Como control 1 también se midieron las cantidades de los genes expresados (-) con respecto a las células a las que se habían añadido 100 μ l de la disolución (B) sola. Además, como control 2 también se midió el nivel de expresión del gen (vacío) con respecto a las células sometidas a los mismos procedimientos de transfección que antes, excepto que no se añadió la disolución de ARN y que se añadieron (B) y 1,5 μ l de (A) de manera que la cantidad total de (A) y (B) fuera 100 μ l.

Entonces, el nivel de expresión corregido del gen GAPDH en el control (-) se fijó como 1, y el nivel de expresión en las células transfectadas con el ARN a cada concentración se presentó como el valor relativo con respecto al valor en el control (-).

(2) Resultados

Los resultados del mismo se muestran en la FIG. 4. La FIG. 4 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH, y el eje vertical indica el nivel de expresión génica relativa. Como puede apreciarse de la FIG. 4, la actividad inhibitora de PH-0001 del Ejemplo B1 no se alteró. Por tanto, se considera que PH-0001 es estabilizado por el Compuesto 12 como ligador de la presente invención.

(Ejemplo B3) Estabilidad en suero humano (no de la invención)

Con respecto al ARN se examinó la estabilidad en suero humano.

(1) Materiales y procedimiento

Como ARN (Ex) del presente ejemplo se usó ARNmc (PH-0001) del Ejemplo B1. Como ARN de un ejemplo comparativo se usó ARNhc (NH-0001) como control positivo de iARN (Pc) usado en el Ejemplo B1.

Primero, cada uno de los ARN y suero humano normal (MP Biomedicals) se mezclaron en 1 \times PBS, y 30 μ l de esta mezcla se incubaron a 37 °C. En 30 μ l de la mezcla, la cantidad del ARN añadida se fijó a 60 μ mol, y la cantidad del suero humano normal añadido se fijó de manera que la concentración final de la misma fuera del 10 %. Entonces, 0 horas, 0,5 horas, 1 hora y 2 horas después del inicio de la incubación la reacción se terminó por extracción con fenol y cloroformo. El extracto líquido obtenido se sometió a electroforesis usando 15 % de gel de poliacrilamida. Después, el gel se tiñó con SYBR Green II (marca registrada, Lonza) y luego se analizó usando E-BOX-VX2 (M & S Instruments Inc., Tokyo).

(2) Resultados

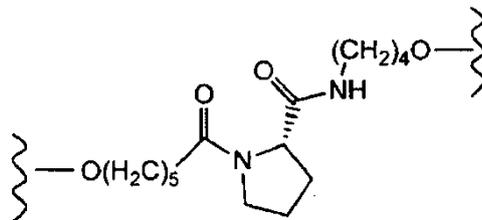
Los resultados del mismo se muestran en la FIG. 5. La FIG. 5 es un electroforetograma que muestran la estabilidad. En la FIG. 5, el carril "M" indica un marcador de peso molecular, y "(h)" indica el tiempo de incubación.

Como puede apreciarse de la FIG. 5, con respecto a NH-0001 del ejemplo comparativo compuesto por un nucleótido natural, se encontró que una rápida reacción de degradación se inició ya 0,5 horas después del inicio de la incubación, y como resultado, los tamaños del ARN en todos los momentos de tiempo de 0,5 a 2 horas después del inicio de la incubación fueron más pequeños que el tamaño del ARN a 0 horas después del inicio de la incubación. A diferencia, con respecto a PH-0001 del ejemplo que incluye el ligador, sustancialmente no se observó ningún cambio

en la movilidad con el tiempo de incubación, es decir, sustancialmente ninguna disminución en el peso molecular debido a la degradación. Estos resultados demuestran que el ARN que tiene el ligador puede conseguir una estabilidad mejorada en suero humano.

5 (Ejemplo B4) Efecto inhibitor sobre la expresión del gen GAPDH en células HCT116

Se sintetizó ARNmc que incluye un ligador que contiene prolina representado por la siguiente fórmula, y se examinó el efecto inhibitor del ARNmc sobre el gen GAPDH.



10

(1) Materiales y procedimiento

(1.1) Síntesis en fase sólida de ARNmc

15

El ARN se sintetizó basándose en un procedimiento de fosoramidito del mismo modo que en el Ejemplo B1.

Como ARN (Ex) del presente ejemplo se usó el ARNmc (PK-0004) mostrado a continuación. En la siguiente secuencia, "Lx" y "Ly" son cada uno el ligador que contiene prolina representado por la fórmula anterior (mostrada en el párrafo [0275]). En la síntesis del ARNmc, el ARNmc se sintetizó a partir de su lado 3' usando los amiditos de ARN (marca registrada "RNA Phosphoramidites", Samchully Pharm. Co., Ltd.) según SEC ID N°: 11. En los sitios de "Lx" y "Ly" se ligaron amiditos de DMTr-diamida-L-prolina (Compuestos 10 en el Esquema 3) sintetizados en el Ejemplo A3-1. En la secuencia, "GUUGUCAUACUUCUCAUGG" (SEC ID N°: 4) es una región que participa en la inhibición de la expresión.

25

Ex ARNmc (SEC ID N°: 11)



30

Como ARN de un ejemplo comparativo se usó ARNmc (PK-0003) como control negativo de iARN (Nc). En la siguiente secuencia, "Lx" y "Ly" son cada uno el ligador que contiene prolina representado por la fórmula anterior (mostrada en el párrafo [0275]). En la síntesis del ARNmc, el ARNmc se sintetizó a partir de su lado 3' usando los amiditos de ARN (marca registrada "RNA Phosphoramidites", Samchully Pharm. Co., Ltd.) según SEC ID N°: 12. En los sitios de "Lx" y "Ly" se ligaron amiditos de DMTr-diamida-L-prolina sintetizados en el Ejemplo A3 (Compuestos 10 en el Esquema 3). Este ARNmc se diseñó de manera que incorporara una secuencia de control negativo en lugar de la secuencia inhibidora de la expresión.

35

NC ARNmc (SEC. ID N°: 12)



40

(1.2) Inhibición de la expresión génica

Se preparó disolución de ARN disolviendo cada uno de los ARN que se habían criopreservado en agua destilada para inyección (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) de manera que se lograra una concentración de 20 µmol/l.

45

Usando la disolución de ARN, el nivel de expresión del gen GAPDH en células HCT116 se midió del mismo modo que en el Ejemplo B2. En la transfección, la composición por pocillo se fijó del siguiente modo. En la siguiente composición, (B) es Opti-MEM (Invitrogen), (C) es la disolución de ARN de 20 µmol/l, y se añadieron de manera que la cantidad total de la misma fuera 98,5 µl. La concentración final del ARN en el pocillo se fijó a 1 nmol/l, 3 nmol/l o 10 nmol/l.

50

[Tabla 2]
(Composición por pocillo: µl)

Medio	400
(A) Lipofectamine 2000	1,5
(B) + (C)	98,5
Total	500

(2) Resultados

5 Los resultados del mismo se muestran en la FIG. 6. La FIG. 6 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH. Como puede apreciarse de la FIG. 6, PK-0004 del ejemplo que tiene el ligador de la presente invención presentó una potente actividad inhibitora, y la actividad fue dependiente de la dosis. Por otra parte, no se observó efecto inhibitor cuando se usó PK-0003 como control negativo.

10 (Ejemplo B5) Reactividad de proteína Dicer

Se examinó la reactividad de una proteína Dicer humana recombinante con ARNmc que se había sometido a sustitución con un ligador que tiene prolina.

15 (1) Materiales y procedimiento

Como ARN (Ex) del presente ejemplo se usó ARNmc (PK-0004) del Ejemplo B4. Como ARN de un ejemplo comparativo se usaron ARNmc (PK-0003) como control negativo de iARN (Nc) mostrado en el Ejemplo B4 y ARNmc (NK-0016) mostrado a continuación como control positivo de iARN (Pc). La estructura de NK-0016 es de forma que las secuencias de la región del lado 5' (Xc), la región del lado 5' interna (X), la región del lado 3' (Yc) y la región del lado 3' interna (Y) son las mismas que aquellas en PK-0004, y entre Xc y X y entre Yc y Y se proporcionaron polinucleótidos como ligadores en lugar de los ligadores (Lx, Ly) representados por la fórmula anterior (mostrada en el párrafo [0275]) usados en PK-0004.

25 Pc : NK-0016 (SEC ID N°: 13)



Se preparó una disolución de reacción que contenía la proteína Dicer y cada uno de los ARN usando Coldshock-DICER (marca registrada, Takara Bio Inc.) como reactivo según el protocolo suministrado en su interior. Esta disolución de reacción se incubó a 37 °C. El tiempo de incubación se fijó a 0, 3, 6 o 9 horas. A la disolución de reacción que se había sometido al tiempo de incubación predeterminado se añadió una disolución de terminación de la reacción que acompañaba al reactivo. Entonces, la disolución se sometió a electroforesis usando 15 % de gel de poliacrilamida. Después, el gel se tiñó con SYBR Green II (marca registrada, Lonza) luego se analizó usando E-BOX-VX2 (marca registrada, M & S Instruments Inc.).

35 (2) Resultados y consideración

Los resultados del mismo se muestran en la FIG. 7. La FIG. 7 muestra los resultados de electroforesis, que indican la reactividad de la proteína Dicer con el ARNmc. En la FIG. 7, el carril "M" indica un marcador de peso molecular (20 pb, 30 pb, 40 pb, 60 pb) y "(h)" indica el tiempo de incubación.

NK-0016 del ejemplo comparativo compuesto por un nucleótido natural reaccionó rápidamente con la proteína Dicer y desapareció antes de un periodo de 9 horas desde el inicio de la incubación. A diferencia, los ARN que tenían el ligador que contenía prolina, es decir, PK-0004 del ejemplo y PK-0003 como control negativo, reaccionaron gradualmente con la proteína Dicer, de manera que no desaparecieron completamente incluso 9 horas después del inicio de la incubación. A partir de estos resultados se encontró que la estabilidad en células mejora incorporando un ligador que contiene prolina. Es decir, considerando estos resultados junto con los resultados obtenidos con respecto al efecto inhibitor del gen, se concluye que el ARN de la presente invención que tiene un ligador que contiene prolina tiene un efecto de mejora de la durabilidad del efecto de interferencia por ARN en células.

50 (Ejemplo B6) Efecto inhibitor sobre la expresión del gen GAPDH en células A549 y células 293

Se examinó la inhibición de la expresión del gen GAPDH *in vitro* usando ARNmc que se había sometido a sustitución con un ligador que tiene prolina.

55 (1) Materiales y procedimiento

Como ARN (Ex) del presente ejemplo se usó ARNmc (PK-0004) del Ejemplo B4. Como ARN de un ejemplo comparativo se usó ARNmc (PK-0003) como control negativo de iARN (Nc) mostrado en el Ejemplo B4. Se preparó

(1) Materiales y procedimiento

(1.1) Síntesis de ARNmc en fase sólida

5 Como ARN del presente ejemplo se sintetizaron PK-0007, PK-0026, PK-0027 y PK-0028 mostrados a continuación. Los ARN se sintetizaron del mismo modo que en el Ejemplo B4, a menos que se establezca de otro modo. Como amiditos para la síntesis de ligadores se usó L-prolina-diamida-amidito (Compuesto 10 en el Esquema 3) sintetizado en el Ejemplo A3-1. Cada uno de los ARN incluye la siguiente secuencia 21-mera que inhibe la expresión del gen TGF-β1. Esta secuencia se diseñó basándose en el ARNip usado por Cheng y col. (Mol. Pharm., 2009, 6, pág. 772-10 779). En las siguientes secuencias, "*" indica una base desapareada. Secuencia inhibidora de la expresión del gen TGF-β1 (SEC ID N°: 18)

5'-AAAGUCA AUGUACAGCUGCUU-3'

15 PK-0007 (SEC ID N°: 14)



PK-0026 (SEC ID N°: 15)

20



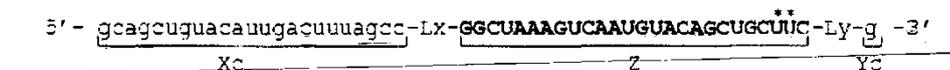
PK-0027 (SEC ID N°: 16)

25



PK-0028 (SEC ID N°: 17)

30



(1.2) Inhibición de la expresión génica

35

Se preparó disolución de ARN disolviendo cada uno de los ARN que se habían criopreservado en agua destilada para inyección (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) de manera que se lograra una concentración de 20 μmol/l.

Se usaron células Hepa1-6 (The RIKEN BioResource Center) como células, y como medio se usó DMEM que contenía 10 % de SBF (Invitrogen). Las condiciones de cultivo se fijaron a 37 °C y 5 % de CO₂.

40

Primero, las células Hepa1-6 se cultivaron en el medio y se dispensaron a una placa de 24 pocillos de manera que cada pocillo contuviera 400 μl del medio para lograr una densidad de 3 × 10⁴ células/pocillo. Entonces, la transfección del ARNmc a las células Hepa1-6, recogida de ARN y síntesis de ADNc se llevaron a cabo del mismo modo que en el Ejemplo B4, excepto que se usó la disolución de ARN anterior. En la transfección, la concentración final del ARN en el pocillo se fijó a 1 nmol/l. Entonces, la PCR se llevó a cabo del mismo modo que en el Ejemplo B4, excepto que se usaron el siguiente conjunto de cebadores de PCR para el gen TGF-β1 y el siguiente conjunto de cebadores para el gen β-actina como cebadores, y se midieron el nivel de expresión del gen TGF-β1 y el del gen β-actina como patrón interno. El nivel de expresión del gen TGF-β1 se corrigió con referencia al nivel de expresión del gen β-actina.

50

Conjunto de cebadores de PCR para el gen TGF-β1

5'-CCATTGCTGTCCCGTG CAGAGCTG-3' (SEC ID N°: 19)
5'-ATGGTAGCCCTTGGGCTCGTGGATC-3' (SEC ID N°: 20)

55

Conjunto de cebadores para el gen β-actina

5'-GTCGTACCACAGGCATTGTGATGG-3' (SEC ID N°: 21)
5'-GCAATGCCTGGGTACATGGTGG-3' (SEC ID N°: 22)

NI-0031

5'- GUGUCAGUGCUCAUUUACAAG -3' (SEC ID N°: 28)
 3' - UUCACAGUCACGAGUAAAUGU -5' (SEC ID N°:29)

Se preparó disolución de ARN disolviendo 100 µg de cada uno de los ARN en 75 µl de solución salina fisiológica estéril. Por otra parte se preparó una disolución de LPS disolviendo 100 µg de lipopolisacárido (LPS) en 50 µl de solución salina fisiológica estéril.

Primero, 80 µl de la disolución de ARN se instilaron en la tráquea de ratones. Entonces, 1 hora después de la instilación, 50 µl de la disolución de LPS se instilaron en la tráquea de los ratones para inducir lesión pulmonar.

Como control negativo para el LPS se usaron 50 µl de solución salina fisiológica estéril que no contenía LPS en lugar de la disolución de LPS. Por tanto, como control negativo para la disolución de ARN se usaron 80 µl de solución salina fisiológica estéril.

Los grupos de administración se muestran a continuación. En cada grupo de administración se usaron de cuatro a seis ratones.

Grupo de administración 1:

5 minutos después de la administración de 75 µl de solución salina fisiológica estéril se administraron 50 µl de solución salina fisiológica estéril.

Grupo de administración 2:

5 minutos después de la administración de 75 µl de solución salina fisiológica estéril se administraron 50 µl de la disolución de LPS.

Grupo de administración 3:

5 minutos después de la administración de 75 µl de la disolución de ARN (PK-0007) se administraron 50 µl de la disolución de LPS.

Grupo de administración 4:

5 minutos después de la administración de 75 µl de la disolución de ARN (PK-0008) se administraron 50 µl de la disolución de LPS.

Grupo de administración 5:

5 minutos después de la administración de 75 µl de la disolución de ARN (NK-0033) se administraron 50 µl de la disolución de LPS.

Grupo de administración 6:

5 minutos después de la administración de 75 µl de la disolución de ARN (N-0035) se administraron 50 µl de la disolución de LPS.

Grupo de administración 7:

5 minutos después de la administración de 75 µl de la disolución de ARN (NI-0030) se administraron 50 µl de la disolución de LPS.

Grupo de administración 8:

5 minutos después de la administración de 50 µl de la disolución de ARN (NI-0031) se administraron 50 µl de la disolución de LPS.

(1.2) Muestreo de líquido de lavado broncoalveolar (BALF)

24 horas después de la instilación de la disolución de LPS o solución salina fisiológica estéril (control negativo para LPS), los ratones se sacrificaron administrando un exceso de pentobarbital a sus cavidades abdominales. Sus pulmones se recogieron y se usaron muestras.

Con respecto a cada muestra de pulmón de los ratones, el nivel de expresión del gen TGF- β 1 por unidad de peso de pulmón se midió usando un ELISA colorimétrico Quantikine de TGF- β 1 (marca registrada, R&D Systems).

(2) Resultados

5 Los resultados del mismo se muestran en la FIG. 13. La FIG. 13 es una gráfica que muestra el nivel de expresión del gen TGF- β 1 por unidad de peso de pulmón en cada grupo de administración, y el eje horizontal indica la cantidad de proteína TGF- β 1 expresada. En el grupo de administración 3 (LPS (+)/PK-0007 (+)), el nivel de expresión del gen TGF- β 1 se inhibió sustancialmente en comparación con el del grupo de administración 2 (LPS (+)/ARNmc (-)). Se
10 encontró que este efecto inhibitorio era más fuerte que aquellos en el grupo de administración 5 (LPS (+)/control positivo NK-0033 (+)) y el grupo de administración 7 (LPS (+)/control positivo NI-0030). En el grupo de administración 4 (control negativo PK-0008 (+)), el grupo de administración 6 (control negativo NK-0035 (+)) y el grupo de administración 8 (control negativo NI-0031 (+)) no se observó efecto inhibitorio.

15 (A10-2) Efecto inespecífico *in vivo*

Se examinó el efecto inespecífico *in vivo* y se evaluó el efecto secundario usando ARNmc que se había sometido a sustitución con un ligador que tiene prolina.

20 Como ARN del presente ejemplo se usó el ARNmc (PK-0007) del Ejemplo B9. Como ARN de un ejemplo comparativo se usó ARNmc (PK-0008) como control negativo de iARN (Nc) mostrado en el Ejemplo A10-1. Se preparó disolución de ARN disolviendo 100 μ g de cada uno de los ARN en 75 μ l de solución salina fisiológica estéril.

25 Los grupos de administración se muestran a continuación. En cada grupo de administración se usaron de dos a cuatro ratones.

Grupo de administración 1:

30 Se administraron 75 μ l de solución salina fisiológica estéril.

Grupo de administración 2:

Se administraron 75 μ l de la disolución de ARN (PK-0007).

35 Grupo de administración 3:

Se administraron 75 μ l de la disolución de ARN (PK-0008).

40 Entonces, 24 horas después de la administración, los ratones se sacrificaron del mismo modo que en el Ejemplo B10-1. Se recogieron muestras de sangre por punción de los corazones de los ratones. Cada muestra de sangre se añadió a un tubo de ensayo que contenía una disolución acuosa al 3,8 % de citrato de sodio. La cantidad (volumen) de la disolución acuosa de citrato de sodio se fijó a 1/10 de la muestra de sangre. Se recogió muestra de BALF (líquido de lavado broncoalveolar) de esta mezcla de un modo descrito en Yasui y col. (Am J Respir Crit Care Med 2001; 163: 1660-8). Se midieron las cantidades de TNF- α e IFN- β en el sobrenadante de la muestra de BALF

45 Se midieron la cantidad de TNF- α y la cantidad de IFN- β en cada sobrenadante. La cantidad de TNF- α se cuantificó usando Mouse TNF set II (marca registrada, Beckton Dickinson and Company) según sus instrucciones para uso. La cantidad de IFN- β se cuantificó usando una placa de ELISA producida usando Rabbit Anti-Mouse Interferon β (marca registrada, PBL Interferon Source) y Biotin Labeling Kit-NH2 (marca registrada, Dojindo Laboratories) según sus
50 instrucciones para su uso.

Los resultados del mismo se muestran en la FIG. 14. La FIG. 14A es una gráfica que muestra la cantidad de TNF- α en la muestra de BALF en cada grupo de administración, y la FIG. 14B es una gráfica que muestra la cantidad de IFN- β en la muestra de BALF en cada grupo de administración. En las FIG. 14A y 14B, los ejes horizontales indican
55 las cantidades respectivas. En el grupo de administración 2 (PK-0007 (+)) según el presente ejemplo no se provocaron las expresiones de TNF- α e IFN- β , en comparación con el grupo de administración 1 (ARNmc (-)).

(Ejemplo B11) Resistencia a ribonucleasa

60 Se examinó la resistencia a ribonucleasa con respecto al ARNmc de la presente invención.

(1) Materiales y procedimiento

65 Como ARN (Ex) del presente ejemplo se usó ARNmc (PK-0007) del Ejemplo B9. Además, como ARN de un ejemplo comparativo se usó ARNbc (NI-0030) como control positivo (Pc) mostrado en el Ejemplo B10-1.

Primero, 60 pmoles de cada uno de los ARN anteriores, 5×10^{-5} unidades de RNasa A (Roche) y 5×10^{-5} unidades de RNasa T1 (marca registrada, Roche) se mezclaron con 20 mmoles/l de Tris-HCl (pH 8), y la mezcla resultante se incubó a 37 °C. 10 minutos, 20 minutos y 30 minutos después del inicio de la incubación la reacción de las RNasas se terminó según un procedimiento convencional. Entonces, la disolución de reacción se sometió a electroforesis usando 15 % de gel de poliacrilamida. Después, el gel se tiñó con SYBR Green II (marca registrada, Lonza) y luego se analizó usando E-BOX-VX2 (marca registrada, M & S Instruments Inc., Tokio).

(2) Resultados

Los resultados del mismo se muestran en la FIG. 15. La FIG. 15 es un electroforetograma que muestra resistencia a ribonucleasa. En la FIG. 15, el carril "M" indica un marcador de peso molecular y "(min)" indica el tiempo de incubación.

Como puede apreciarse de la FIG. 15, NI-0030 del ejemplo comparativo compuesto por un nucleótido natural se degradó casi completamente después de 10 minutos de incubación. A diferencia, PK-0007 del ejemplo todavía permaneció incluso después de 10 minutos de incubación. Estos resultados demuestran que el ARNmc de la presente invención es superior al ARNbc en resistencia a ribonucleasa.

(Ejemplo B12) Resistencia a nucleasa

Se examinó la resistencia a nucleasa con respecto al ARNmc de la presente invención.

(1) Materiales y procedimiento

Como ARN (Ex) del presente ejemplo se usó ARNmc (PK-0007) del Ejemplo B9. Como ARN de un ejemplo comparativo se usó ARNbc (NI-0030) como control positivo de iARN (Pc) mostrado en el Ejemplo B10-1.

Primero, 60 pmoles de cada ARNmc y 0,6 unidades de nucleasa S7 (Roche) se mezclaron con 50 mmoles/l de Tris-HCl (pH8) que contenían 5 mmoles/l de CaCl_2 , y la mezcla resultante se incubó a 37 °C. 0,5 horas después del inicio de la incubación (0 h), la reacción de la nucleasa S7 se terminó según un procedimiento convencional. Entonces, la disolución de reacción se sometió a electroforesis usando urea 7 M-15 % de gel de poliacrilamida según un procedimiento convencional. Después, el gel se tiñó con SYBR Green II (marca registrada, Lonza) y luego se analizó usando E-BOX-VX2 (marca registrada, M & S Instruments Inc.).

(2) Resultados

Los resultados del mismo se muestran en la FIG. 16. La FIG. 16 es un electroforetograma que muestran resistencia a nucleasa S7. En la FIG. 16, el carril "M" indica un marcador de peso molecular y "(h)" indica el tiempo de incubación.

Como puede apreciarse de la FIG. 16, NI-0030 del ejemplo comparativo compuesto por un nucleótido natural se degradó casi completamente después de 0,5 horas de incubación. A diferencia, PK-0007 del ejemplo todavía permaneció incluso después de 0,5 horas de incubación. Estos resultados demuestran que el ARNmc de la presente invención es superior al ARNbc en resistencia a nucleasa S7.

De los resultados respectivos obtenidos en los Ejemplos B se encontró que el PNmc de la presente invención puede construirse, por ejemplo, independientemente del tipo de un gen diana. Así, puede decirse que la molécula de PNmc de la presente invención es una herramienta versátil novedosa que puede usarse para inhibir la expresión de un gen diana sin depender del tipo de gen diana.

(Ejemplo de referencia 1)

Se examinó la inhibición de la expresión del gen GAPDH *in vitro* usando ARNmc que tienen una base desapareada en diferentes posiciones.

(1) Materiales y procedimiento

Como ARN se usaron ARNmc mostrados en la FIG. 17. En la FIG. 17, los números a la derecha indican números de identificación de secuencias. En la FIG. 17, desde el lado 5', una región indicada con letras minúsculas subrayadas es la región (Xc); una región indicada con letras mayúsculas subrayadas es la región interna (Z); y una región indicada con letras minúsculas subrayadas es la región (Yc). Una región entre Xc y Z es una región de ligador (Lx), y una región entre Z y Yc es una región de ligador (Ly). Por tanto, "Xc/Yc" indica la relación entre la longitud de bases (Xc) de la región (Xc) y la longitud de bases (Yc) de la región (Yc). En la FIG. 17, "*" indica una base desapareada.

En cada uno de los ARNmc, la longitud de bases de la región interna (Z) se fijó a 26, la longitud de bases de la región de ligador (Lx) se fijó a 7 y la longitud de bases de la región de ligador (Ly) se fijó a 4. En NK-0036 y NK-0040,

NK-006 3 (SEC ID N°:57)



5 NK-0066 (SEC ID N°: 58)



- 10 La transfección a células A549 se llevó a cabo del mismo modo que en el Ejemplo B6, excepto que se usó cada uno de los ARN anteriores, y las células se cultivaron durante 48 horas. La concentración de ARN en el momento de la transfección se fijó a 3 nmol/l. Entonces, la recogida de ARN, síntesis de ADNc y PCR se llevaron a cabo del mismo modo que en el Ejemplo B2, excepto que como cebador se usó un conjunto de cebadores para el gen LMNA mostrado a continuación, y se midieron el nivel de expresión del gen LMNA y el del gen β-actina como patrón interno. El nivel de expresión del gen LMNA se corrigió con referencia al del gen β-actina como patrón interno.
- 15 Conjunto de cebadores para el gen LMNA

5'-CTGGACATCAAGCTGGCCCTGGAC-3' (SEC ID N°: 59)

5'-CACCAGCTTGCGCATGGCCACTTC-3' (SEC ID N°: 60)

- 20 Con respecto al control 1 (-) y al control 2 (vacío), las cantidades de expresión también se midieron del mismo modo que en el Ejemplo B2. Entonces, el nivel de expresión corregida del gen LMNA en el control (-) se fijó como 1, y el nivel de expresión en las células transfectadas con cada ARN se presentó como el valor relativo con respecto al valor en el control.

25 (2) Resultados

- Los resultados del mismo se muestran en la FIG. 21. La FIG. 21 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen LMNA en las células A549. Como puede apreciarse de la FIG. 21, todos estos ARNmc presentaron actividades inhibitoras. Además, NK-0066 en el que la 2ª base del extremo 3' de la región interna (Z) es la base desapareada presentó una mayor actividad inhibitora que NK-0063 en el que la 4ª base del extremo 3' de la región interna (Z) es la base desapareada. Estos resultados concuerdan con los comportamientos presentados en los Ejemplos de referencia 1 a 3 referidos a diferentes genes diana.
- 30

- De los resultados obtenidos en los Ejemplos de referencia 1 a 4 es evidente que, por ejemplo, con respecto a la posición de la base desapareada, se presentan comportamientos similares independientemente del tipo de gen diana y una secuencia inhibitora de la expresión para el gen diana. Además, ya se ha descrito anteriormente que el Ejemplo B9 presentó un comportamiento similar a aquellos de los ejemplos de referencia.
- 35

(Ejemplo de referencia 5)

- 40 Se examinó inhibición de la expresión del gen GAPDH *in vitro* usando ARNmc variando la longitud de cada una de la región del lado 5' interna (X), la región del lado 5' (Xc), la región del lado 3' interna (Y) y la región del lado 3' (Yc) .

(1) Materiales y procedimiento

- 45 Como ARN se usaron ARNmc mostrados en la FIG. 22. En la FIG. 22, los números a la derecha indican números de identificación de secuencias. En la FIG. 22, desde el lado 5', una región indicada con letras minúsculas subrayadas es la región (Xc); una región indicada con letras mayúsculas subrayadas es la región interna (Z); y una región indicada con letras minúsculas subrayadas es la región (Yc). Por tanto, "Xc+Yc/X+Y" indica la relación entre la longitud de bases total de las regiones (Xc) y (Yc) y la longitud de bases total de las regiones (X) y (Y). En la FIG. 22, "*" indica una base desapareada.
- 50

- En cada uno de los ARNmc, la longitud de bases de la región de ligador (Lx) se fijó a 7, la longitud de bases de la región de ligador (Ly) se fijó a 4, la longitud de bases de la región (Yc) se fijó a 1 y la 2ª base del lado 3' de la región interna (Z) se fijó para ser una base desapareada. Entonces se cambiaron la longitud de bases de la región interna (Z) y la longitud de bases de la región (Xc).
- 55

- A menos que se establezca de otro modo, la transfección de cada uno de los ARN a células HCT116, cultivo, recogida de ARN, síntesis de ADNc y PCR se llevaron a cabo del mismo modo que en el Ejemplo B2, y se calculó el nivel de expresión relativa del gen GAPDH. La transfección se llevó a cabo fijando la composición por pocillo para que fuera la misma que la mostrada en la Tabla 2 en el Ejemplo B4.
- 60

(2) Resultados y consideración

Los resultados del mismo se muestran en la FIG. 23. La FIG. 23 es una gráfica que muestra el nivel de expresión relativa del gen GAPDH cuando cada uno de los ARN se usó a la concentración final de 1 nmol/l. Como puede apreciarse de la FIG. 23, se encontró que todos los ARNmc que tenían diversas longitudes de las regiones (X), (Xc), (Y) y (Yc) inhibieron la expresión del gen GAPDH.

Aunque la presente invención se ha descrito anteriormente con referencia a realizaciones ilustrativas y ejemplos, la presente invención no se limita en absoluto a éstos.

Aplicabilidad industrial

Según la molécula de PNmc de la presente invención es posible inhibir la expresión de un gen. Además, como la molécula de PNmc no es circular, puede sintetizarse fácilmente. Por tanto, como la molécula de PNmc es de una sola hebra, no es necesaria una etapa de hibridación como se requiera en la producción de una hebra doble, de manera que puede producirse eficazmente. Además, como la región de ligador incluye el (los) residuo(s) de no nucleótido, no solo son posibles, por ejemplo, alteraciones convencionales a residuos de nucleótidos, sino también, por ejemplo, alteraciones tales como modificación en la región de ligador. Como se ha descrito anteriormente, como la molécula de PNmc de la presente invención puede inhibir la expresión de un gen diana, es útil, por ejemplo, como un producto farmacéutico, un agente de diagnóstico, un producto químico agrícola y una herramienta para realizar investigación de productos químicos agrícolas, medicina, ciencias de la vida y similares.

[Listado de secuencias]

TF11004WO.ST25.txt

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BONAC CORPORATION

<120> Molécula de ácido nucleico monocatenario que tiene esqueleto alicíclico que contiene nitrógeno

<130> N116853A EP

<140> 28-07-2011

<150> JP 2010-174915

<151> 03-08-2010

<150> JP 2010-230806

<151> 13-10-2010

<150> JP 2010-269823

<151> 02-12-2010

<150> JP 2011-152381

<151> 08-07-2011

<160> 69

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 25

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> molécula de ácido nucleico

<400> 1

ggcuguuguc auacuucuca ugguu 25

<210> 2

<211> 23

<212> ARN

<213> Artificial
 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico
 5
 <400> 2
 ccaugagaag uaugacaaca gcc 23
 <210> 3
 10 <211> 48
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> molécula de ácido nucleico
 <400> 3
 ccaugagaag uaugacaaca gccgcuguu gucauacuuc ucaugguu 48
 20 <210> 4
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico
 <400> 4
 30 guugucauac uucucaugg 19
 <210> 5
 <211> 55
 <212> ARN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico
 <400> 5
 40 ccaugagaag uaugacaaca gcccacacc gcuguuuguc auacuucuca ugguu 55
 <210> 6
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico
 <400> 6
 50 auuguaacga gacaaacac 19
 <210> 7
 <211> 23
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 60 <400> 7
 ggagaaggct ggggctcatt tgc 23
 <210> 8
 65 <211> 23
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 5
 <400> 8
 tggccagggg tgctaagcag ttg 23
 <210> 9
 10 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <400> 9
 gccacgggctg ctccagctc ctc 23
 <210> 10
 20 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> cebador
 <400> 10
 30 aggtctttgc ggatgtccac gtcac 25
 <210> 11
 <211> 51
 <212> ARN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico
 <400> 11
 40 caugagaagu augacaacag ccggcuguug ucauacuucu caugguucga a 51
 <210> 12
 <211> 51
 <212> ARN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico
 <400> 12
 50 ccaucaacga uaagugaaag ccggcuuuga cuauaucguug auggcuucga a 51
 <210> 13
 <211> 62
 55 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico
 60 <400> 13
 caugagaagu augacaacag cccacacacg gcuguuguca uacuucucan gguucucgg 60
 aa 62
 <210> 14

<211> 51
 <212> ARN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 14
 cagcuguaca uugacuuuag ccggcuaaag ucaauguaca gcugcuucga a 51

10 <210> 15
 <211> 50
 <212> ARN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 15
 agcuguacau ugacuuuagc ccggcuaaagu caauguacag cugcuucgaa 50

20 <210> 16
 <211> 51
 <212> ARN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 16
 agcagcugua caugacuuu agccggcuaa agucaaugua cagcugcuuc g 51

30 <210> 17
 <211> 50
 <212> ARN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 17
 gcagcuguac auugacuuua gccggcuaaa gucaauguac agcugcuucg 50

40 <210> 18
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 18
 aaagucaaug uacagcugcu u 21

50 <210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

60 <400> 19
 ccattgctgt cccgtgcaga gctg 24

65 <210> 20
 <211> 25

ES 2 528 285 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> cebador

 <400> 20
 atggtagccc ttggctcgt ggatc 25

 10 <210> 21
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> cebador

 <400> 21
 20 gtcgtaccac aggcattgtg atgg 24

 <210> 22
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> cebador

 <400> 22
 30 gcaatgcctg ggtacatggt gg 22

 <210> 23
 <211> 51
 <212> ARN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico
 40 <400> 23
 ugucagugcu cauuuacaag ccggcuugua aaugagcacu gacacuucga a 51

 <210> 24
 <211> 62
 45 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico
 50 <400> 24
 cagcuguaca uugacuuuag ccccacaccg gcuaaaguca auguacagcu gcuucucgg 60
 aa 62

 <210> 25
 <211> 62
 55 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> molécula de ácido nucleico

 <400> 25
 ugucagugcu cauuuacaag ccccacaccg gcuuguaau gagcacugac acuucucgg 60
 aa 62

5 <210> 26
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> sentido

 10 <400> 26
 gcagcuguac auugacuuua g 21

 15 <210> 27
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> antisentido

 <400> 27
 aaagucaaug uacagcugcu u 21

 25 <210> 28
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

 30 <220>
 <223> sentido

 <400> 28
 gugucagugc ucacuuuacaa g 21

 35 <210> 29
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> antisentido

 <400> 29
 uguaaaugag cacugacacu u 21

 45 <210> 30
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

 <400> 30
 uugcgcuuuu uggugacgc 19

 60 <210> 31
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

 65 <400> 31

ES 2 528 285 T3

aaccaugaga aguaugacaa cagccccaca cggcuguug ucauacuucu caugguucuu 60
cg 62
 <210> 32
 <211> 62
 5 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico
 10 <400> 32
accaugagaa guaugacaac agccccacac cggcuguugu cauacuucuc augguucuc 60
gg 62
 <210> 33
 <211> 62
 15 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico
 20 <400> 33
ccaugagaag uaugacaaca gccccacacc ggcuguuguc auacuucuca ugguucucg 60
ga 62
 <210> 34
 <211> 62
 25 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico
 30 <400> 34
caugagaagu augacaacag cccacacccg gcuguuguca uacuucucau gguucucgg 60
aa 62
 35 <210> 35
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico
 40 <400> 35
augagaagua ugacaacagc cccacacccg cuguugucau acuucucaug guucucgga 60
ac 62
 45 <210> 36
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico
 <400> 36
ugagaaguau gacaacagcc ccacacccg uguugucaua cuucucaug uucucgga 60
cc 62
 55 <210> 37

	<211> 62	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 37	
	agaaguauga caacagcccc acaccggcug uugucauacu ucucaugguu cuucggaacc	60
	au	62
10	<210> 38	
	<211> 62	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 38	
	aaguaugaca acagccccac accggcuguu gucauacuuc ucaugguucu ucggaaccuu	60
	ga	62
20	<210> 39	
	<211> 62	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 39	
	guaugacaac agccccacac cggcuguugu cauacuucuc augguucuuc ggaaccauga	60
30	ga	62
	<210> 40	
	<211> 62	
	<212> ARN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
40	<400> 40	
	augacaacag cccacacccg gcuguuguca uacuucucu gguucuucgg aaccaugaga	60
	ag	62
	<210> 41	
	<211> 62	
45	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
50	<400> 41	
	acaacagccc cacaccggcu guugucauac uucucauggu ucuucggaac caugagaagu	60
	au	62
	<210> 42	
55	<211> 62	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	

ES 2 528 285 T3

<220>
 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 42
 aacagcccca caccggcugu ugcuaucuu cucaugguuc uucggaacca ugagaaguau 60
 5 ga 62

<210> 43
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> molécula de ácido nucleico

15 <400> 43
 cagccccaca ccggcuguug ucauacuucu caugguucuu cggaaccaug agaaguuga 60
 ca 62

<210> 44
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> molécula de ácido nucleico

25 <400> 44
 agccccacac cggcuguugu cauacuucuc augguucuu ggaaccauga gaaguaugac 60
 aa 62

<210> 45
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> molécula de ácido nucleico

35 <400> 45
 gccccacacc ggcuguuguc auacuucua ugguuucucg gaaccaugag aaguaugaca 60
 ac 62

40 <210> 46
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 46
 cccccacacc gcuguuguca uacuucucau gguucucgg aaccaugaga aguaugacaa 60
 50 ca 62

<210> 47
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

ES 2 528 285 T3

	<400> 47		
	cccacaccgg cuguugucau acuucucaug guucucggga accaugagaa guaugacaac	60	
	ag	62	
5	<210> 48 <211> 62 <212> ARN <213> Artificial		
10	<220> <223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 48		
	ccacaccggc uguugucaua cuucucaugg uucucggaa ccaugagaag uaugacaaca	60	
	gc	62	
15	<210> 49 <211> 62 <212> ARN <213> Artificial		
20	<220> <223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 49		
	cagcuguaca uugacuuuag cccacaccgg gcuaaaguca auguacagcu gcuucucgg	60	
25	aa	62	
	<210> 50 <211> 61 <212> ARN <213> Artificial		
30	<220> <223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 50		
	agcuguacau ugacuuuagc cccacaccgg cuaaagucua uguacagcug cuucucggga	60	
35	a	61	
	<210> 51 <211> 62 <212> ARN <213> Artificial		
40	<220> <223> molécula de ácido nucleico		
45	<400> 51		
	agcagcugua caugacuuu agccccacac cggcuaaagu caauguacag cugcuucuc	60	
	gg	62	
50	<210> 52 <211> 61 <212> ARN <213> Artificial		
	<220> <223> molécula de ácido nucleico		
55	<400> 52		
	gcagcuguac auugacuuua gccccacacc ggcuaaaguc aauguacagc ugcucucucg	60	
	g	61	

ES 2 528 285 T3

<210> 53
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico
 <400> 53
 uguuuugucuc guuacaauau cccacacccg gauauuguaa cgagacaaac acuccuucgg 60
 10 ga 62
 <210> 54
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico
 20 <400> 54
 aguguuuguc ucguuacaau aucccccacac cggauauugu aacgagacaa acacuccuuc 60
 gg 62
 <210> 55
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 55
 aaagctgcca atgccctcg acc 23
 <210> 56
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> cebador
 40 <400> 56
 taggtgggtg gccctcgtct tg 22
 45 <210> 57
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico
 <400> 57
 cgucacaaaa aagcgcaauu cccacacccg gaauugcgcu uuuuggugac gcuucucgg 60
 55 aa 62
 <210> 58
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Artificial
 60 <220>

ES 2 528 285 T3

<223> molécula de ácido nucleico

<400> 58
agcgcaccca aaaagcgcaa uccccacac cggaauugcg cuuuuggug acgcuucuuc 60

5 **gg** 62

<210> 59
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> cebador

<400> 59
 15 **ctggacatca agctggccct ggac** 24

<210> 60
 <211> 24
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

25 <400> 60
caccagcttg cgcatggcca ctc 24

<210> 61
 <211> 64
 30 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> molécula de ácido nucleico

35 <400> 61
aaccaugaga agaugacaa cagccccaca ccggcuguug ucauacuucu caugguucgu 60

ucgc 64

<210> 62
 <211> 62
 40 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> molécula de ácido nucleico

45 <400> 62
accaugagaa guaugacaac agccccacac cggcuguugu cauacuucuc augguucuuc 60

gg 62

50 <210> 63
 <211> 60
 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> molécula de ácido nucleico

55 <400> 63
accaugagaa guaugacaac agccccacacc gcuguuguca uacuucucu gguucuucgg 60

60 <210> 64
 <211> 58

ES 2 528 285 T3

<212> ARN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 64
 ccaugagaag uaugacaaca gccacaccg cuguugucau acuucucaug guuuucga 58

10 <210> 65
 <211> 58
 <212> ARN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

20 <400> 65
 accaugagaa guaugacaac agccacaccc uguugucaua cuucucaugg uucucgg 58

25 <210> 66
 <211> 56
 <212> ARN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 66
 ccaugagaag uaugacaaca gccacaccu guugucauac uucucauggu uuucga 56

35 <210> 67
 <211> 54
 <212> ARN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 67
 caugagaagu augacaacag ccacaccug uugucauacu ucucaugguu ucga 54

45 <210> 68
 <211> 54
 <212> ARN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 68
 ccaugagaag uaugacaaca ccacaccugu ugucauacuu cucaugguuu ucga 54

55 <210> 69
 <211> 52
 <212> ARN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

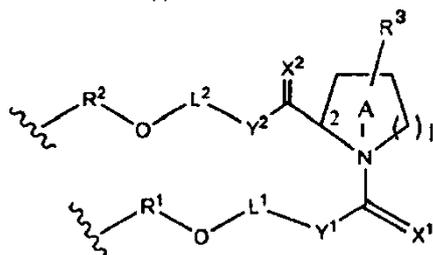
<400> 69
 caugagaagu augacaacac cacaccuguu gucauacuu ucaugguuuc ga 52

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico monocatenario que comprende una secuencia inhibidora de la expresión que inhibe la expresión de un gen diana, donde:

- 5
- la molécula comprende: una región (Xc); una región de ligador (Lx), una región interna (Z) que comprende la secuencia inhibidora de la expresión y que está compuesta de una región (X) y una región (Y), una región de ligador (Ly) y una región (Yc) en este orden;
 - la región (Xc) es complementaria a la región (X);
 - 10 - la región (Yc) es complementaria a la región (Y); y
 - la región de ligador (Lx)

se representa por la siguiente fórmula (I):



. . . (I)

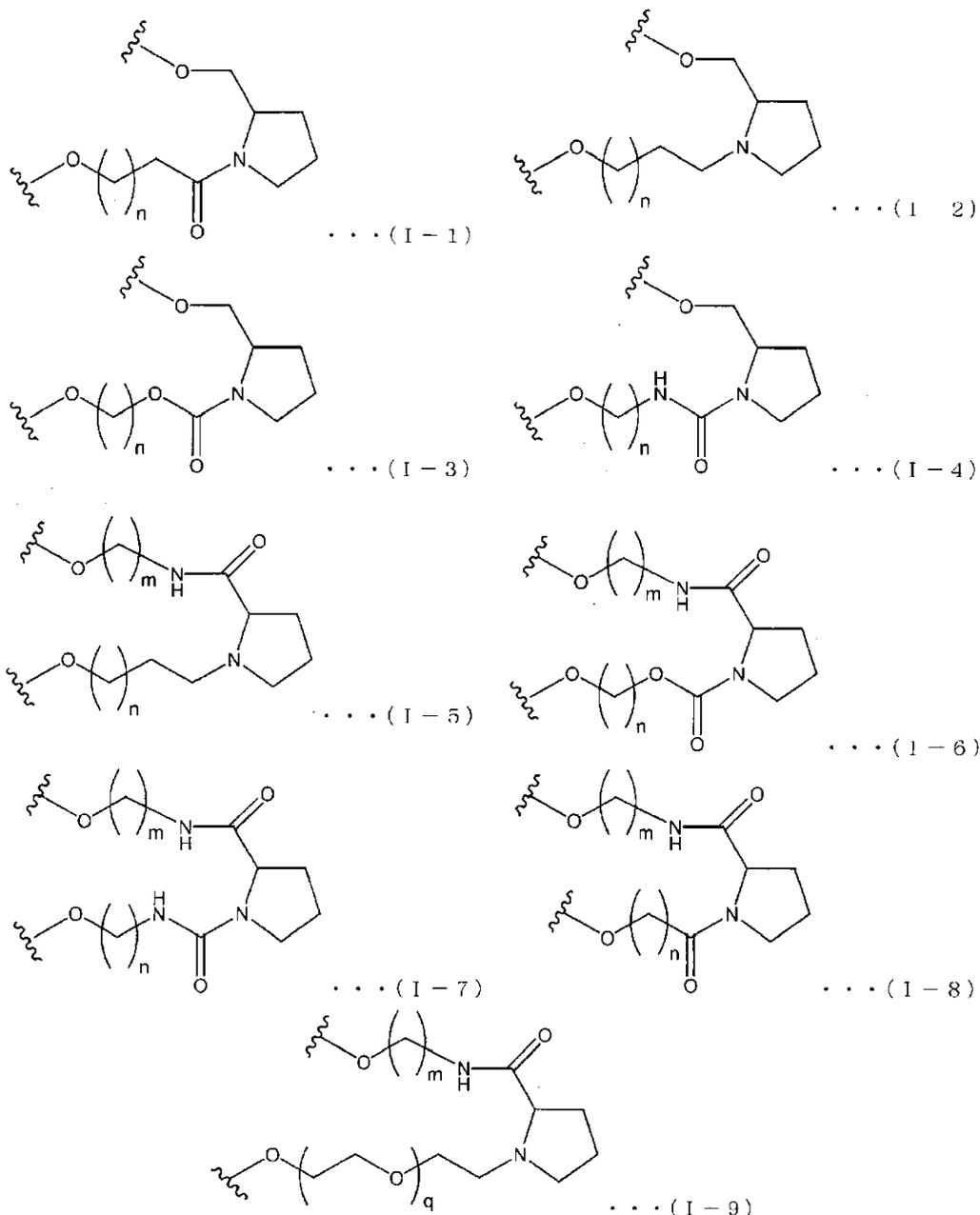
15 en la que:

- X^1 y X^2 son cada uno independientemente H_2 , O, S o NH;
 Y^1 y Y^2 son cada uno independientemente un enlace sencillo, CH_2 , NH, O o S;
 R^3 es un átomo de hidrógeno o sustituyente que está unido a C-3, C-4, C-5 o C-6 sobre un anillo A;
 L^1 es una cadena de alquileo compuesta por n átomos, y un átomo de hidrógeno sobre un átomo de carbono del alquileo puede o puede no estar sustituido con OH, OR^a , NHR^a , NR^aR^b , SH o SR^a , o
 L^1 es una cadena de poliéter obtenida sustituyendo al menos un átomo de carbono sobre la cadena de alquileo con un átomo de oxígeno,
a condición de que: cuando Y^1 sea NH, O o S, un átomo unido a Y^1 en L^1 sea carbono, un átomo unido a OR^1 en L^1 sea carbono y los átomos de oxígeno no sean adyacentes entre sí;
 L^2 es una cadena de alquileo compuesta por m átomos, y un átomo de hidrógeno sobre un átomo de carbono del alquileo puede o puede no estar sustituido con OH, OR^c , NHR^c , NR^cR^d , SH o SR^c , o
 L^2 es una cadena de poliéter obtenida sustituyendo al menos un átomo de carbono sobre la cadena de alquileo con un átomo de oxígeno,
a condición de que: cuando Y^2 sea NH, O o S, un átomo unido a Y^2 en L^2 sea carbono, un átomo unido a OR^2 en L^2 sea carbono y los átomos de oxígeno no sean adyacentes entre sí;
 R^a , R^b , R^c y R^d son cada uno independientemente un sustituyente o un grupo protector;
I es 1 o 2;
m es un número entero en el intervalo de 0 a 30;
n es un número entero en el intervalo de 0 a 30;
las regiones (Xc) y (X) están cada una ligadas a la región de ligador (Lx) mediante $-OR^1-$ o $-OR^2-$; y
 R^1 y R^2 pueden o pueden no estar presentes, y cuando están presentes, R^1 y R^2 son cada uno independientemente un residuo de nucleótido o la estructura de fórmula (I).

40 2. La molécula de ácido nucleico monocatenario según la reivindicación 1, donde en la fórmula (I):

- L^1 es la cadena de poliéter, y la cadena de poliéter es polietilenglicol, y/o
- (m + n) total del número de átomos (n) en L^1 y el número de átomos (m) en L^2 está en el intervalo de 0 a 30.

45 3. La molécula de ácido nucleico monocatenario según la reivindicación 1 o 2, donde la estructura de fórmula (I) es una cualquiera de las siguientes fórmulas (I-1) a (I-9) en las que n es un número entero de 0 a 30, m es un número entero de 0 a 30 y q es un número entero de 0 a 10:



5

opcionalmente donde:

10

en la fórmula (I-1), $n = 8$;

en la fórmula (I-2), $n = 3$;

en la fórmula (I-3), $n = 4$ u 8 ;

la fórmula (I-4), $n = 7$ u 8 ;

en la fórmula (I-5), $n = 3$ y $m = 4$;

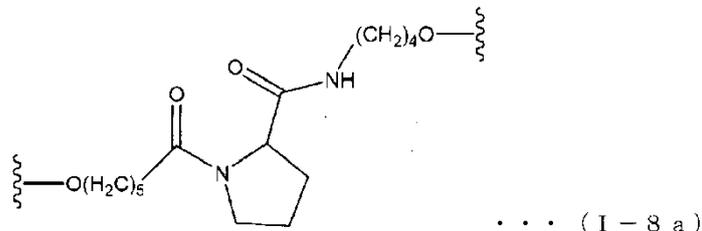
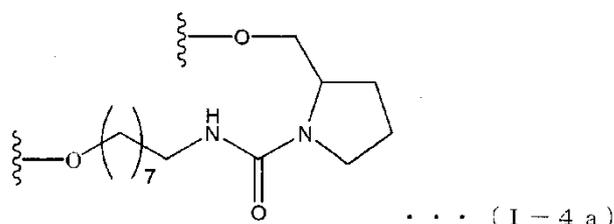
en la fórmula (I-6), $n = 8$ y $m = 4$;

15

en la fórmula (I-7), $n = 8$ y $m = 4$;

en la fórmula (I-8), $n = 5$ y $m = 4$; y

en la fórmula (I-9), $q = 1$ y $m = 4$; o la fórmula (I-4) es la siguiente fórmula (I-4a) y la fórmula (I-8) es la siguiente fórmula (I-8a):



5 4. La molécula de ácido nucleico monocatenario según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el número de bases (X) en la región (X) y el número de bases (Xc) en la región del lado 5' (Xc) satisfacen una condición de la expresión (3), o (5) u (11):

$$X > Xc \quad \dots (3)$$

$$X = Xc \quad \dots (5)$$

$$X - Xc = 1, 2 \text{ o } 3 \quad \dots(11)$$

y/o donde el número de bases (Xc) en la región (Xc) es 19 a 30.

15 5. La molécula de ácido nucleico monocatenario según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el número de bases (X) en la región (X), el número de bases (Y) en la región (Y), el número de bases (Xc) en la región (Xc) y el número de bases (Yc) en la región (Yc) satisfacen una cualquiera de las condiciones (a) a (e):

20 (a) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (3) y (4);

$$X > Xc \quad \dots (3)$$

$$Y = Yc \quad \dots (4)$$

25 (b) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (5) y (6);

$$X = Xc \quad \dots (5)$$

$$Y > Yc \quad \dots (6)$$

30 (c) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (7) y (8);

$$X > Xc \quad \dots (7)$$

$$Y > Yc \quad \dots (8)$$

35 (d) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (9) y (10);

$$X = Xc \quad \dots (9)$$

$$Y = Yc \quad \dots (10)$$

40 (e) Se satisface la condición de la expresión (2);

$$Z \geq Xc + Yc \quad \dots (2).$$

6. La molécula de ácido nucleico monocatenario según la reivindicación 5, donde en las condiciones (a) a (d), la diferencia entre el número de bases (X) en la región (X) y el número de bases (Xc) en la región (Xc), y la diferencia entre el número de bases (Y) en la región (Y) y el número de bases (Yc) en la región (Yc) satisfacen las siguientes condiciones:

5

(a) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (11) y (12);

$$X - Xc = 1, 2 \text{ o } 3 \quad \dots(11)$$

10

$$Y - Yc = 0 \quad \dots (12)$$

(b) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (13) y (14);

$$X - Xc = 0 \quad \dots (13)$$

15

$$Y - Yc = 1, 2 \text{ o } 3 \quad \dots(14)$$

(c) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (15) y (16);

20

$$X - Xc = 1, 2 \text{ o } 3 \quad \dots(15)$$

$$Y - Yc = 1, 2 \text{ o } 3 \quad \dots(16)$$

(d) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (17) y (18);

25

$$X - Xc = 0 \quad \dots (17)$$

$$Y - Yc = 0 \quad \dots (18).$$

30 7. La molécula de ácido nucleico monocatenario según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde

- el número de bases (Xc) en la región (Xc) es 1 a 11; y/o
 - el número de bases (Yc) en la región (Yc) es 1 a 11; y/o
 - el número total de bases en la molécula es 50 o más; y/o
- 35 - la molécula de ácido nucleico monocatenario comprende al menos un residuo modificado y/o una sustancia de marcado y/o un isótopo estable.

8. La molécula de ácido nucleico monocatenario según la reivindicación 7, donde:

- 40 - el número de bases (Xc) en la región (Xc) es 1 a 7; y/o
- el número de bases (Yc) en la región (Yc) es 1 a 7.

9. La molécula de ácido nucleico monocatenario según la reivindicación 8, donde:

- 45 - el número de bases (Xc) en la región (Xc) es 1 a 3; y/o
- el número de bases (Yc) en la región (Yc) es 1 a 3.

10. La molécula de ácido nucleico monocatenario según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que es una molécula de ARN.

50

11. Una composición para inhibir la expresión de un gen diana, comprendiendo la composición la molécula de ácido nucleico monocatenario según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

12. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de ácido nucleico monocatenario según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

55

13. La composición farmacéutica según la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de inflamación.

14. Un procedimiento *in vitro* para inhibir la expresión de un gen diana, comprendiendo el procedimiento usar la molécula de ácido nucleico monocatenario según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde opcionalmente.

60

- el procedimiento comprende administrar la molécula de ácido nucleico monocatenario a una célula, un tejido o un órgano *in vitro*; o

- la molécula de ácido nucleico es una molécula de ARN y la expresión del gen diana se inhibe induciendo interferencia por ARN.

- 5 15. Una molécula de ácido nucleico para su uso en el tratamiento de una enfermedad, donde la molécula es la molécula de ácido nucleico monocatenario según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y la molécula de ácido nucleico monocatenario comprende, como secuencia inhibidora de la expresión, una secuencia que inhibe la expresión de un gen que causa la enfermedad.



FIG. 1A

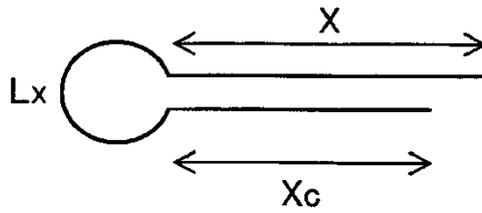


FIG. 1B

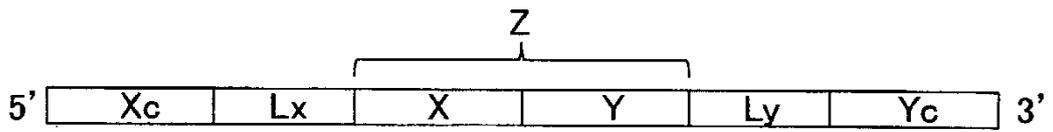


FIG. 2A

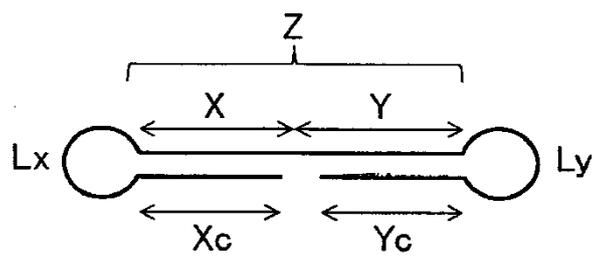


FIG. 2B

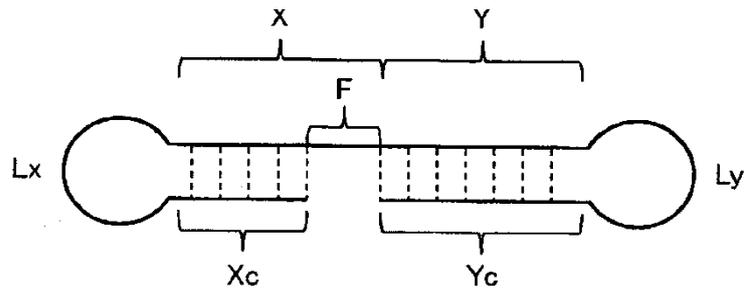


FIG. 3A

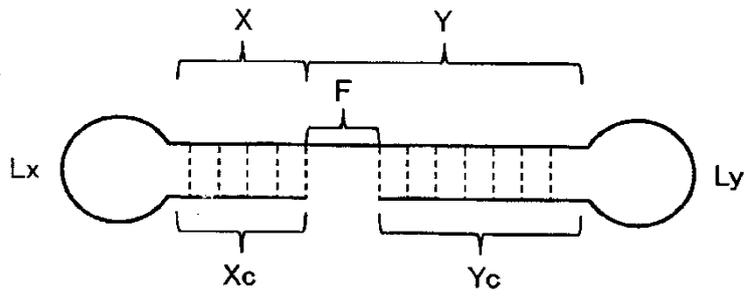


FIG. 3B

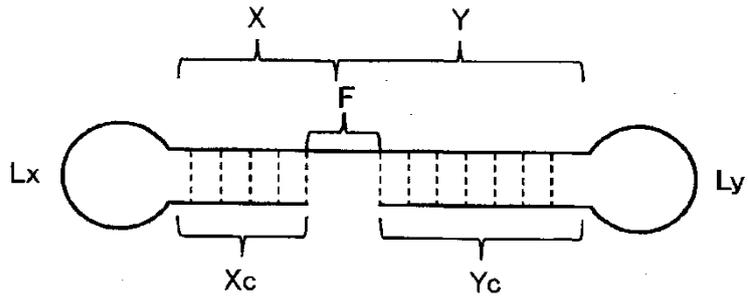


FIG. 3C

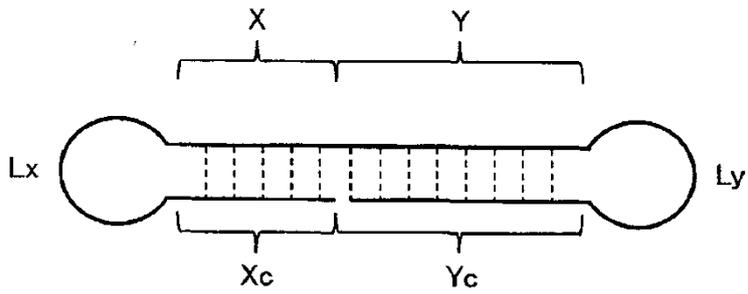


FIG. 3D

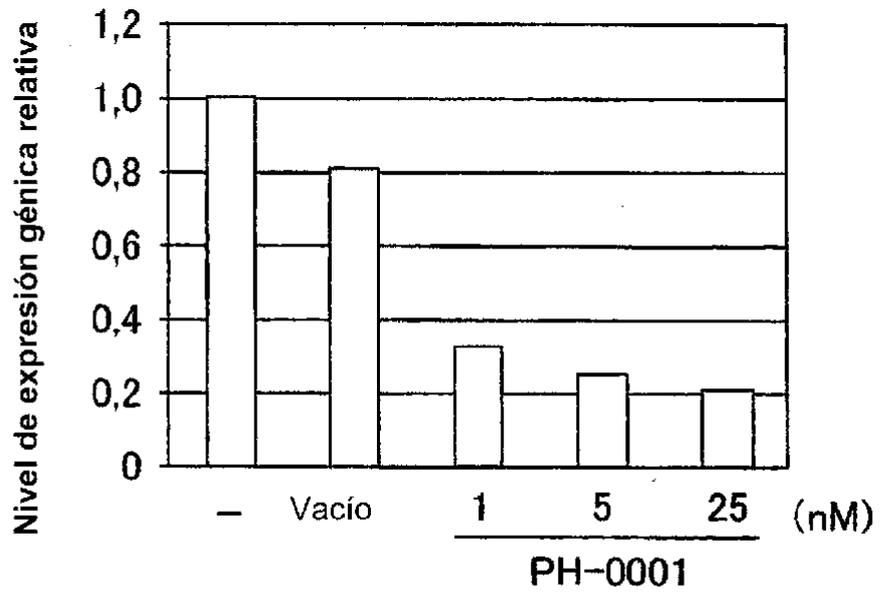


FIG. 4

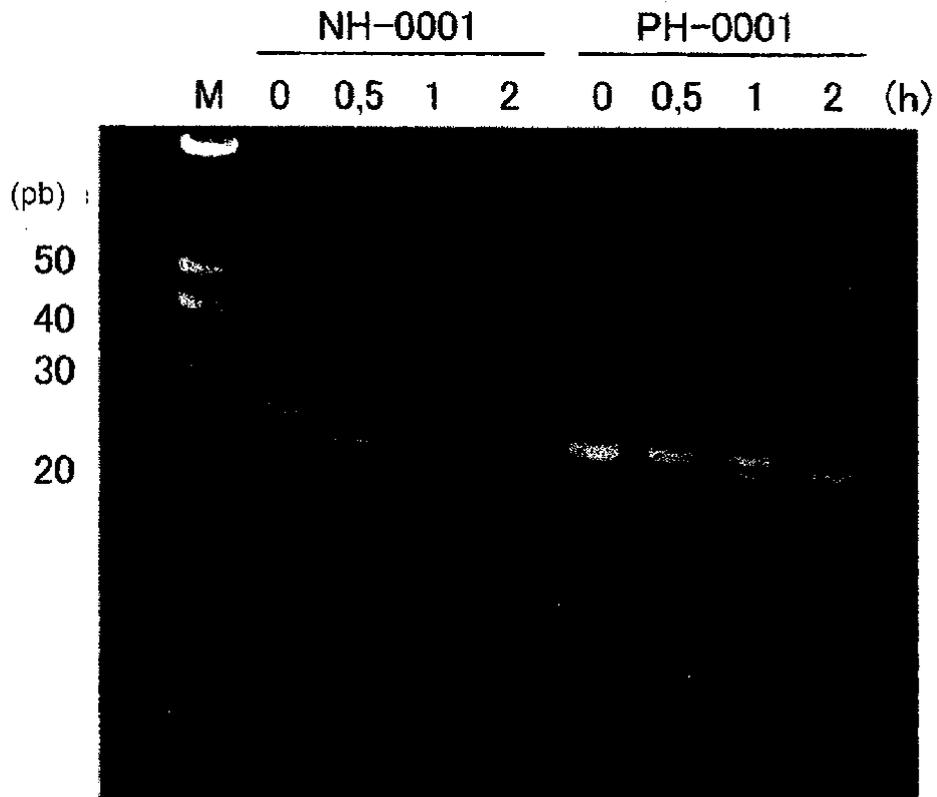


FIG. 5

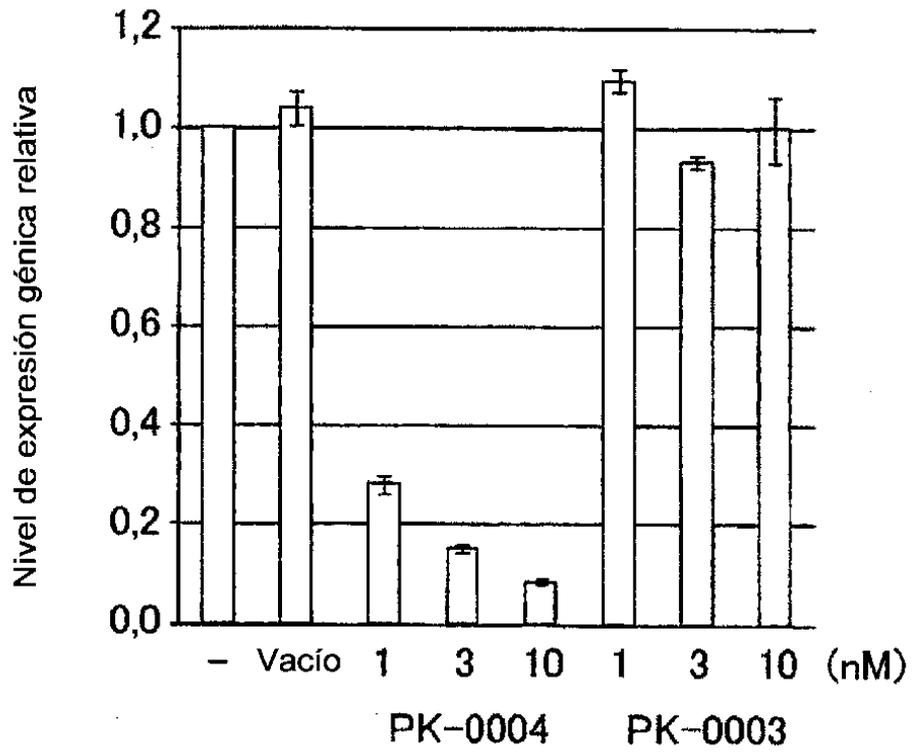


FIG. 6

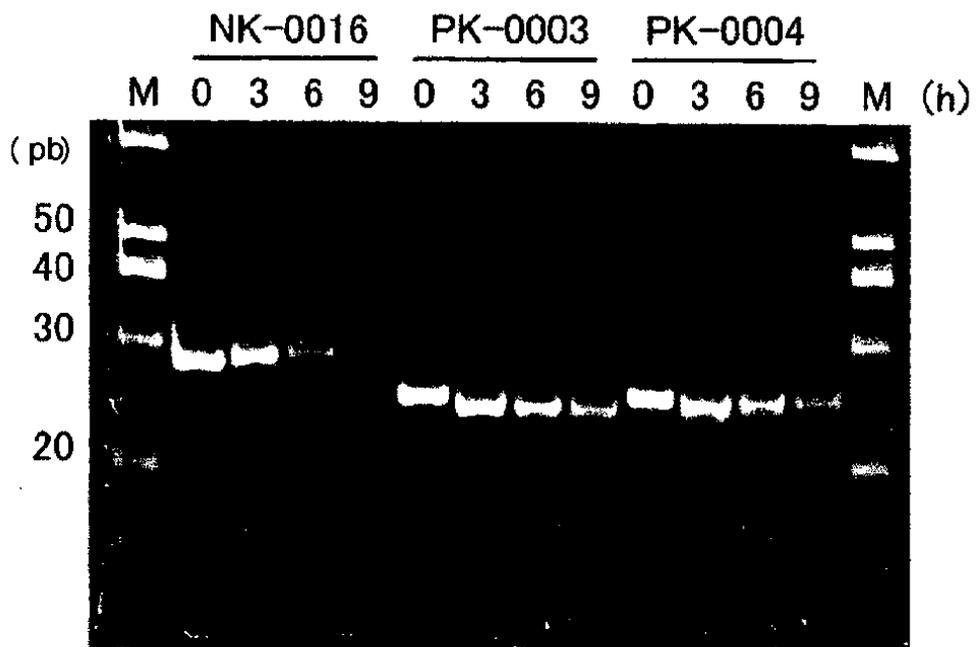


FIG. 7

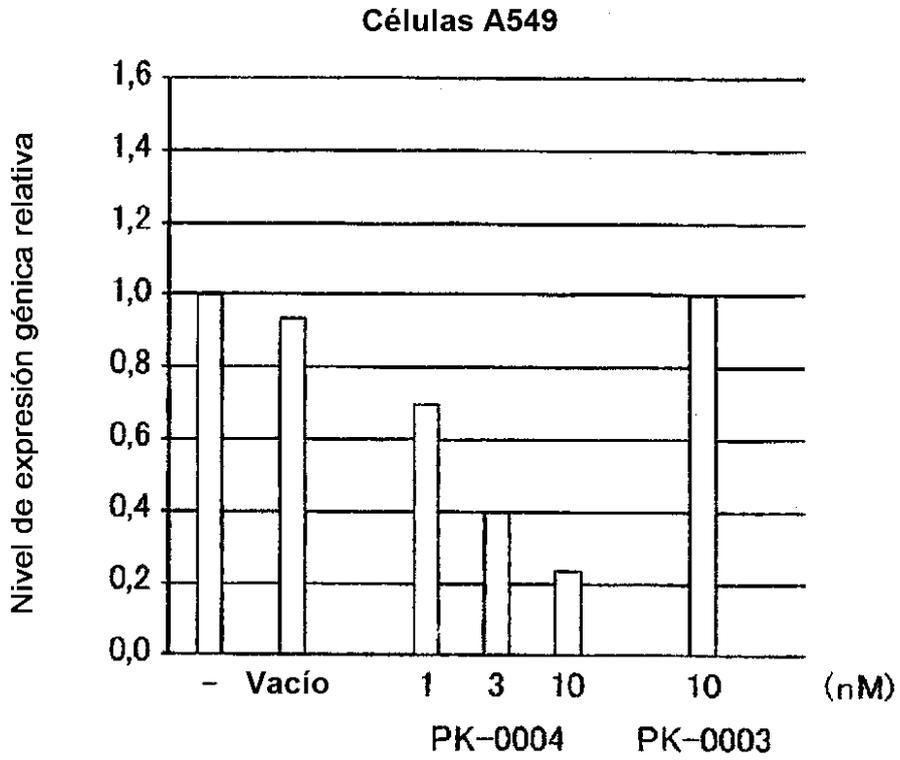


FIG. 8

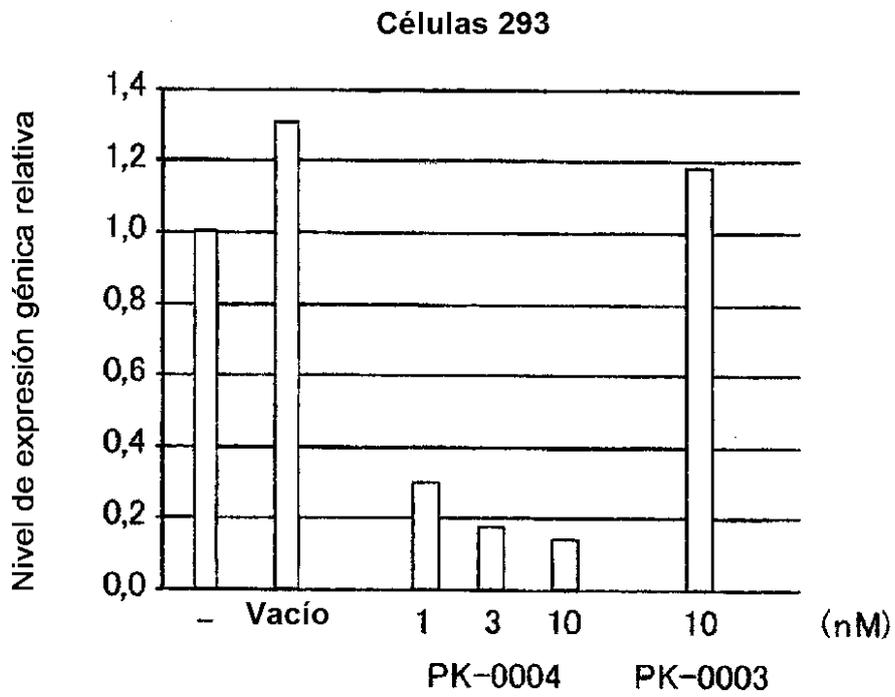


FIG. 9

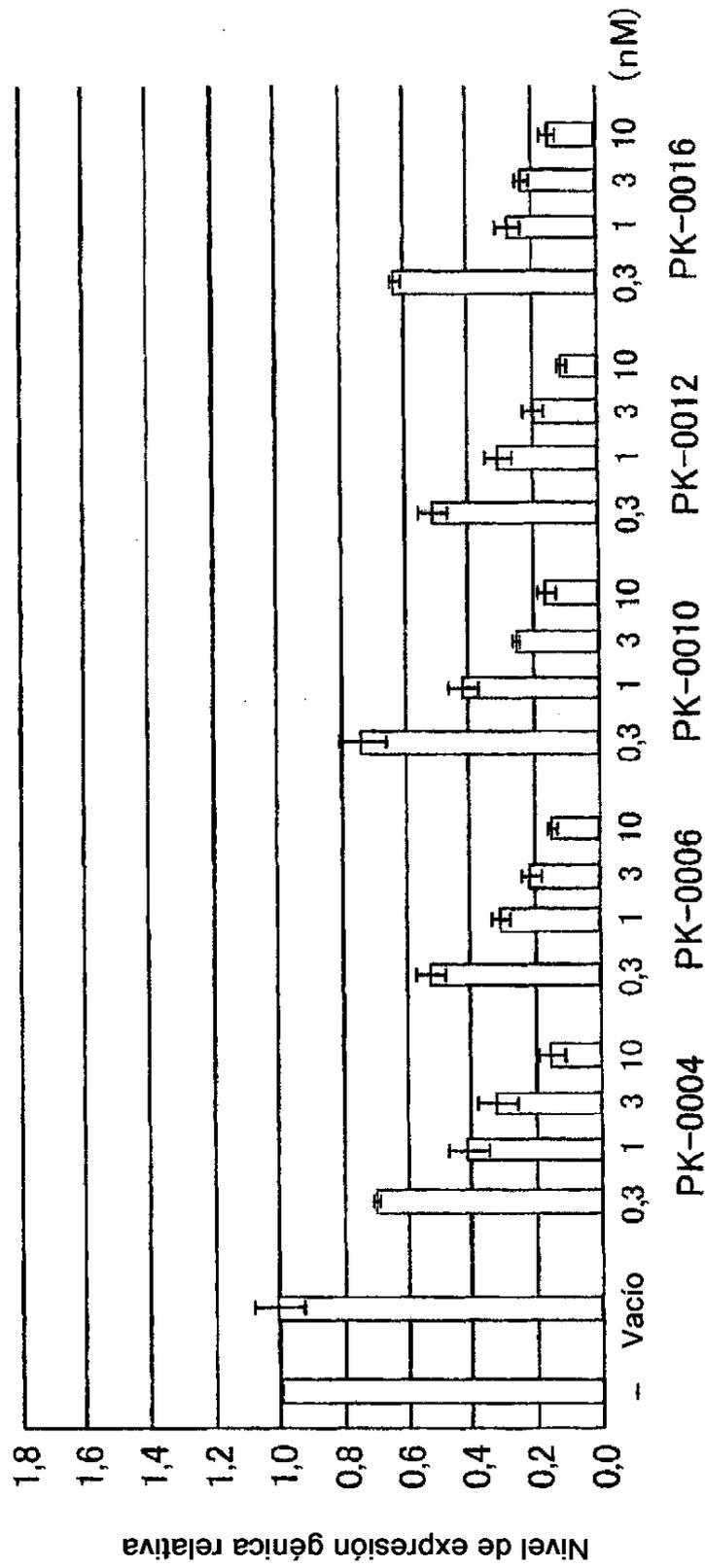


FIG. 10

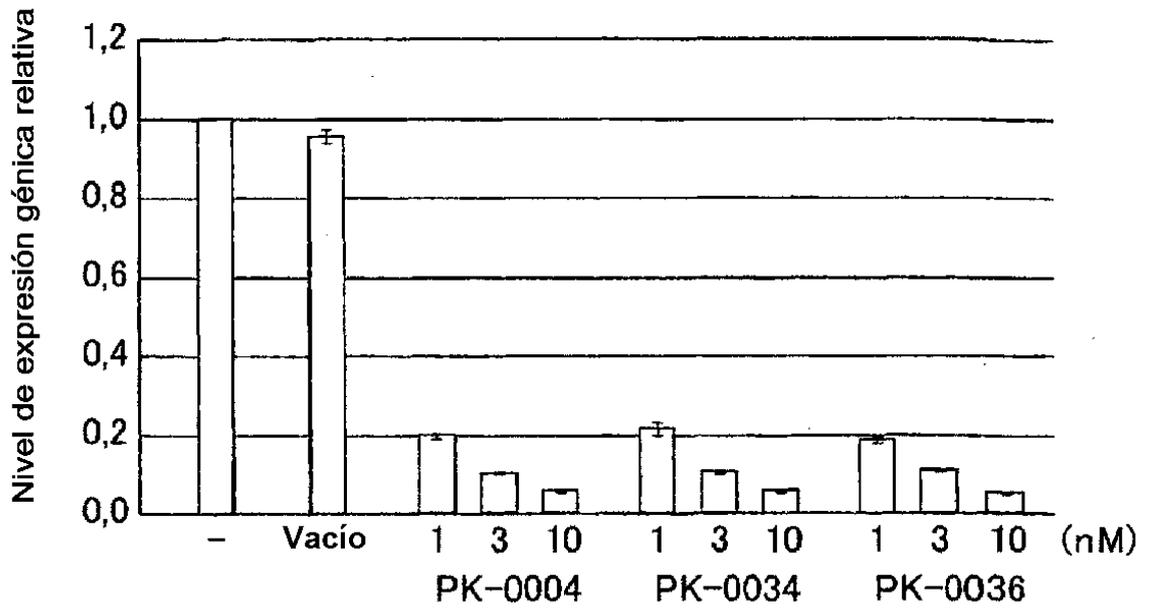


FIG. 11

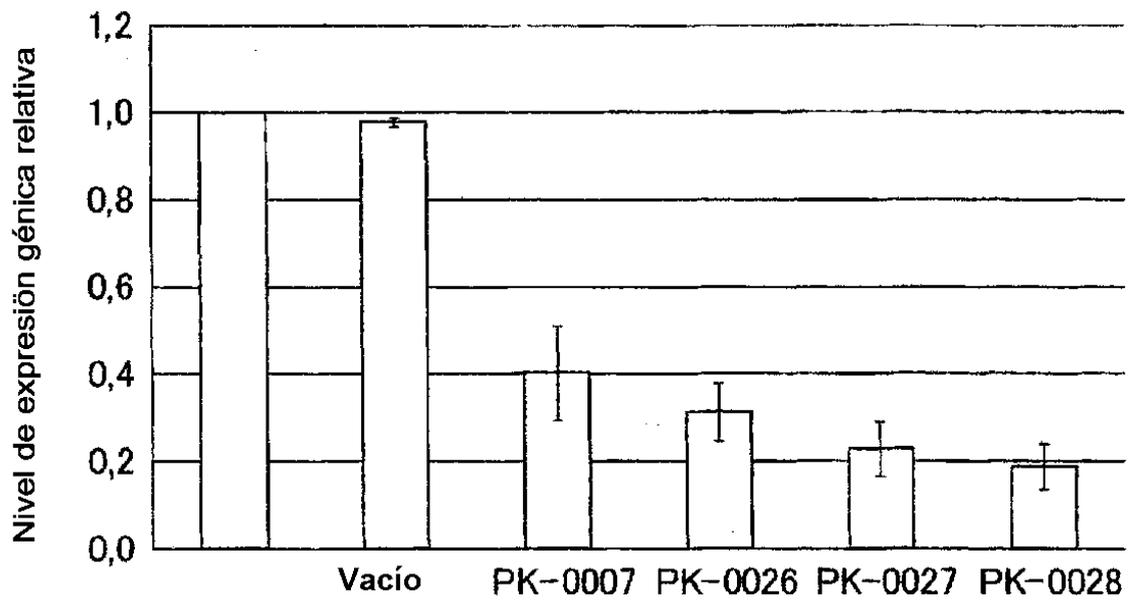


FIG. 12

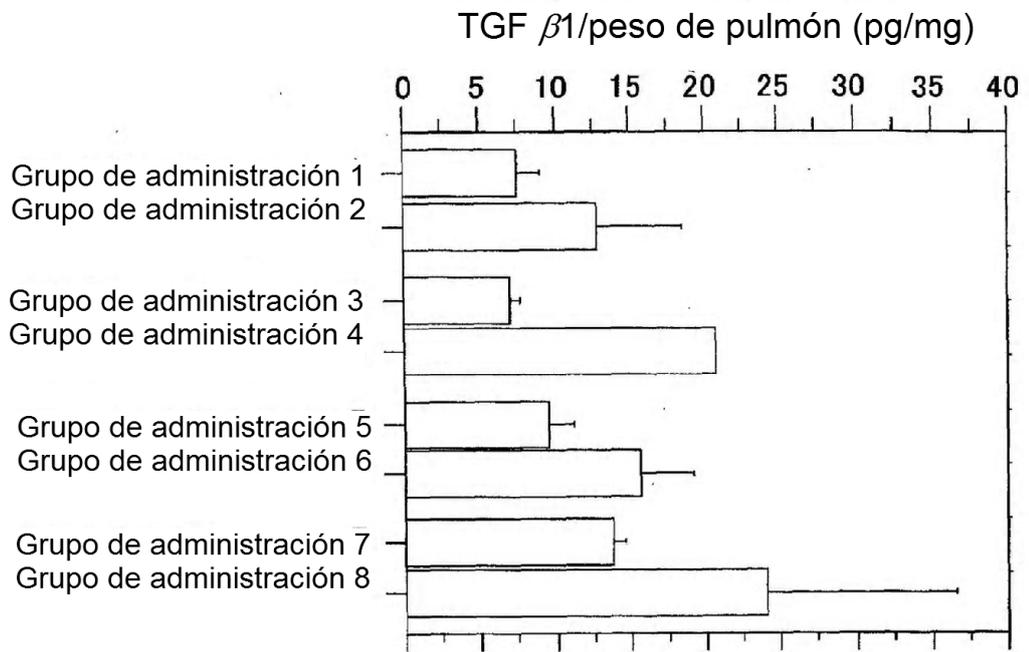


FIG. 13

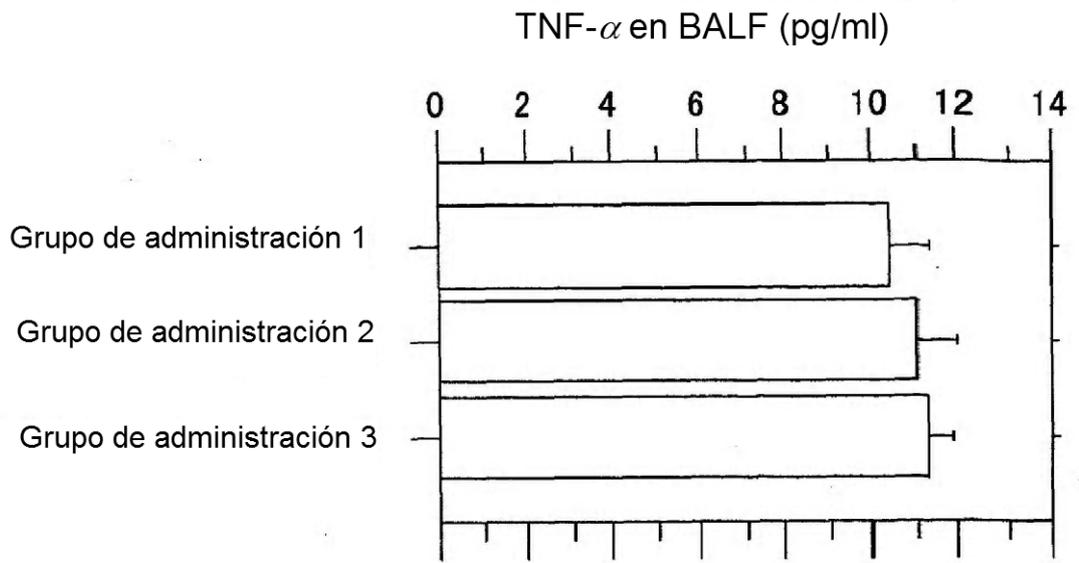


FIG. 14A

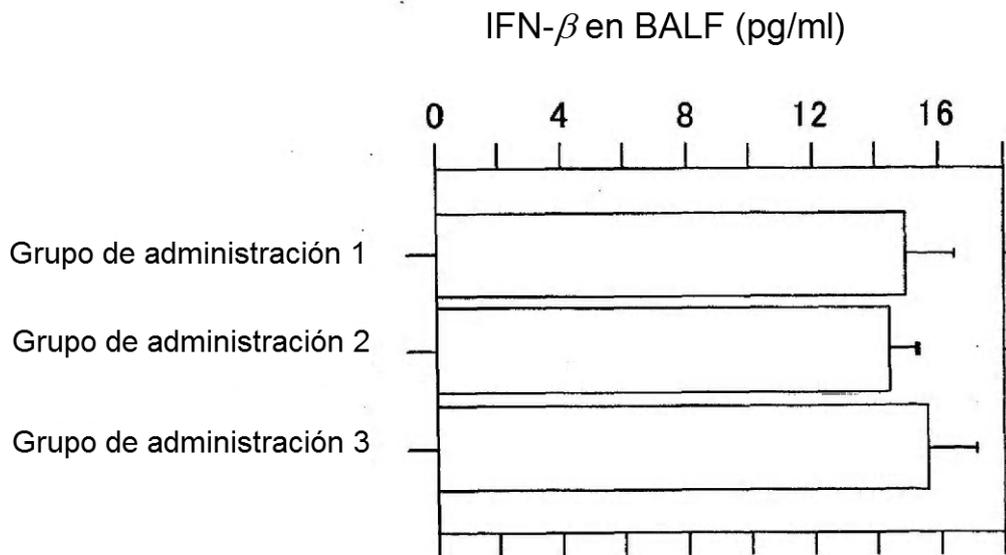


FIG. 14B

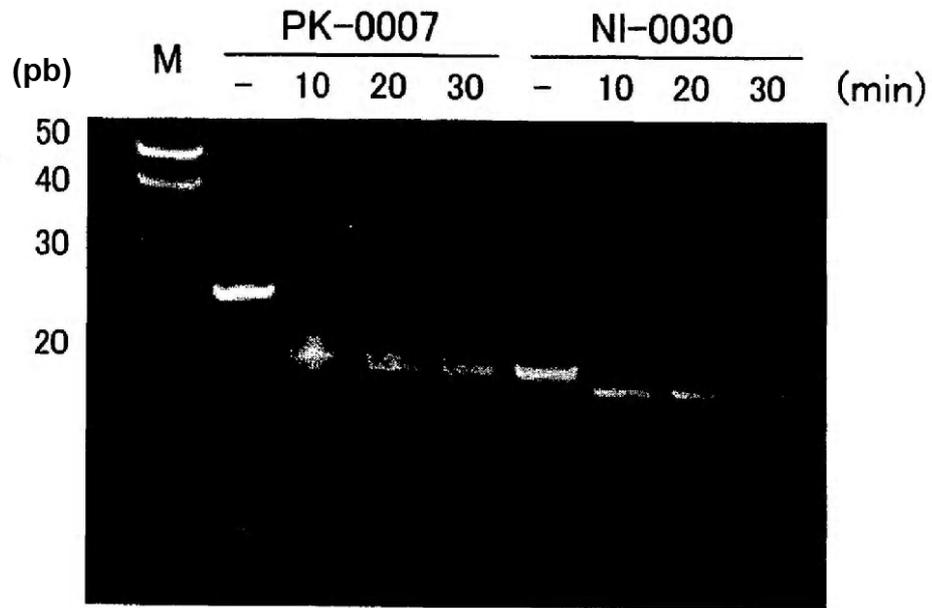


FIG. 15

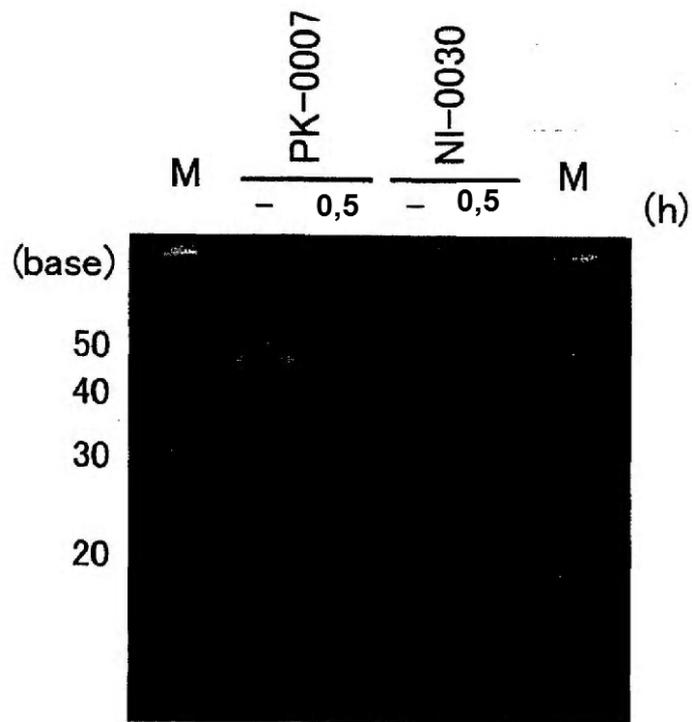


FIG. 16

	Xc/Yc	
NIK-0036	25/1	5' - <u>aacc</u> augagaaguuugacaacaagaccCCACACCGGCUGUUGUCAVACUUCUCAUGGUUCUUG -3' 31
NIK-0025	24/1	5' - <u>acc</u> augagaaguuugacaacaagaccCCACACCGGCUGUUGUCAVACUUCUCAUGGUUCUUG -3' 32
NIK-0037	23/2	5' - <u>cca</u> ugagaaguuugacaacaagaccCCACACCGGCUGUUGUCAVACUUCUCAUGGUUCUUG -3' 33
NIK-0016	22/3	5' - <u>cau</u> gagaaguuugacaacaagaccCCACACCGGCUGUUGUCAVACUUCUCAUGGUUCUUG -3' 34
NIK-0038	21/4	5' - <u>au</u> gagaaguuugacaacaagaccCCACACCGGCUGUUGUCAVACUUCUCAUGGUUCUUG -3' 35
NIK-0026	20/5	5' - <u>uga</u> gagaaguuugacaacaagaccCCACACCGGCUGUUGUCAVACUUCUCAUGGUUCUUG -3' 36
NIK-0027	18/7	5' - <u>aga</u> gagaaguuugacaacaagaccCCACACCGGCUGUUGUCAVACUUCUCAUGGUUCUUG -3' 37
NIK-0028	16/9	5' - <u>agu</u> gagaaguuugacaacaagaccCCACACCGGCUGUUGUCAVACUUCUCAUGGUUCUUG -3' 38
NIK-0029	14/11	5' - <u>gua</u> gagaaguuugacaacaagaccCCACACCGGCUGUUGUCAVACUUCUCAUGGUUCUUG -3' 39
NIK-0014	12/13	5' - <u>au</u> gacaagaccCCACACCGGCUGUUGUCAVACUUCUCAUGGUUCUUG -3' 40
NIK-0030	9/16	5' - <u>aca</u> agaccCCACACCGGCUGUUGUCAVACUUCUCAUGGUUCUUG -3' 41
NIK-0031	7/18	5' - <u>aca</u> agaccCCACACCGGCUGUUGUCAVACUUCUCAUGGUUCUUG -3' 42
NIK-0020	5/20	5' - <u>ca</u> gaccCCACACCGGCUGUUGUCAVACUUCUCAUGGUUCUUG -3' 43
NIK-0019	4/21	5' - <u>ag</u> accCCACACCGGCUGUUGUCAVACUUCUCAUGGUUCUUG -3' 44
NIK-0018	3/22	5' - <u>g</u> accCCACACCGGCUGUUGUCAVACUUCUCAUGGUUCUUG -3' 45
NIK-0039	2/23	5' - <u>g</u> accCCACACCGGCUGUUGUCAVACUUCUCAUGGUUCUUG -3' 46
NIK-0032	1/24	5' - <u>g</u> accCCACACCGGCUGUUGUCAVACUUCUCAUGGUUCUUG -3' 47
NIK-0040	1/25	5' - <u>g</u> accCCACACCGGCUGUUGUCAVACUUCUCAUGGUUCUUG -3' 48

FIG. 17

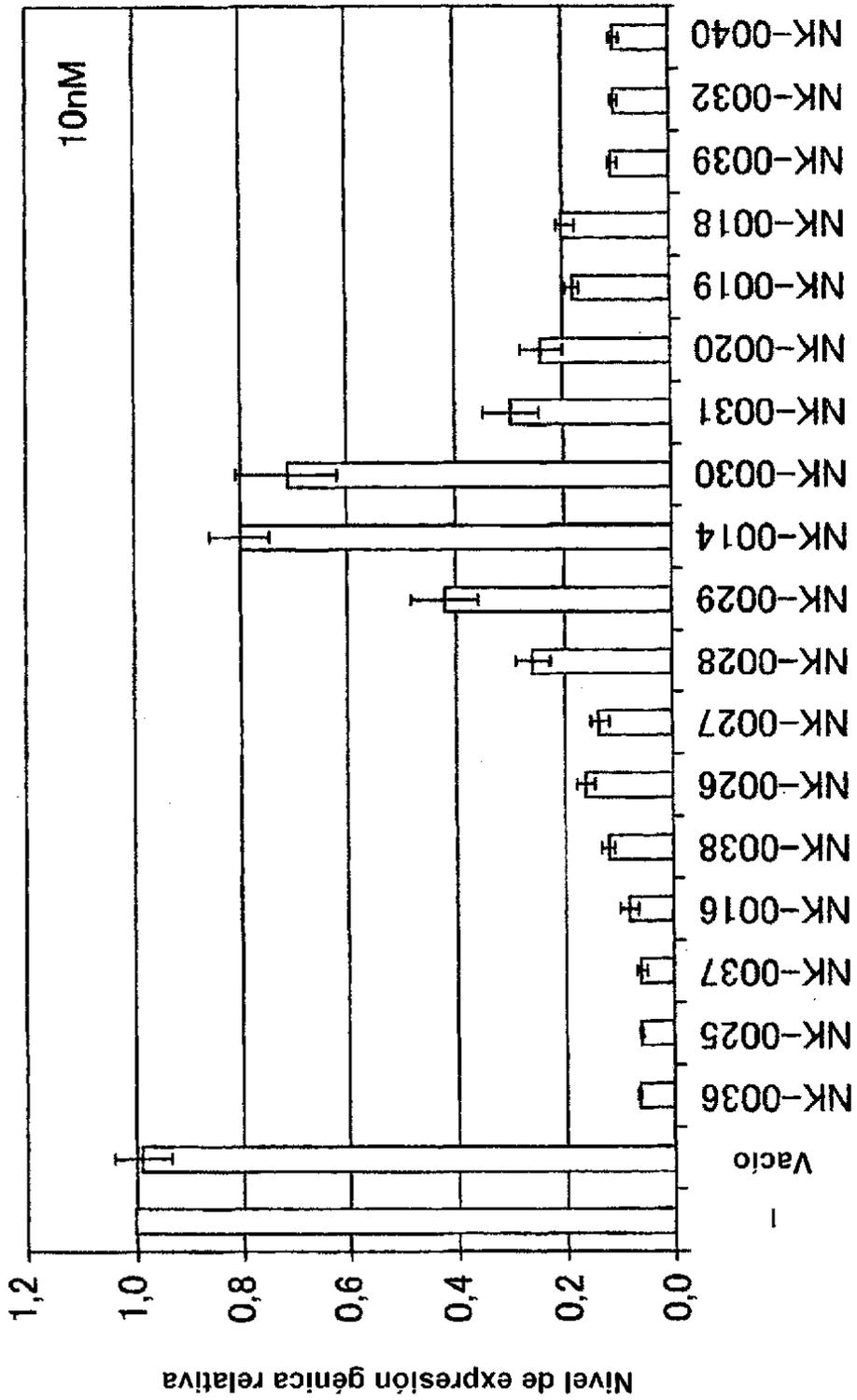


FIG. 18

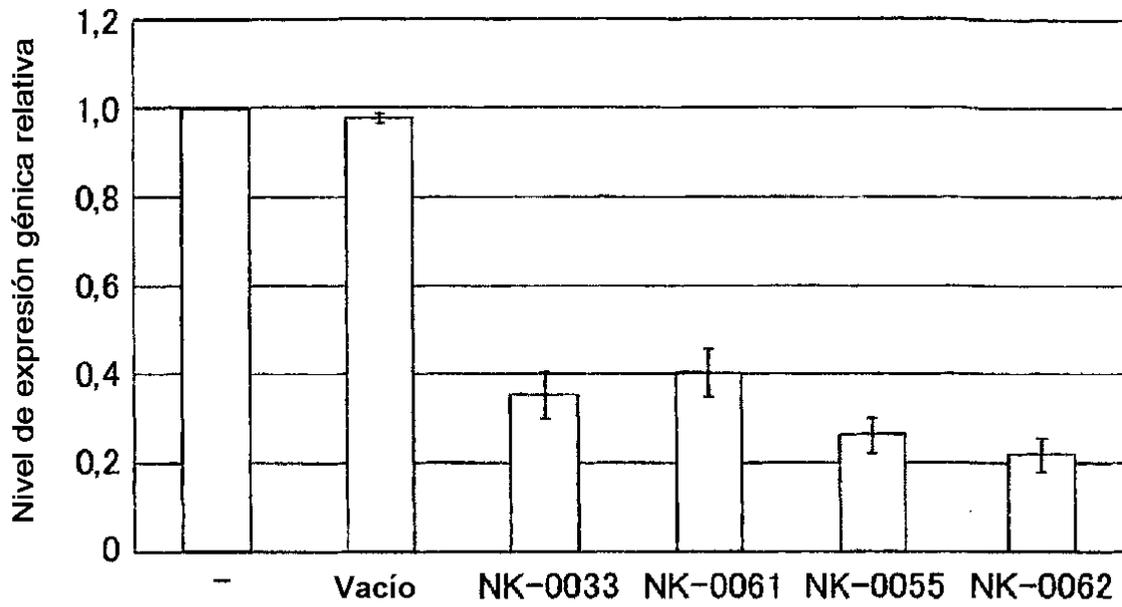


FIG. 19

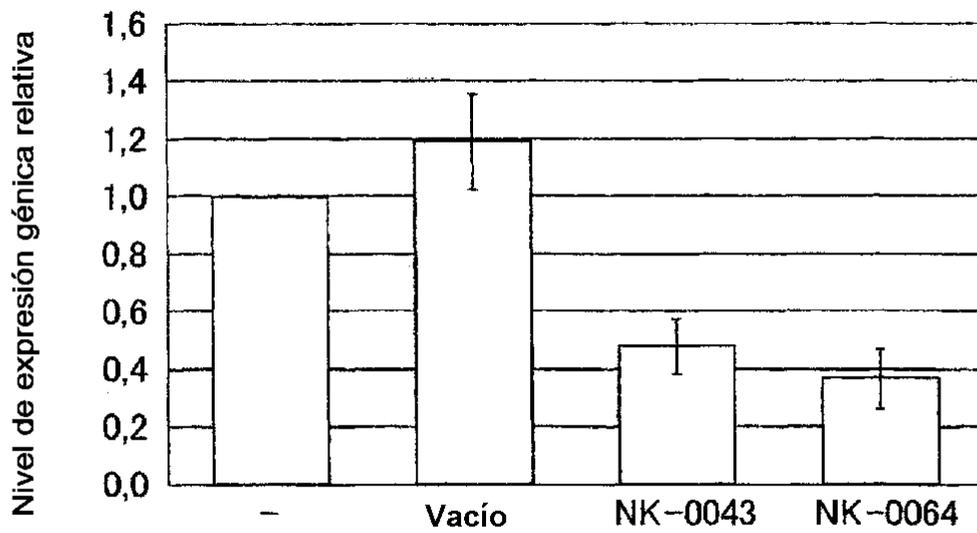


FIG. 20

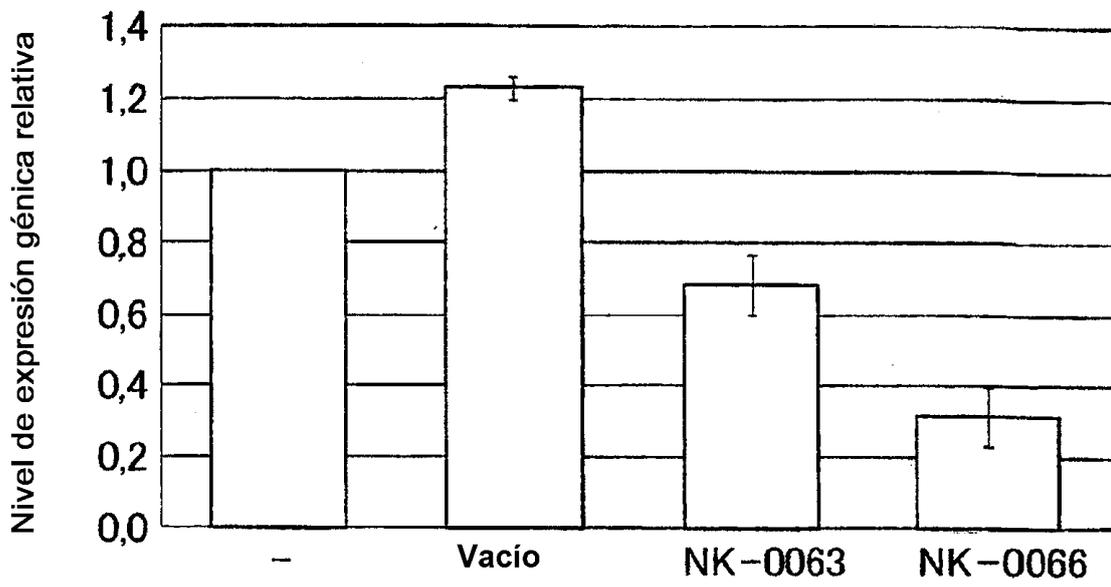


FIG. 21

Xc+Yc/X+Y

NK-0047 26/27 5' - aaccaugagaguaugacaacagccCCACACCGGCUGUUGUCAUACUUUCUCAUGGUUCG^{*}UUUCGg -3' 61

NK-0025 25/26 5' - accaugagaguaugacaacagccCCACACCGGCUGUUGUCAUACUUUCUCAUGGUUC^{*}UUUCGg -3' 62

NK-0048 24/25 5' - accaugagaguaugacaacagccCCACACCGGCUGUUGUCAUACUUUCUCAUGGUUC^{*}UUUCGg -3' 63

NK-0049 23/24 5' - ccaugagaguaugacaacagccCCACACCGCUGUUGUCAUACUUUCUCAUGGUU^{*}UUUCGa -3' 64

NK-0050 23/24 5' - accaugagaguaugacaacagccCCACACCGCUGUUGUCAUACUUUCUCAUGGUUC^{*}UUUCGg -3' 65

NK-0051 22/23 5' - ccaugagaguaugacaacagccCCACACCGUGUUGUCAUACUUUCUCAUGGUU^{*}UUUCGa -3' 66

NK-0052 21/22 5' - caugagaguaugacaacagccCCACACCGUGUUGUCAUACUUUCUCAUGGUU^{*}UUUCGa -3' 67

NK-0053 21/22 5' - ccaugagaguaugacaacagccCCACACCGUGUUGUCAUACUUUCUCAUGGUU^{*}UUUCGa -3' 68

NK-0054 20/21 5' - caugagaguaugacaacagccCCACACCGUGUUGUCAUACUUUCUCAUGGUU^{*}UUUCGa -3' 69

FIG. 22

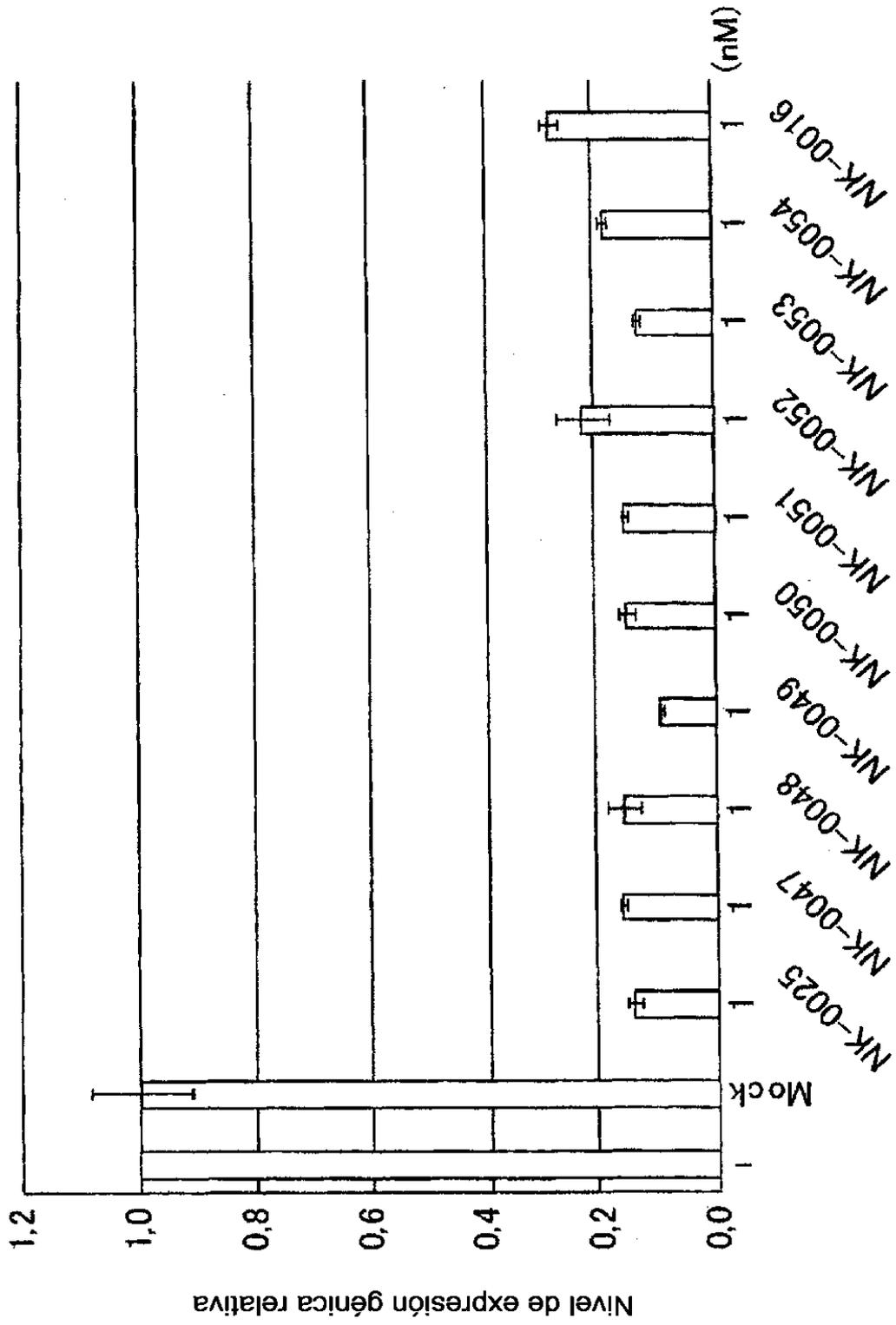


FIG. 23