

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 936**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2008 E 08780679 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2162538**

54 Título: **Oligómeros para agentes terapéuticos**

30 Prioridad:

22.05.2007 DK 200700751

30.11.2007 DK 200701718

14.12.2007 DK 200701785

11.04.2008 DK 200800534

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

13.06.2016

73 Titular/es:

ARCTURUS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)

10628 Science Center Drive Suite 200

San Diego, CA 92121, US

72 Inventor/es:

WENGEL, JESPER

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 573 936 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

Oligómeros para agentes terapéuticos

5 **Antecedentes**

10 En los últimos años, el ARN de interferencia (ARNi) ha supuesto una atracción masiva, ya que proporciona un medio para silenciar la expresión de un gen diana. Proporciona una investigación básica con un método para el estudio de las genéticas y bioquímicas, y la función de genes individuales y productos genéticos. En consecuencia, el ARN de interferencia se ha convertido en una herramienta fundamental para validación de dianas en la industria farmacéutica. Además, se han realizado inversiones sustanciales con el objetivo de desarrollar complejos de ARN capaces de mediar complejos de ARN de interferencia que se pueden usar como fármacos.

15 El atractivo del ARNi para uso en terapia radica en su sensibilidad y especificidad de secuencias. Sin embargo, han surgido preocupaciones con respecto a la especificidad de secuencias, por ejemplo debido a que el complejo de ARN con una cadena errónea puede dirigir la respuesta a los ácidos nucleicos diana erróneos. Además, los complejos de ARN de un cierto tamaño inducen una respuesta dependiente de interferón no específica, que también es indeseable.

20 La solicitud de patente US2003/0108923 describe complejos de ARN capaces de mediar el ARNi que comprenden una cadena no codificante y una hebra pasajera, en el que las hebras tienen una longitud de 21-23 nucleótidos. Se sugiere que los complejos de ARN se usen para aplicaciones terapéuticas.

25 De forma análoga, la solicitud de patente US2005/0234007 describen complejos de ARN capaces de mediar el ARNi que comprenden una cadena no codificante y una hebra pasajera, en el que el complejo comprende salientes en la posición 3'. Se sugiere que los complejos de ARN se usen para aplicaciones terapéuticas.

30 El documento WO2005/073378 describe complejos de ARNi que contienen nucleótidos químicamente modificados capaces de mediar el ARNi que comprenden una cadena no codificante y una hebra pasajera. Los complejos de ARN descritos en la memoria descriptiva comprenden restos de LNA y se manifiesta que la incorporación de restos de LNA cercanos al extremo en la posición 5' de una de las hebras puede controlar la hebra que se incorpora en el complejo de RISC, porque la hebra que forma el par de bases más débil en el extremo en la posición 5' se incorpora en el complejo de RISC.

35 El documento WO2005/089287 desvela complejos de ARN de doble hebra diseñados para reducir la expresión de genes diana en células eucariotas. El documento WO2006/085987 desvela moléculas de ARNi dirigidas contra un gen de interés en células epiteliales respiratorias.

40 El ARNi es solamente una de varias estrategias para mediar la inhibición de la expresión genética usando oligonucleótido, incluyendo los complejos de ARN de la presente invención. Estas diferentes estrategias, que incluyen escisión de ADN mediada por RNasa H, unión a ARN de bloqueo estérico, escisión de ARN mediada por ADNzima o Ribozima y enfoques de ARNi se han descrito en la bibliografía junto con la naturaleza de nucleótidos modificados químicamente seleccionados que son compatibles con la actividad biológica [J. Kurreck, Eur. J. Biochem. 2003, 270, 1628].

45 Los monómeros B-E sustituidos con hidroximetilo de la invención se han incorporado en hebras de ADN, y por lo tanto se han informado procedimientos para la preparación de sus componentes básicos de fosforamida para síntesis automatizada de ADN/ARN [K. D. Nielsen *et al.*, Bioorg. Med. Chem. 1995, 3, 1493; H. Thrane *et al.*, Tetrahedron 1995, 51, 10389; P. Nielsen *et al.*, Bioorg. Med. Chem. 1995, 3, 19]. En las hebras de ADN se han incorporado exclusivamente monómeros de timina. Ninguno de los monómeros sustituidos con hidroximetilo se incorporado anteriormente en hebras de ARN.

50 En un informe, una o dos 2'-secouridinas se incorporaron a un oligonucleótido de ADN y se observó un efecto positivo en la degradación del ARN mediada por RNasa H (Mangos MM, Min KL, Viazovkina E, Galarneau A, Elzagheid MI, Parniak MA, Damha MJ., J Am Chem Soc. 2003 Jan 22; 125 (3): 654-61).

Sumario

60 La presente invención proporciona un dúplex de ARN que comprende al menos un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria con un ARNm diana, en el que el oligonucleótido comprende un monómero de 2'-3'-seconucleótido acíclico, en el que el dúplex de ARN disminuye la expresión de un ARNm diana.

65 Un objeto de la presente invención es proporcionar complejos de ARN, que tengan efectos colaterales reducidos en comparación con los complejos de ARN usados habitualmente. Otro objeto es proporcionar complejos de ARN que induzcan una disminución de la respuesta a interferón. Además, otro objeto es proporcionar complejos de ARN con

mejores propiedades con respecto a la estabilidad hacia la degradación enzimática en cultivos celulares o *in vivo*. Otro objeto es proporcionar complejos de ARN que presenten mejora de la función reguladora genética, por ejemplo, efecto de silenciamiento genético, en cultivos celulares o *in vivo*, con respecto a los complejos de ARN no modificados. Además, otros objetos son proporcionar complejos de ARN que se dirijan hacia órganos o tejido específicos, y que sean capaces de penetrar la membrana celular.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

Se muestran ejemplos de las diferentes arquitecturas de los nucleótidos sustituidos con hidroximetilo que se incorporan en los complejos de ARN. El Monómero A se muestra para comparación y es un monómero de ARN con su armazón de ribosa. La característica de los Monómeros B-E que están comprendidos en los complejos de ARN de la invención es que contienen un sustituyente que es un grupo hidroximetilo ("el grupo hidroximetilo libre"), y por lo tanto la invención se titula "Oligonucleótidos de ARN sustituidos con hidroximetilo y complejos de ARN". El grupo hidroximetilo libre está unido, por ejemplo, al átomo de C4' de un armazón de ribosa cíclica o al átomo de C1' de un armazón con base de ribosa acíclica. Los nucleótidos sustituidos con hidroximetilo de la invención contienen otros átomos de oxígeno cada uno de los cuales está unido a un átomo de fósforo y por lo tanto participan en la formación de enlaces internucleótido (véase la Figura 1). Uno o más de estos otros átomos de oxígeno debe formar parte de un grupo hidroxilo que es el caso cuando uno o más de los nucleótidos sustituidos con hidroximetilo de los complejos de ARN de la invención está o están situados en el extremo en la posición 3' o 5' de una hebra de ARN. Cuando uno de los nucleótidos sustituidos con hidroximetilo de los complejos de ARN de la invención se sitúa en la posición en el extremo 3' y/o en el extremo 5' de las hebras de ARN, un grupo hidroxilo de este monómero puede estar fosforilado, como puede ser el caso para cualquier monómero de ARN natural situado en posición terminal. A los nucleótidos sustituidos con hidroximetilo de la invención se les une una nucleobase como uracilo, timina, citosina, 5-metilcitosina, adenina, guanina o cualquier otra nucleobase o análogo de nucleobase naturales o sintéticos (denominados "Base" en la Figura 1).

Figura 2

Se muestran variantes derivatizadas, funcionalizadas y conjugadas de los monómeros sustituidos con hidroximetilo. Como ejemplos se muestran derivatizadas, funcionalizadas y conjugadas del monómero D 2',3'-seco-ARN sustituido con hidroximetilo (véase la Figura 1). El Monómero F contiene un grupo R unido a través de un enlace éter. El Monómero G contiene un grupo R unido a través de un enlace tioéter. El Monómero H contiene un grupo R unido a través de un enlace amida. El Monómero I contiene un grupo R unido a través de un enlace amino. El Monómero J contiene un grupo R unido a través de una unidad de piperazino. Mediante la incorporación de uno o varios de tales monómeros en los complejos de ARN de la invención, las propiedades de los complejos de ARN se pueden modular. Por ejemplo pueden aumentar la bioestabilidad, aumentar la capacidad de direccionamiento de ARN o propiedades específicas de administración a introducir, y se pueden unir grupos fluorescentes para fines de detección.

Figura 3

Estructuras de dos de los monómeros sustituidos con hidroximetilo (Monómero C y Monómero D) que pueden ser un monómero de un oligonucleótido o complejo de ARN.

Figura 4

Resultados de silenciamiento genético para complejos de ARNip de la invención que contienen "monómero X" (es decir, Monómero D de 2',3'-seco-ARN). Los resultados se obtuvieron con la cadena codificante W130 (véase la Figura 4 para secuencia de nucleótidos) que contiene Monómero D que tiene uracilo como la nucleobase (mostrado como 'X' en la cadena codificante W130). La secuencia de ácidos nucleicos de las cadenas no codificantes usadas en este estudio se enumeran en la parte inferior de esta figura (todos los monómeros X en las secuencias no codificantes son Monómero D que tiene uracilo como la nucleobase). Los monómeros con un superíndice "L" representan un ácido nucleico bloqueado (por ejemplo, T^L indica un ácido nucleico o LNA bloqueado con timina).

Figura 5

Resultados de silenciamiento genético para complejos de ARNip de la invención que contienen "monómero X" (es decir, Monómero D de 2',3'-seco-ARN). Los resultados se obtuvieron con la cadena codificante W131 (véase la Figura 5 para secuencia de nucleótidos) que contiene Monómero D que tiene uracilo como la nucleobase (mostrado como 'X' en la cadena codificante W131). La secuencia de ácidos nucleicos de las cadenas no codificantes usadas en este estudio se enumeran en la parte inferior de Figura 4 (todos los monómeros X en las secuencias no codificantes son Monómero D que tiene uracilo como la nucleobase).

Figura 6

Resultados de silenciamiento genético para complejos de ARNip de la invención que contienen "monómero X" (es decir, Monómero D de 2',3'-seco-ARN). Estos resultados se obtuvieron con la cadena codificante W282 (véase la Figura 6 para secuencia de nucleótidos) que contiene Monómero D que tiene citosina como nucleobase (sC, primera X del extremo en la posición 5' de la secuencia de W282), adenina (sA, segunda X del

extremo en la posición 5' de la secuencia de W282) y citosina (sC, última X del extremo en la posición 3' de la secuencia de W282). La secuencia de ácidos nucleicos de las cadenas no codificantes usadas en este estudio se enumeran en la parte inferior de Figura 4 (todos los monómeros X en las secuencias no codificantes son Monómero D que tiene uracilo como la nucleobase).

5

Figura 7

Resultados de silenciamiento genético para complejos de ARNip de la invención que contienen "monómero X" (es decir, Monómero D de 2',3'-seco-ARN). Estos resultados se obtuvieron con la cadena codificante W194 (véase la Figura 7 para secuencia de nucleótidos). La secuencia de ácidos nucleicos de las cadenas no codificantes usadas en este estudio se enumeran en la parte inferior de (Figura 4 (todos los monómeros X en las secuencias no codificantes son Monómero D que tiene uracilo como la nucleobase). Los monómeros con un superíndice "L" representan un ácido nucleico bloqueado (por ejemplo, T^L indica un ácido nucleico o LNA bloqueado con timina).

10

15

Figura 8

Resultados de silenciamiento genético para complejos de ARNip de la invención que contienen "monómero X" (es decir, Monómero D de 2',3'-seco-ARN). Estos resultados se obtuvieron con la cadena codificante W181 (véase la Figura 8 para secuencia de nucleótidos). La secuencia de ácidos nucleicos de las cadenas no codificantes usadas en este estudio se enumeran en la parte inferior de Figura 4 (todos los monómeros X en las secuencias no codificantes son Monómero D que tiene uracilo como la nucleobase). Los monómeros con un superíndice "L" representan un ácido nucleico bloqueado (por ejemplo, T^L indica un ácido nucleico o LNA bloqueado con timina).

20

25

Figura 9

Resultados de silenciamiento genético para complejos de ARNip de la invención que contienen "monómero X" (es decir, Monómero D de 2',3'-seco-ARN). Estos resultados se obtuvieron con la cadena codificante W129 (véase la Figura 9 para secuencia de nucleótidos) que contiene Monómero D que tiene uracilo como la nucleobase (mostrado como 'X' en la cadena codificante W129 la cadena codificante). Las cadenas no codificantes incluidas en este estudio se enumeran en la parte inferior de la Figura 4 (todos los monómeros X en las secuencias no codificantes son Monómero D que tiene uracilo como la nucleobase). Los monómeros con un superíndice "L" representan un ácido nucleico bloqueado (por ejemplo, T^L indica un ácido nucleico o LNA bloqueado con timina).

30

Descripción detallada

35

Algunas características específicas descritas en un aspecto de la invención también se aplican a otros aspectos de la invención. Por ejemplo con algunas características descritas con respecto a los complejos de ARN del primer aspecto también se aplican a los oligonucleótidos del noveno aspecto y a los individuos de ARN del décimo aspecto cuando sea apropiado.

40

Primer aspecto, complejos de ARN

Algunos complejos de ARN en la forma de dúplex de ARNip pueden mediar diversas modificaciones de ácidos nucleicos diana en la célula. En este proceso, la cadena no codificante del complejo actúa como una guía, a medida que la cadena no codificante se puede hibridar con ácidos nucleicos diana que tienen tramos de complementariedad de secuencia con la cadena no codificante.

45

Antes del direccionamiento de un ácido nucleico diana, la cadena no codificante se incorpora a menudo en un complejo de proteína guiada por ARN (RGPC), que puede actuar sobre el ácido nucleico diana. Un ejemplo de un complejo de proteína guiado por ARN es el Complejo de Silenciamiento Inducido por ARN (RISC). Se cree que existen otros RGPC de este tipo y que los complejos de ARN de la presente invención también serán ventajosos, cuando se usen con estos otros RGPC o incluso sin interactuar con ningún RGPC.

50

Un objeto de la presente invención es estabilizar los complejos de ARN con respecto a la degradación nucleolítica en medios biológicos (suero, *in vivo*, en cultivos celulares).

55

Otro objeto de la presente invención es mejorar el efecto silenciamiento genético de un complejo de ARN de doble hebra. Esta mejora se puede relacionar, por ejemplo, con el aumento de potencia, reducción de los efectos colaterales, reducción de la estimulación inmune, aumento de la estabilidad para almacenamiento, aumento de la estabilidad en medios biológicos como suero, etc., aumento de la duración de la acción y mejora de las propiedades farmacocinéticas, todas relativas al complejo de ARN sin modificar nativo.

60

Un objeto de la invención es asegurar que solamente la cadena no codificante, y no la hebra pasajera, de un complejo de ARNip de la invención medien modificaciones de ácidos nucleicos diana. El cumplimiento de este objeto proporcionará complejos de ARN con menos efectos colaterales.

65

Otro objeto de la invención es asegurar una estabilidad suficiente de un complejo de ARN en medios biológicos. Por lo tanto, un objeto es proporcionar complejos de ARN que presenten aumento de la función de regulación genética, por ejemplo, efecto de silenciamiento genético, en cultivos celulares o *in vivo*, con respecto a complejos de ARN sin modificar.

5 La idea básica de la invención es incorporar uno o más monómeros sustituidos con hidroximetilo en un complejo de ARN de la invención. En el caso de ARNip, esto podría conducir a una incorporación preferente solamente de una hebra del complejo en RISC. La incorporación de uno o más monómeros sustituidos con metilo en una (o más) hebra(s) de ARN de un complejo de ARN mejorará el periodo de duración del complejo de ARN en medios biológicos e *in vivo*, y por lo tanto conducirá a una mejora de la actividad biológica, por ejemplo, mejora de la actividad de regulación genética.

15 Una hebra de ARN de un complejo de ARN de la invención puede comprender nucleótidos de ARN naturales, modificaciones de ARN conocidas por ser compatibles con la actividad de silenciamiento genético [Nawrot y Sipa, Curr. Topics Med. Chem. 2006, 6, 913-925], y los monómeros sustituidos con hidroximetilo (Figura 1). En su lugar, se pueden usar enlaces de fosfodiéster pueden conectar los monómeros individuales, además de enlaces modificados tales como enlaces de fosforotioato y otros enlaces conocidos por una persona experta en la materia [Nawrot y Sipa, Curr. Topics Med. Chem. 2006, 6, 913-925]. Los complejos de ARN pueden comprender dos hebras que en conjunto constituyen un dúplex de ARNip formado por una cadena no codificante (en el presente documento la cadena no codificante también se denomina hebra guía) y una hebra pasajera (en el presente documento la hebra pasajera también se denomina cadena codificante), pero en el presente documento una molécula que imita a un microARN de una sola hebra también se considera un complejo de ARN de la invención, ya que es una molécula no codificante de una sola hebra que por ejemplo es útil para dirección a mi en to de los microARN.

25 En las realizaciones de la invención, el complejo de ARN comprende uno o más monómero(s) de nucleótido sustituido con hidroximetilo (véase la Figura 1). A continuación como uno de tales ejemplos aparece un monómero de nucleótido acíclico, más preferentemente un monómero acíclico seleccionado de entre el grupo que consiste en monómeros D-J. Por lo tanto, las realizaciones descritas en el primer aspecto con respecto a monómeros de nucleótido modificado con hidroximetilo se aplicarán para otras realizaciones con respecto a monómeros de nucleótido acíclico.

35 El uso de monómeros de nucleótido modificado con hidroximetilo se puede favorecer por varias razones. Por ejemplo, se pueden usar para aumentar el efecto de silenciamiento genético de los complejos de ARN y la incorporación de uno o más monómero(s) de nucleótido modificado con hidroximetilo, por ejemplo hacia los extremos de los complejos de ARN inducen una estabilidad significativa hacia la degradación nucleolítica. También se pueden usar para disminuir el efecto de silenciamiento genético de la hebra pasajera de un complejo de ARNip reduciendo de este modo el número de efectos colaterales.

40 En una realización preferente de la invención, el complejo de ARN que comprende uno o más monómero(s) de nucleótido modificado con hidroximetilo es una construcción de ARNip.

Por consiguiente, en una realización, la cadena no codificante de una construcción de ARNip comprende uno o más monómero(s) de nucleótido modificado con hidroximetilo.

45 En otra realización, la hebra pasajera de una construcción de ARNip comprende uno o más monómero(s) de nucleótido modificado con hidroximetilo. En otra realización más, cada una de una primera y segunda moléculas de ARN de una hebra pasajera con muesca de una construcción de ARNip contiene uno o más monómero(s) de nucleótido modificado con hidroximetilo.

50 En una realización de la invención, el número de monómeros de nucleótido modificado con hidroximetilo en la cadena no codificante es 10. En otras realizaciones de la invención, el número de monómero(s) de nucleótido modificado con hidroximetilo en la cadena no codificante es 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1, respectivamente.

55 En otra realización, todos los nucleótidos de la cadena no codificante son monómeros de nucleótido modificado con hidroximetilo.

60 En una realización preferente, todos los monómeros de nucleótido modificado con hidroximetilo en la cadena no codificante están presentes en las posiciones 1-8, en la que las posiciones se cuentan desde el extremo en la posición 5'. Incluso más preferentemente, los monómeros de nucleótido modificado con hidroximetilo en la cadena no codificante están presentes en las posiciones 2-7 que corresponden a la denominada región semilla de un microARN. Por lo tanto, la presencia de monómeros de nucleótido modificado con hidroximetilo en las secciones mencionadas anteriormente evitará que la cadena no codificante actúe como un microARN, que reduce los efectos colaterales cuando se pretende que la cadena no codificante funcione como ARNip.

65 En una realización preferente, al menos un monómero de nucleótido modificado con hidroximetilo está presente en una de las posiciones 9-16, en el que las posiciones se cuentan desde el extremo de la posición 5'. Incluso es más

preferente la presencia de 2, 3, 4, 5 o 6 monómeros de nucleótido modificado con que está presente en las posiciones 9-16 y en otra realización, monómeros de nucleótido modificado con hidroximetilo en la cadena no codificante están presentes en todas las posiciones 9-16. En una realización, el monómero de nucleótido modificado con hidroximetilo está solamente presente en las regiones 9-16 y no en el resto de la cadena no codificante.

5 Incluso más preferentemente, los monómeros de nucleótido modificado con hidroximetilo en la cadena no codificante están presentes en la posición 9-11 y preferentemente, no en el resto del oligonucleótido. La presencia de monómeros de nucleótido modificado con hidroximetilo en las regiones mencionadas anteriormente inducirá a que la cadena no codificante actúe como un microARN, es decir, asegurará que el efecto del ARNip sea mínimo y que el efecto del microARN sea mucho más elevado. Este efecto probablemente se deriva de la tendencia reducida hacia la unión de longitud completa debido a la afinidad reducida causada por la presencia de un monómero sustituido con hidroximetilo acíclico, por ejemplo el monómero D.

10 De forma análoga, en otra realización de la invención, el número de monómeros de nucleótido modificado con hidroximetilo en la hebra pasajera de un complejo de ARNip de la invención es 10. En otras realizaciones de la invención, el número de monómeros de nucleótido modificado con hidroximetilo en la hebra pasajera de un complejo de ARNip de la invención es 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1, respectivamente.

15 En otra realización, todos los nucleótidos de la hebra pasajera de un complejo de ARNip de la invención son monómeros de nucleótido modificado con hidroximetilo.

En una realización, tanto la cadena no codificante como la hebra pasajera de un complejo de ARNip de la invención contienen uno o más monómero(s) de nucleótido modificado con hidroximetilo.

20 En un aspecto, la presente invención proporciona un complejo de ARN capaz de mediar modificaciones en ácido nucleico de un ácido nucleico diana. Tal complejo de ARN puede ser por ejemplo un ARNip, microARN o microARN precursor (pre-microARN).

25 El complejo de ARN de un complejo de ARNip de la invención comprende una región de doble hebra núcleo que comprende una cadena no codificante y una hebra pasajera que se hibrida con la cadena no codificante.

30 Una ARNm como se denomina en el presente contexto es un ácido nucleico, que tiene una complementariedad significativa con la cadena no codificante del complejo. Preferentemente, la complementariedad es perfecta con respecto a un tramo de varios nucleótidos.

35 Por lo tanto, en una realización, la complementariedad es perfecta con respecto a un tramo de 25 nucleótidos.

40 En otras realizaciones, la complementariedad es perfecta con respecto a un tramo de 24 nucleótidos, 23 nucleótidos, 22 nucleótidos, 21 nucleótidos, 20 nucleótidos, 19 nucleótidos, 18 nucleótidos, 17 nucleótidos, 16 nucleótidos, 15 nucleótidos, 14 nucleótidos, 13 nucleótidos, 12 nucleótidos, 11 nucleótidos, 10 nucleótidos, 9 nucleótidos, 8 nucleótidos, 7 nucleótidos o 6 nucleótidos, respectivamente.

45 En una realización, el tramo de complementariedad comprende 1 falta de coincidencia. En otras realizaciones, el tramo de complementariedad comprende 2 faltas de coincidencias, 3 faltas de coincidencias o 4 faltas de coincidencias, respectivamente. Una falta de coincidencia de 1 es una región en el tramo de complementariedad en la que no se puede formar un par de bases, por ejemplo cuando G está enfrentada a A. Cuando están presentes más faltas de coincidencias, éstas pueden ser adyacentes entre sí o se pueden espaciar en diferentes regiones del tramo de complementariedad.

50 El complejo de ARN de un complejo de ARNip de la invención comprende, en una realización preferente, una región de doble hebra núcleo, que es sustancialmente una región de doble hebra. Las regiones de doble hebra en el complejo de ARN están relacionadas principalmente con salientes del complejo.

55 Por lo tanto, en una realización, la región de doble hebra de un complejo de ARNip de la invención comprende 1 falta de coincidencia. En otras realizaciones, la región de doble hebra comprende 2 faltas de coincidencias, 3 faltas de coincidencias y 4 faltas de coincidencias, respectivamente.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "modificación de ácido nucleico diana" se refiere a cualquier modificación de un ácido nucleico diana, incluyendo las que influyen en la actividad del ácido nucleico diana, sin afectar a la estructura del ácido nucleico diana.

65 El ácido nucleico diana de la invención es ARNm. Por consiguiente, en una realización la modificación del ácido nucleico mediada por el complejo de ARN es ARN de interferencia (ARNi). En una realización preferente, el ARNi media la degradación del ARNm. En otra realización preferente, el ARNi media la inhibición de la traducción del ARNm. En otra realización, el ARNi media tanto la inhibición de la traducción como la degradación del ARNm.

El tamaño del complejo de ARN de la invención puede variar a la vez que aún se cumplen uno o más objetos de la

invención. Esto se aplica por ejemplo cuando el objeto en particular es un efecto colateral reducido.

5 Por lo tanto, la región de doble hebra núcleo de un complejo de ARNip de la invención puede comprender un número de pares de bases seleccionado de entre el grupo de 10 pares de bases, 11 pares de bases, 12 pares de bases, 13 pares de bases, 14 pares de bases, 15 pares de bases, 16 pares de bases, 17 pares de bases, 18 pares de bases, 19 pares de bases, 20 pares de bases, 21 pares de bases, 22 pares de bases, 23 pares de bases, 24 pares de bases and 25 pares de bases, 26 pares de bases, 27 pares de bases, 28 pares de bases, 29 pares de bases, 30 pares de bases, 35 pares de bases, 40 pares de bases, 42 pares de bases, 45 pares de bases, 50 pares de bases, 55 pares de bases, 60 pares de bases o 62 pares de bases.

10 En una realización, la región de doble hebra núcleo de un complejo de ARNip de la invención comprende de 15 a 40 pares de bases.

15 En otra realización preferente, la región de doble hebra núcleo de un complejo de ARNip de la invención comprende 18-22 pares de bases.

20 En una realización, la región de doble hebra núcleo de un complejo de ARNip de la invención tiene una longitud incluso superior a 40 pares de bases, aunque se sabe que en algunas células, la introducción de complejo de ADN de doble hebra de una longitud mayor puede inducir una respuesta no específica dependiente de interferón. En una realización de este tipo, se contempla que el complejo se procesa a complejos de ARN de doble hebra más cortos antes de conectarse con un RGPC. Una enzima de tipo RNasa III tal como DICER puede ejecutar el procesamiento. Dicer también procesa el ARN de doble hebra con una longitud inferior a 40 pares de bases y tales complejos de ARN (denominados sustratos Dicer) tienen diversas ventajas en comparación con el ARNip que entra en RISC sin procesamiento. Por lo tanto, en una realización, los complejos de ARNm de la invención son sustratos de Dicer.

25 En otra realización más, la región de doble hebra núcleo de un complejo de ARNip de la invención tiene una longitud inferior a 10 pares de bases y por lo tanto comprende de uno a nueve pares de bases.

30 En una realización de la invención, la región de doble hebra núcleo el complejo de ARN está formado por más de dos hebras de ARN.

En una realización de la invención, la región de doble hebra núcleo el complejo de ARN está formado por tres hebras de ARN.

35 En otra realización de la invención, la región de doble hebra núcleo el complejo de ARN está formado por cuatro o más hebras de ARN.

40 En una realización preferente de la invención, el complejo de ARNip de la invención comprende salientes. Como se usa en el presente contexto, un saliente se refiere a una región de doble hebra corta que sigue a una región de doble hebra.

En una realización, la cadena no codificante de un complejo de ARNip de la invención comprende un saliente en la posición 3'.

45 En otra realización, la hebra pasajera de un complejo de ARNip de la invención comprende un saliente en la posición 3'.

En otra realización más, la cadena no codificante de un complejo de ARNip de la invención comprende un saliente en la posición 5'.

50 Además, en otra realización, la hebra pasajera de un complejo de ARNip de la invención comprende un saliente en la posición 5'.

55 En una realización preferente, tanto la cadena no codificante como la hebra pasajera de un complejo de ARNip de la invención comprenden un saliente en la posición 3'.

60 Los salientes de un complejo de ARNip de la invención pueden tener una longitud variable, sin interferir con la función básica del complejo. Por lo tanto, en una realización, los salientes se seleccionan entre el grupo de salientes con una longitud de 1 nucleótido, 2 nucleótidos, 3 nucleótidos, 4 nucleótidos, 5 nucleótidos, 6 nucleótidos, 7 nucleótidos y 8 nucleótidos.

Los salientes más preferentes de un complejo de ARNip de la invención son salientes con una longitud de 1, 2 y 3 nucleótidos, respectivamente.

65 En una realización, el saliente de la cadena no codificante de un complejo de ARNip de la invención tiene la misma longitud que el saliente de la hebra pasajera.

En otra realización, el saliente de la cadena no codificante de un complejo de ARNip de la invención no tienen la misma longitud que el saliente de la hebra pasajera.

5 Además, en otra realización de un complejo de ARNip de la invención, el complejo de ARN comprende al menos un extremo romo. Un "extremo romo" se refiere a un extremo de un ácido nucleico de doble hebra, que no tiene ningún nucleótido saliente, es decir, ambas hebras del ácido nucleico de doble hebra terminan en la misma posición.

En otra realización, el complejo de ARNip de la invención tiene extremos romos en ambos extremos.

10 Los complejos de ARN preferentes de la invención son similares en su estructura general a los productos de procesamiento de DICER de complejos de ARN de doble hebra más largos. En otra realización, los complejos de ARN de la invención son sustratos de Dicer como se ha mencionado anteriormente.

15 Otros complejos de ARN preferentes de la invención son complejos en los que la región de doble hebra núcleo comprende 18-22 pares de bases, y en los que cada una de la cadena no codificante y la hebra pasajera comprende un saliente en la posición 3' de 1-3 nucleótidos.

20 La cadena no codificante del complejo de ARN de la invención puede tener longitudes variables, sin interferir con la función del complejo. Por lo tanto, en realizaciones preferentes, la cadena no codificante es una 8-mer, 9-mer, 10-mer, 11-mer, 12-mer, 13-mer, 14-mer, 15-mer, 16-mer, 17-mer, 18-mer, 19-mer, 20-mer, 21-mer, 22-mer, 23-mer, una 24-mer, una 25-mer, una 26-mer, una 27-mer, una 28-mer, 29-mer, 30-mer, 31-mer, 32-mer, 33-mer, 34-mer, 35-mer, 36-mer, 37-mer, 38-mer, 39-mer, 40-mer, 41-mer, 42-mer, 43-mer, 44-mer, 45-mer, 46-mer, 47-mer, 48-mer, 49-mer, 50-mer, 51-mer, 52-mer, 53-mer, 54-mer, 55-mer, 56-mer, 57-mer, 58-mer, 59-mer, 60-mer, 61-mer o una 62-mer, respectivamente. Se debe observar que por ejemplo una 19-mer es una cadena no codificante de 19
25 monómeros, es decir 19 nucleótidos.

En otra realización preferente, la cadena no codificante del complejo de ARN se selecciona entre el siguiente grupo de cadenas no codificantes: Una 15-mer, 16-mer, 17-mer, 18-mer, 19-mer, 20-mer, 21-mer, 22-mer y una 23-mer. En una realización, la hebra pasajera de un complejo de ARNip de la invención es discontinua. En una realización
30 de un complejo de ARNip de la invención, la hebra pasajera comprende varias moléculas de ARN separadas. El número de moléculas de ADN puede ser 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

En una realización, la longitud de las moléculas de ARN individuales de la hebra pasajera de un complejo de ARNip de la invención es superior a 4 monómeros. En otras realizaciones, la longitud de las moléculas de ARN individuales de la hebra pasajera es superior a 5 monómeros, 6 monómeros, 7 monómeros, 8 monómeros, 9 monómeros, 10
35 monómeros, 11 monómeros y 12 monómeros, respectivamente.

En otras realizaciones, la longitud de las moléculas de ARN individuales de la hebra pasajera de un complejo de ARNip de la invención es inferior a 5 monómeros, 6 monómeros, 7 monómeros, 8 monómeros, 9 monómeros, 10
40 monómeros, 11 monómeros y 12 monómeros, respectivamente.

En una realización de la invención, una hebra pasajera discontinua de un complejo de ARNip de la invención comprende una primera y una segunda molécula de ARN, que en conjunto forman la hebra pasajera discontinua, en la que la primera molécula de ARN se hibrida a la parte cadena abajo de la cadena no codificante y la segunda
45 molécula de ARN se hibrida a la parte cadena arriba de la cadena no codificante.

En una realización, la cadena no codificante de un complejo de ARNip de la invención es discontinua. Algunas discontinuidades preferentes de las cadenas no codificantes son las mismas que las discontinuidades preferentes de la hebra pasajera.
50

Una discontinuidad de una de las hebras de un complejo de ARNip de la invención puede ser una muesca. Una muesca se debe entender como una discontinuidad en una hebra de un ácido nucleico de doble hebra causada por la falta de un enlace fosfodiéster, sin embargo, sin que falte un nucleótido en el ácido nucleico de doble hebra. Por lo tanto, las bases opuestas a la muesca aún se hibridarán con bases en la hebra con muesca.
55

Otra discontinuidad de una de las hebras de un complejo de ARNip de la invención es una muesca alternativa, que se entiende como una discontinuidad en una hebra de un ácido nucleico de doble hebra causada por la falta de un enlace, o la falta de más de un enlace en la estructura principal de azúcar-fosfato, distinto del enlace fosfodiéster, sin embargo, sin que falte una nucleobase en el ácido nucleico de doble hebra. Por lo tanto, las bases opuestas a la
60 muesca aún se hibridarán con bases en la hebra con muesca.

Un hueco tal como se usa como una denominación cuando se puede describir que una hebra de ARN y un complejo de ARN de la invención tiene una discontinuidad en la que falta al menos un nucleótido o nucleósido o una nucleobase en el ácido nucleico de doble hebra.
65

Preferentemente, los extremos en la posición 5' del complejo de ARN están fosforilados o están disponibles para

fosforilación. Disponible para fosforilación se refiere a que el grupo hidroxilo en la posición 5' no se ha bloqueado por ejemplo mediante conjugación directa o mediante otra conjugación a otros grupos en la proximidad del grupo hidroxilo en la posición 5', que evitará que el grupo hidroxilo en la posición 5' se fosforele.

5 Por lo tanto, en una realización preferente de la invención, la molécula(s) de ARN del complejo de ARN comprende(n) un grupo fosfato en el extremo en la posición 5' y un grupo hidroxilo en la posición 3'.

En otra realización, la segunda molécula de ARN de un complejo de ARNip de la invención comprende un grupo fosfato en el extremo en la posición 5' y un grupo hidroxilo en la posición 3'.

10 En otra realización más, la cadena no codificante comprende un grupo fosfato en el extremo la posición 5' y un grupo hidroxilo en la posición 3'.

15 En algunas realizaciones de la invención, es preferente que el complejo de ARN comprenda análogos de nucleótido distintos de los nucleótidos modificados con hidroximetilo. Tales análogos de nucleótido distintos de los nucleótidos modificados con hidroximetilo se denominan a continuación "nucleótidos modificados de forma alternativa".

20 El uso de nucleótidos modificados de forma alternativa se puede favorecer por varias razones. Por ejemplo, se pueden usar para aumentar la temperatura de fusión de la región de doble hebra núcleo de un complejo de ARNip de la invención.

El uso de nucleótidos modificados de forma alternativa se puede favorecer para aumentar la temperatura de fusión de la estructura de doble hebra formada entre la cadena no codificante y el ácido nucleico diana.

25 Por consiguiente, en una realización, la cadena no codificante comprende nucleótidos modificados de forma alternativa.

En otra realización, la hebra pasajera de un complejo de ARNip de la invención comprende nucleótidos modificados de forma alternativa.

30 En otra realización más, cada una de una primera y una segunda moléculas de ADN de la hebra pasajera de un complejo de ARNip de la invención contiene nucleótidos modificados de forma alternativa.

35 En una realización de la invención, el número de nucleótidos modificados de forma alternativa en el complejo de ARN es 10. En otras realizaciones de la invención, el número de análogos de nucleótido en el complejo de ARN es 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1, respectivamente.

40 En una realización de la invención, el número de nucleótidos modificados de forma alternativa en la cadena no codificante es 10. En otras realizaciones de la invención, el número de análogos de nucleótido en la cadena no codificante es 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1, respectivamente.

45 En otra realización, todos los nucleótidos de la cadena no codificante son nucleótidos modificados de forma alternativa o una combinación de nucleótidos modificados de forma alternativa y nucleótidos sustituidos con hidroximetilo.

De forma análoga, en otra realización de la invención, el número de análogos de nucleótido en la hebra pasajera de un complejo de ARNip de la invención es 10. En otras realizaciones de la invención, el número de análogos de nucleótido en la hebra pasajera es 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1, respectivamente.

50 En otra realización, todos los nucleótidos de la hebra pasajera de un complejo de ARNip de la invención son análogos de nucleótido o una combinación de nucleótidos modificados de forma alternativa y nucleótidos sustituidos con hidroximetilo.

55 En una realización, tanto la cadena no codificante como la hebra pasajera de un complejo de ARNip de la invención contienen nucleótidos modificados de forma alternativa.

En una realización, los nucleótidos modificados de forma alternativa el complejo de ARN son idénticos, es decir, son todos por ejemplo LNA o todos 2'-O-Me-ARN. En otra realización, se usan diversos nucleótidos modificados de forma alternativa diferentes en el mismo complejo de ARN.

60 En una realización, el complejo de ARN comprende enlaces de fosforotioato.

En otra realización, el complejo de ARN comprende una mezcla de enlaces naturales de fosfodiéster y fosforotioato.

65 Algunos análogos de nucleótido preferentes de la invención son análogos de nucleótido seleccionados de entre el grupo de monómeros de 2'-O-alkil-ARN, monómeros de 2'-amino-ADN, monómeros de 2'-fluoro-ADN, monómeros

de LNA, monómeros de HNA, monómeros de ANA, monómero de FANA, monómeros de ADN, monómeros de PNA y monómeros de INA, pero también se pueden usar otros monómeros [Nawrot y Sipa, Curr. Topics Med. Chem. 2006, 6, 913-925].

- 5 En una realización, el sustituyente de hidroximetilo de los monómeros sustituidos con hidroximetilo de la invención está funcionalizado con un grupo de conjugación. Un grupo de conjugación es un grupo conocido por una persona experta en la materia que cambia, expande o mejora las propiedades de un complejo de ARN de la invención. Tales grupos pueden ser útiles para modular la distribución celular, distribución de órgano, distribución del tejido, temperaturas de fusión híbridas, afinidad por diana, bioestabilidad, señalización de hibridación, etc.
- 10 En una realización, el sustituyente de hidroximetilo de los monómeros sustituidos con hidroximetilo de la invención está funcionalizado con un enlace éter entre un grupo conjugado y el grupo metileno del sustituyente de hidroximetilo. Véase la Figura 2 (Monómero F).
- 15 En una realización, el sustituyente de hidroximetilo de los monómeros sustituidos con hidroximetilo de la invención se convierte en una funcionalidad tioéter antes de la incorporación en el complejo de ARN de la invención usando métodos conocidos por una persona en la materia. Véase la Figura 2 (Monómero G).
- 20 En otra realización, el sustituyente de hidroximetilo de los monómeros sustituidos con hidroximetilo de la invención se convierte en una funcionalidad mercaptometilo antes de incorporación en el complejo de ARN de la invención usando métodos conocidos por una persona en la materia. Véase la Figura 2 (Monómero G, R = H). Esta función mercapto se protege de forma apropiada como por ejemplo su derivado de acetilo durante la síntesis de ARN usando métodos conocidos por una persona experta en la materia.
- 25 En una realización, el sustituyente de hidroximetilo de los monómeros sustituidos con hidroximetilo de la invención se convierte en una funcionalidad amina antes de incorporación en el complejo de ARN de la invención usando métodos conocidos por una persona en la materia. Véase la Figura 2 (Monómero I, R = H). Esta funcionalidad amina se protege de forma apropiada como por ejemplo su derivado de trifluoroacetilo o Fmoc durante la síntesis de ARN usando métodos conocidos por una persona experta en la materia.
- 30 En una realización, el sustituyente de hidroximetilo de los monómeros sustituidos con hidroximetilo de la invención actúa como un asa para unión de grupos de conjugación unidos a amida. Esto implica la conversión de la unidad hidroxilo del sustituyente de hidroximetilo en una unidad amino, por ejemplo como se ha descrito anteriormente, y derivatización adicional de este grupo amino por ejemplo con un grupo de conjugación mediante formación de
- 35 enlace amida usando métodos conocidos por una persona en la materia. Esto se puede producir antes de la síntesis de ARN o después de la síntesis de ARN usando métodos conocidos por una persona en la materia (Figura 2, Monómero H).
- 40 En una realización, el sustituyente de hidroximetilo de los monómeros sustituidos con hidroximetilo de la invención actúa como un asa para unión de grupos de conjugación unidos a amino. Esto implica la conversión de la unidad hidroxilo del sustituyente de hidroximetilo en unidad amino, por ejemplo como se ha descrito anteriormente, y derivatización adicional de este grupo amino por ejemplo con un grupo de conjugación mediante formación de
- 45 enlace amino usando métodos conocidos por una persona en la materia. Esto se puede producir antes de la síntesis de ARN o después de la síntesis de ARN usando métodos conocidos por una persona en la materia (Figura 2, Monómero I).
- 50 En una realización más, el grupo de amina usado para conjugación es un grupo amino, un grupo piperazino o un grupo diamino alquilo. Tales monómeros se denominan monómeros derivatizados con amina. Cada uno de estos grupos se puede derivatizar o conjugar adicionalmente (Figura 2, Monómero J).
- 55 En una realización, el complejo de ARN de la invención tiene efectos colaterales reducidos en comparación con complejos de ARN nativos.
- En una realización preferente, el complejo de ARN tiene al menos un monómero sustituido con hidroximetilo de la invención en la cadena no codificante.
- 60 En otra realización preferente, el complejo de ARN tiene al menos un monómero sustituido con hidroximetilo de la invención incorporado en o alrededor de la denominada región semilla de la cadena no codificante, es decir, en al menos una de las posiciones n.º 1-12 del extremo en la posición 5' de la cadena no codificante.
- 65 Además, en otra realización preferente, el complejo de ARN tiene al menos un monómero sustituido con hidroximetilo de la invención incorporado en al menos una de las posiciones n.º 2-10 del extremo en la posición 5' de la cadena no codificante.
- Además, en otra realización preferente, el complejo de ARN tiene un monómero sustituido con hidroximetilo de la invención incorporado en una de las posiciones n.º 3-8 del extremo en la posición 5' de la cadena no codificante.

Además, en otra realización preferente, el complejo de ARN tiene un monómero sustituido con hidroximetilo de la invención incorporado en una de las posiciones n.º 7 o 8 del extremo en la posición 5' de la cadena no codificante.

5 Además, en otra realización preferente, el complejo de ARN tiene un monómero sustituido con hidroximetilo de la invención incorporado en la posición n.º 7 del extremo en la posición 5' de la cadena no codificante.

Además, en otra realización preferente, el complejo de ARN tiene un monómero sustituido con hidroximetilo de la invención incorporado en las posiciones n.º 9-16 del extremo en la posición 5' de la cadena no codificante.

10 Además, en otra realización preferente, el complejo de ARN tiene un monómero sustituido con hidroximetilo de la invención incorporado en las posiciones n.º 9-11 del extremo en la posición 5' de la cadena no codificante.

15 Además, en otra realización preferente, el complejo de ARN tiene un monómero sustituido con hidroximetilo de la invención incorporado en las posiciones n.º 9-10 del extremo en la posición 5' de la cadena no codificante.

En otra realización, el complejo de ARN de la invención produce una respuesta inmune reducida en comparación con complejos de ARN nativos.

20 En otra realización más, los complejos de ARN de la invención tienen un efecto prolongado en comparación con complejos de ARN nativos.

25 En otra realización más, los complejos de ARN de la invención tienen un aumento del efecto en comparación con complejos de ARN nativos. Por consiguiente, en una realización preferente, el complejo de ARN media el ARNi de forma más eficaz que el complejo de ARN nativo, por ejemplo mediante una degradación más eficaz del ARNm diana o mediante una inhibición de la traducción más eficaz del ARNm diana.

En otra realización más, los complejos de ARN de la invención se administran de forma eficaz a órganos o tejidos específicos de un ser humano o un animal.

30 Aún en otra realización más, los complejos de ARN de la invención son capaces de penetrar la membrana celular de forma eficaz.

Aún en otra realización más, los complejos de ARN de la invención a son capaces de penetrar la membrana celular de forma más eficaz que los complejos de ARN naturales.

35 En una realización, los complejos de ARN de la invención son capaces de unirse a proteína plasmática que a aumentar la retención de los complejos de ARN en el cuerpo humano.

Segundo aspecto, preparación de complejo de ARN

40 Otro aspecto de la invención es un método para preparar un complejo de ARN de dos hebras de la invención que comprende incubar la cadena no codificante con la hebra pasajera en condiciones en las que se forma un complejo de ARN que comprende una región de doble hebra núcleo, siendo capaz dicho complejo de ARN de mediar el ARN de interferencia de un ARN celular correspondiente.

45 En realizaciones alternativas de este aspecto, el complejo de ARN está sustituido con un dúplex de ARN de la invención (décimo aspecto).

Tercer aspecto, método para mediar la modificación del ácido nucleico

50 Además, otro aspecto de la invención es un método para mediar la modificación de ácido nucleico de un ácido nucleico diana en una célula o un organismo que comprende las etapas:

55 a. Poner en contacto una célula u organismo con el complejo de ARN de la invención en condiciones en las que se puede producir la modificación de un ácido nucleico diana.

b. Mediar de ese modo la modificación de un ácido nucleico diana.

60 En realizaciones preferentes, el método para mediar la modificación de ácido nucleico de un ácido nucleico diana se realiza *in vitro*.

En realizaciones preferentes, el método para mediar la modificación de ácido nucleico de un ácido nucleico diana se realiza *in vivo*, es decir en animales, en seres humanos o en animales no humanos.

65 En realizaciones preferentes, el método para mediar la modificación de ácido nucleico de un ácido nucleico diana se realiza en cultivos celulares.

En otra realización más, el método se realiza en una célula aislada.

5 En una realización preferente, la modificación del ácido nucleico del método es ARN de interferencia, preferentemente degradación de ARNm diana o inhibición de la traducción de ARNm diana o inhibición de otros tipos de ARN, por ejemplo ARN no codificante.

En realizaciones alternativas de este aspecto, el complejo de ARN está sustituido con cualquiera de un oligonucleótido de la invención (noveno aspecto) o un dúplex de ARN de la invención (décimo aspecto).

10 **Cuarto aspecto, método para examinar la función genética**

Otro aspecto de la invención es un método para examinar la función de un gen en una célula u organismo que comprende:

- 15 a. Introducir un complejo de ARN de la invención correspondiente dicho gen en la célula u organismo, produciendo de ese modo una célula de ensayo u organismo de ensayo.
b. Mantener la célula de ensayo u organismo de ensayo en condiciones en las que se puede producir la modificación de un ácido nucleico diana.
20 c. Observar el fenotipo de la célula u organismo de ensayo producidos en la etapa b y opcionalmente comparar el fenotipo observado con el fenotipo de una célula de control u organismo de control, proporcionando de ese modo información sobre la función del gen.

25 El complejo de ARN de la invención se puede introducir en células usando por ejemplo transfección, como se resalta en los ejemplos adjuntos.

El fenotipo del organismo o célula se puede observar por ejemplo usando proteómica para evaluar los niveles de proteína o usando micromatrices para evaluar los niveles de ARN. También se puede usar un fenotipo más definido, por ejemplo la expresión de un gen en particular.

30 La información obtenida sobre la función de un gen se puede usar para determinar si un producto genético es una diana adecuada para intervención terapéutica en relación con una enfermedad en particular. Por lo tanto, si se demuestra que un cierto producto genético actúa en una cierta ruta bioquímica conocida por influir en, por ejemplo, un subtipo específico de cáncer, el producto genético podría ser una diana adecuada para intervención terapéutica para el tratamiento del subtipo de cáncer mencionado anteriormente.

35 En una realización preferente del método para examinar la función de un gen en una célula u organismo, las modificaciones del ácido nucleico del método son ARN de interferencia,

40 En realizaciones preferentes del método para examinar la función de un gen en una célula u organismo, el método se realiza en cultivos celulares, *in vitro* o *in vivo*.

En otra realización más, el método se realiza en una célula aislada.

45 En realizaciones alternativas de este aspecto, el complejo de ARN está sustituido con cualquiera de un oligonucleótido de la invención (noveno aspecto) o un dúplex de ARN de la invención (décimo aspecto).

Quinto aspecto, método para evaluar agente

50 Otro aspecto de la invención es un método para evaluar si un agente actúa en un producto genético que comprende las etapas:

- a. Introducir el complejo de ARN de la invención que corresponde dicho gen en una célula u organismo, produciendo de ese modo una célula de ensayo u organismo de ensayo.
55 b. Mantener la célula de ensayo u organismo de ensayo en condiciones en las que se produce la modificación de un ácido nucleico diana.
c. Introducir el agente en la célula de ensayo u organismo de ensayo.
d. Observar el fenotipo de la célula u organismo de ensayo producidos en la etapa c y opcionalmente comparar el fenotipo observado con el fenotipo de una célula de control u organismo de control apropiados, proporcionándoles en un información sobre si el agente actúa en el producto genético.

60 Un control preferente en la etapa d es una célula de ensayo u organismo de ensayo en los que no se ha introducido el complejo de ARN de la etapa a.

65 En una realización preferente del método para evaluar si un agente actúa en un gen o producto genético, modificaciones del ácido nucleico del método son ARN de interferencia, preferentemente degradación de ARN diana o inhibición de la traducción del ARN diana. En otra realización, la modificación de las modificaciones de

ácido nucleico es metilación de ADN.

En realizaciones preferentes del método para evaluar si un agente actúa en un producto genético, el método se realiza en cultivos celulares, *in vitro* o *in vivo*.

5 En otra realización más, el método se realiza en una célula aislada.

En realizaciones alternativas de este aspecto, el complejo de ARN está sustituido con cualquiera de un oligonucleótido de la invención (noveno aspecto) o un dúplex de ARN de la invención (décimo aspecto).

10 **Sexto aspecto, composición farmacéutica**

Además, otro aspecto de la invención es el complejo de ARN y un diluyente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Para la persona experta será evidente que los complejos de ARN de la invención se pueden diseñar para dirigirse a genes y productos genéticos específicos. Se debe observar que los complejos de ARN se dirigirán a una secuencia de ADN o una secuencia de ARN, y no a una proteína. Sin embargo, the el nivel de un producto genético tal como una proteína se puede ver influido indirectamente, si su ARNm o un ARN no codificante se modifica, por ejemplo, mediante degradación de ARN o inhibición de la traducción. Además, la expresión del gen que codifica la proteína se puede ver influido, por ejemplo debido a la metilación del ADN.

20 En realizaciones alternativas de este aspecto, el complejo de ARN está sustituido con cualquiera de un oligonucleótido de la invención (noveno aspecto) o un dúplex de ARN de la invención (décimo aspecto).

25 **Séptimo aspecto, uso de un medicamento**

Por lo tanto, otro aspecto es el complejo de ARN de la invención para uso como un medicamento. Una vez que se ha validado una diana terapéutica, la persona experta puede diseñar complejos de ARN que influyen en el nivel y la actividad de la diana, dado que la especificidad de los complejos de ARN queda exclusivamente dentro de la secuencia de la cadena no codificante. Para complejos de ARN nativos con una hebra pasajera continua, sigue habiendo un problema con los efectos colaterales debido a la hebra pasajera que actúa como una secuencia guía.

30 En realizaciones alternativas de este aspecto, el complejo de ARN está sustituido con cualquiera de un oligonucleótido de la invención (noveno aspecto) o un dúplex de ARN de la invención (décimo aspecto).

35 **Octavo aspecto, monómeros**

La presente solicitud también desvela monómeros adecuados para incorporación de los monómeros sustituidos con hidroximetilo de la invención y métodos para su preparación a partir de materiales de partida fácilmente disponibles. Los derivados de timin-1-ilo de monómeros de hidroximetilo sustituidos de la invención se han incorporado en las hebras de ADN, y algunos procedimientos para la preparación de sus componentes básicos de fosforamidita a la síntesis de ADN/ARN automatizada se han informado [K. D. Nielsen *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* 1995, 3, 1493; H. Thrane *et al.*, *Tetrahedron* 1995, 51, 10389; P. Nielsen *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* 1995, 3, 19].

45 De la manera más frecuente, los complejos de ARN de la invención se prepararán mediante síntesis de oligonucleótido automatizada como losa de una persona experta en la materia. La incorporación de los monómeros sustituidos con hidroximetilo de la invención en los complejos de ARN de la invención sigue métodos convencionales para a) síntesis de ARN en un sintetizador de ARN automatizado, a) tratamiento de ARN, c) purificación de ARN y d) aislamiento de ARN [F. Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues*, IRL Press, Oxford University Press, 1991]. Los oligonucleótidos de ARN sustituidos con hidroximetilo (= hebras de ARN) y complejos de ARN se pueden sintetizar usando derivados de fosforamidita usando las técnicas convencionales a la síntesis de ARN.

50 Por lo general, algunos métodos para la preparación de los derivados de fosforamidita de los monómeros sustituidos con hidroximetilo de la invención comienza a partir de un ribonucleósido, por ejemplo un derivado protegido con O5'-DMT de un ribonucleósido que para las bases adenina, guanina, citosina y 5-metilcitosina contiene base grupos protectores como por ejemplo, benzoilo, isobutirilo, acetilo, fenoxiacetilo, terc-butilfenoxiacetilo u otros grupos protectores básicos convencionales conocidos por una persona experta en la materia.

60 También se desvelan métodos para preparar componentes básicos monoméricos adecuados para la incorporación de los Monómeros D y E que tienen un enlace de carbono-carbono escindido en las posiciones 2',3' (nomenclatura de ribonucleósidos).

65 También se desvelan métodos para preparar componentes básicos monoméricos adecuados para la incorporación de los Monómeros como F-J que tienen un enlace de carbono-carbono escindido en las posiciones 2',3' y que además portan una funcionalidad o grupo por ejemplo en su átomo de carbono en la posición 2' (nomenclatura de

ribonucleósidos) distintos de un grupo hidroxilo.

Por lo general, el método para la preparación de los derivados de fosforamidita del Monómero D comprende, entre las etapas fundamentales, escisión de glicol en las posiciones 2',3', reducción del compuesto intermedio resultante, protección selectiva de O2' y fosforilación de O3'.

Por lo general, la escisión de glicol en las posiciones 2',3' comienza usando escisión oxidativa por ejemplo con Peryodato sódico como reactivo.

Por lo general, con la reducción del compuesto intermedio, después de la escisión con Peryodato sódico, se reduce al correspondiente diol, realizada por ejemplo con borohidruro sódico.

Para la incorporación del Monómero D en los complejos de ARN de la invención es necesario proteger el grupo 2'-hidroxilo (nomenclatura de ribonucleósidos). En una realización preferente de la invención esto se realiza mediante benzoilación. Puede ser beneficioso usar solamente poco más de un equivalente de reactivo de benzoilación (cloruro de benzoilo o por ejemplo anhídrido benzoílico) para optimizar la selectividad de la protección, es decir, la cantidad de benzoilación en O2' con respecto a la benzoilación en O3'. En una realización preferente, la benzoilación se realiza a una temperatura inferior a la temperatura ambiente. En otra realización útil, la benzoilación se realiza a una temperatura inferior a 0 °C o incluso inferior a -50 °C.

Por lo general, la protección de O2' se realiza mediante acetilación o realizando acilación usando un reactivo de acilación conocido por una persona experta en el campo de la síntesis orgánica.

Por lo general, la protección de O2' se realiza mediante siliación usando un reactivo de siliación y método conocido por una persona experta en el campo de la síntesis orgánica. Un grupo protector de siliación preferente es el terc-butildimetilsililo.

La reacción posterior de fosforilación se realiza por lo general usando cualquiera del reactivo denominado "PCI", $[PCI(OCH_2CH_2CN)(N(iPr)_2)]$, o del reactivo denominado "bis-amidita", $[P(OCH_2CH_2CN)(N(iPr)_2)_2]$.

En los métodos para la preparación de los derivados de fosforamidita del Monómero D, el material de partida por lo general es un ribonucleósido, por ejemplo un derivado protegido con O5'-DMT de un ribonucleósido que para las bases adenina, guanina, citosina y 5-metilcitosina contiene grupos protectores básicos tales como por ejemplo, benzoilo, isobutirilo, acetilo, fenoxiacetilo, terc-butilfenoxiacetilo u otros grupos protectores básicos convencionales conocidos por una persona experta en la materia.

Por lo general, la invención proporciona un método para la preparación de un derivado de fosforamidita del Monómero E.

Por lo general, el método para la preparación de los derivados de fosforamidita del Monómero E comprende, entre las etapas fundamentales, escisión de glicol en las posiciones 2',3', reducción del compuesto intermedio resultante, protección selectiva de O3' y fosforilación en la posición O2'. La protección en la posición O3' se puede realizar por ejemplo mediante siliación o acilación, o mediante una combinación tal como primero benzoilación en la posición O2', a continuación siliación en la posición O3', y a continuación desbenzoilación en la posición O2'. Otros grupos protectores también se pueden aplicar como sería evidente para una persona experta en la materia.

Por lo general, el método para preparar componentes básicos monoméricos adecuados para la incorporación de los Monómeros como F-J, que tienen un enlace de carbono-carbono escindido en las posiciones 2',3' y que además portan una funcionalidad en su átomo de carbono en la posición 2' (nomenclatura de ribonucleósidos) distinta de un grupo hidroxilo, comprende entre las etapas fundamentales, comenzar a partir de un ribonucleósido (por ejemplo un ribonucleósido protegido con O5'-DMT), escisión de glicol en las posiciones 2',3', reducción del compuesto intermedio resultante, protección selectiva de O3', conversión del grupo 2'-hidroxilo, desprotección de O3' y fosforilación de O3'. La protección de O3' se puede realizar por ejemplo mediante siliación o acilación, o una combinación de la combinación de ambas tal como primero benzoilación en O2', a continuación siliación en O3', y a continuación desbenzoilación en O2'. También se podrían aplicar otros grupos protectores como sería evidente para un experto en la materia. La conversión del grupo 2'-hidroxilo en otro grupo tal como amino, amino acilado, amino alquilado, amino dialquilado, amino carbamoilado, piperazino, piperazino acilado, piperazino alquilado, piperazino carbamoilado, mercapto, mercapto acilado, mercapto alquilado, disulfuro, hidroxilo acilado, hidroxilo alquilado, hidroxilo carbamoilado, etc., o con derivados sustituidos y/o protegidos de estos grupos, se puede realizar usando métodos y procedimientos conocidos por una persona experta en el campo de la síntesis orgánica. Tales métodos y procedimientos incluyen reacciones de sustitución en un derivado activador del grupo 2'-hidroxilo o reacciones de acilación o carbamoilación. Tales métodos y procedimientos también incluyen reacciones de alquilación en O2' y reacciones de alquilación después de inclusión de otros grupos unidos a C2' tales como amino o mercapto. Además, otra posibilidad es la oxidación del grupo 2'-hidroxilo para dar una funcionalidad aldehído, que se puede modificar adicionalmente por ejemplo mediante reacción con nucleófilos, o para dar una funcionalidad carboxi, que se puede modificar adicionalmente por ejemplo mediante reacción con nucleófilos después de conversión de la

funcionalidad carboxi en un derivado activado tal como un éster activo.

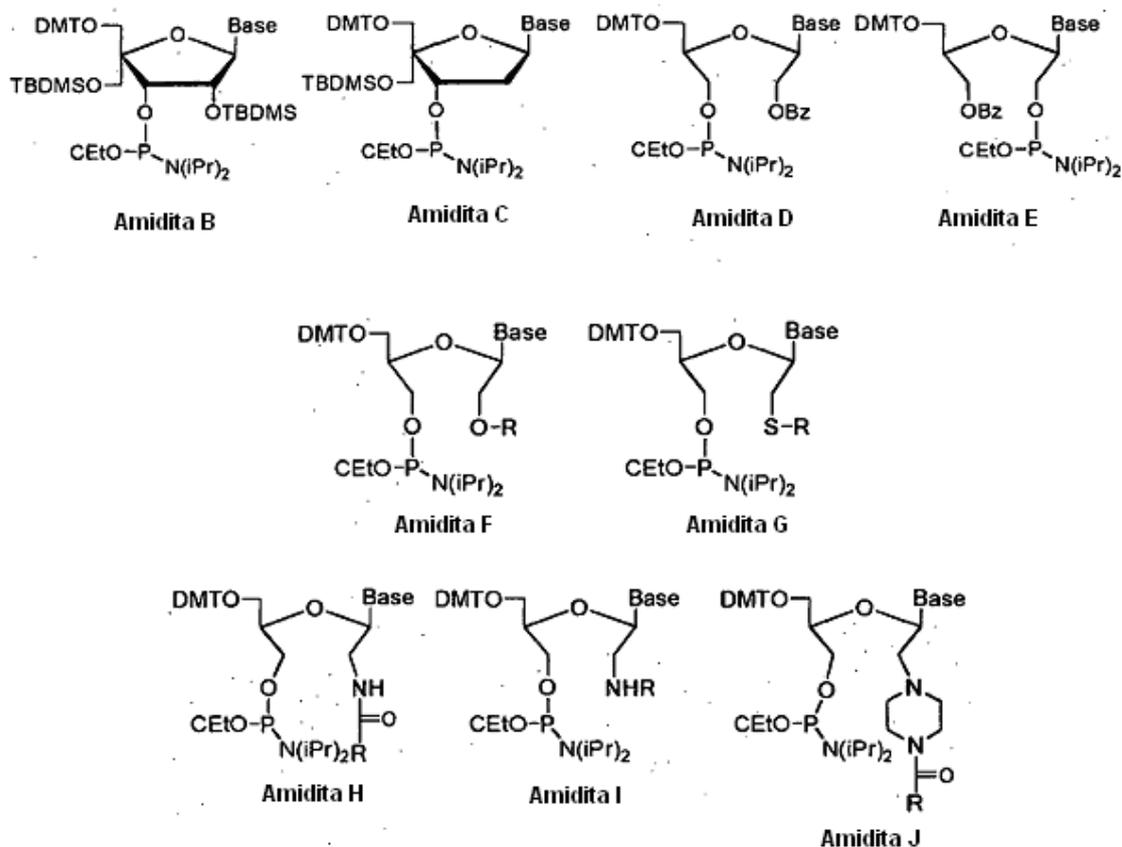
5 Por lo general, el método para preparar componentes básicos monoméricos adecuados para la incorporación de los Monómeros como F-J, pero "invertido" (ya que los Monómeros D y E se pueden considerar "invertidos") de modo que el átomo de O2' está fosforilado y es el grupo 3'-hidroxi el que se convierte en otro grupo de modo que el átomo de C3' está unido a una funcionalidad distinta de un grupo hidroxi, comprende entre las etapas fundamentales, comenzar a partir de un ribonucleósido (por ejemplo un ribonucleósido protegido con O5'-DMT), escisión de glicol en las posiciones 2',3', reducción del compuesto intermedio resultante, protección selectiva de O2', conversión del grupo 3'-hidroxi, desprotección de O2' y fosforilación de O2'. La protección de O2' se puede realizar por ejemplo mediante silylación o acilación, o una combinación de ambas. También se podrían aplicar otros grupos protectores como sería evidente para un experto en la materia. La conversión del grupo 3'-hidroxi en otro grupo tal como amino, amino acilado, amino alquilado, amino dialquilado, amino carbamoilado, piperazino, piperazino acilado, piperazino alquilado, piperazino carbamoilado, mercapto, mercapto acilado, mercapto alquilado, disulfuro, hidroxi acilado, hidroxi alquilado, hidroxi carbamoilado, etc., o con derivados sustituidos y/o protegidos de estos grupos, se puede realizar usando métodos y procedimientos conocidos por una persona experta en el campo de la síntesis orgánica. Tales métodos y procedimientos incluyen reacciones de sustitución en un derivado activado del grupo 3'-hidroxi o reacciones de acilación o carbamoilación. Tales métodos y procedimientos también incluyen reacciones de alquilación en O3' y reacciones de alquilación después de inclusión de otros grupos unidos a C3' tales como amino o mercapto. Además, otra posibilidad es la oxidación del grupo 3'-hidroxi para dar una funcionalidad aldehído, que se puede modificar adicionalmente por ejemplo mediante reacción con nucleófilos, o para dar una funcionalidad carboxi, que se puede modificar adicionalmente por ejemplo mediante reacción con nucleófilos después de conversión de la funcionalidad carboxi en un derivado activado tal como un éster activo.

25 Por lo general, un derivado de 2'-C-piperazino se prepara por conversión del grupo 2'-hidroxi en un grupo saliente (por ejemplo, derivado de mesilato) seguido de reacción con un gran exceso de piperazina. Por ejemplo, esto se puede realizar como una etapa hacia la síntesis de una fosforamidita de estructura de Amidita J (véase la figura que sigue a continuación).

30 También se desvelan métodos para preparar componentes básicos monoméricos adecuados para la incorporación de los monómeros sustituidos con hidroximetilo de la invención que portan grupos o funcionalidad es en el átomos de C1' (nomenclatura de ribonucleósidos) que son diferentes a una nucleobase natural. Tales grupos o funcionalidades, que pueden contener grupos protectores, incluyen por ejemplo pireno, perileno, fluoróforos, hidrógeno, alquilo, grupos reactivos heterocíclicos distintos de las nucleobases naturales.

35 También se desvelan métodos para preparar componentes básicos monoméricos adecuados para la incorporación de los monómeros sustituidos con hidroximetilo de la invención que se constituyen como derivados de H-fosfonato en lugar de derivados de fosforamidita.

40 A continuación se muestran ejemplos de estructuras de algunos componentes básicos (DMT = 4,4'-dimetoxitritilo; Base = nucleobase natural; CEtO = cianoetoxi) de fosforamidita (= amidita):



R = alquilo, derivados de colesterol, fluoróforos, poliaminas, ácidos grasos, aminoácidos, sacáridos o polipéptidos, etc.

Noveno aspecto, oligonucleótido que comprende oligonucleótidos acíclicos

- 5 También se desvela un oligonucleótido que comprende un monómero de nucleótido acíclico como se desvela en el presente documento. Como será evidente a partir de la descripción y la sección de ejemplos, tal oligonucleótido tiene diversos usos y ventajas. De forma sorprendente se ha encontrado que algunos oligonucleótidos que comprenden monómeros de nucleótido acíclico como se describe en el presente documento son enzimas celulares sustrato de la maquinaria de ARNi y, en algunos casos, estos oligonucleótido son incluso mejores sustratos que un
- 10 oligonucleótido idéntico sin monómeros de nucleótido acíclico.

Preferentemente, el monómero de nucleótido acíclico se selecciona entre el grupo que consiste en monómero E, F, G, H, I o J (véase la figura 1). Como será evidente para la persona experta, G, F, H, I y J todos se pueden preparar a partir de precursores sintéticos del monómero D. Como se indica en la figura 2, los monómeros acíclicos se

15 pueden transformar en derivados que portan grupos de conjugación tales como derivados de colesterol, alquilo, fluoróforos, poliaminas, aminoácidos, sacáridos, polipéptidos, etc. Tales grupos de conjugación pueden ser útiles por ejemplo para mejor bioestabilidad y/o biodistribución cuando el oligonucleótido se usa para modular la actividad de los ARNm diana en células, órganos u organismos.

20 La longitud del oligonucleótido es preferentemente de 10 a 40 monómeros de nucleótido. Incluso más preferente es una longitud de 18 a 30 monómeros de nucleótido.

Por lo general, el oligonucleótido comprende menos de 5 monómeros de nucleótido acíclico. En otra realización preferente, el oligonucleótido comprende no más de 1 monómero de nucleótido acíclico por 5 monómeros de nucleótido distintos de monómeros de nucleótido acíclicos. Es incluso más preferente no más de 1 monómero acíclico por 8 monómeros de nucleótido distintos de monómeros de nucleótido acíclicos. Si el número de monómero de nucleótido acíclico tiende a aumentar, la afinidad de unión del oligonucleótido de la invención con respecto a un ácido nucleico complementario se ve comprometida.

25

30 Por lo general, el oligonucleótido comprende de 1 a 5 monómeros de nucleótido acíclico.

5 Por lo general, algunos monómeros de nucleótido acíclico están solamente presentes en una o más de las posiciones 1-8 y más preferentemente en las posiciones 2-7 del oligonucleótido. Las posiciones se cuentan desde el extremo en la posición 5' del oligonucleótido. Los monómeros de nucleótido acíclicos en estas regiones reducirán o evitarán que el oligonucleótido actúe como un microARN, ya que estas posiciones corresponden a la denominada región semilla de un microARN. Esto es relevante por ejemplo cuando se pretende que el oligonucleótido funcione como la hebra guía de un ARNip.

10 Por lo general, todos los monómeros de nucleótido modificado con hidroximetilo en la cadena no codificante están presentes en las posiciones 9-16, en los que las posiciones se encuentran desde el extremo en la posición 5'. Incluso más preferentemente, los monómeros de nucleótido modificado con hidroximetilo en la cadena no codificante están presentes en la posición 9-11. Por lo tanto, la presencia de monómeros de nucleótido modificado con hidroximetilo en las regiones mencionadas anteriormente provocará que la cadena no codificante actúe como un microARN, es decir, asegurará que el efecto del ARNip sea mínimo y el efecto del microARN mucho más elevado. Probablemente este efecto surge de la tendencia disminución de la tendencia hacia la unión de longitud completa debido a la reducción de la afinidad causada por la presencia de un monómero sustituido con hidroximetilo acíclico, por ejemplo el monómero D.

20 Por lo general, el oligonucleótido no comprende secuencias de ADN de más de 8 monómeros de ADN consecutivos. Una disposición más habitual es no más de 6 monómeros de ADN consecutivos o no más de 4 monómeros de ADN consecutivos. Por lo general, los monómeros de ADN consecutivos permitirán que el oligonucleótido active la RNasa H cuando se una a un ARN complementario, que conduce a degradación del ARN. En algunas circunstancias, esto no es deseable. Por lo tanto, también se desvela una realización adicional, en la que el oligonucleótido no contiene ningún monómero de ADN en absoluto.

25 En otras circunstancias, la activación de la RNasa H es deseable y es preferente que el oligonucleótido comprenda más de 4 monómeros de ADN consecutivos, más preferentemente más de 6 monómeros de ADN y lo más preferentemente más de 8 monómeros de ADN.

30 Por lo general, el oligonucleótido comprende más de un 50 % de monómeros de ARN. Un grado elevado de monómeros de ARN facilitará la interacción con proteínas que interactúan con ARN, por ejemplo mediante el funcionamiento como un sustrato o guía (o cofactor) para una enzima celular tal como RISC.

35 Por lo tanto, también se desvela una realización, en la que más de un 80 % de los monómeros del oligonucleótido son monómeros de ARN. En otra realización más, es preferente que más de un 90 % de los monómeros del oligonucleótido sea monómeros de ARN.

40 Como será evidente, el oligonucleótido también puede comprender análogos de monómero de nucleótido. También se desvela una realización similar, en la que monómeros de nucleótido acíclico y monómeros de ARN constituyen más de un 80 % de todos los monómeros de nucleótido. En otra realización, monómeros acíclicos y monómeros de ARN constituyen más de un 90 % de todos los monómeros de nucleótido.

45 Cuando el oligonucleótido comprende análogos de monómero de nucleótido, es preferente que se seleccionen entre el grupo que consiste en monómeros de 2'-O-alkil-ARN, monómeros de 2'-amino-ADN, monómeros de 2'-fluoro-ADN, monómeros de LNA, monómeros de PNA, monómeros de HNA, monómeros de ANA, FANA monómeros, CeNA monómeros, ENA monómeros, monómeros de ADN y monómeros de INA. Algunos análogos de nucleótido se usa normalmente para modular la afinidad de unión, aumentar la bioestabilidad y en general dar al oligonucleótido más propiedades similares a las de los fármacos.

50 Por lo general, el oligonucleótido comprende al menos 2 análogos de nucleótido de LNA. Los monómeros de nucleótido acíclicos por lo general disminuye la temperatura de fusión (es decir, afinidad de unión) del oligonucleótido de la invención con base emparejada con un ácido nucleico complementario y los monómeros de nucleótido de LNA se pueden usar para contrarrestar esta disminución de la temperatura de fusión. Es decir, en una realización, el número de monómeros de nucleótido acíclico es idéntico al número de LNA monómeros de nucleótido.

55 Por lo general, el oligonucleótido comprende solamente monómeros acíclicos y monómeros de ARN.

60 Por lo general, el oligonucleótido comprende solamente monómeros de nucleótido acíclico, monómeros de ARN, y análogos de nucleótido de LNA.

65 En una realización preferente, el oligonucleótido desvelado en el presente documento comprende uno o más enlace(s) seleccionados de entre el grupo que consiste en enlace de fosforotioato, enlace de boranofosfato, enlace de etilfosfonato, enlace de fosforamidato y enlace de fosfortriésteres. Los más preferentes son un enlace de fosforotioato y/o un enlace de boranofosfato. Estos enlaces aumentan la bioestabilidad del oligonucleótido iraníes se ha mostrado que tienen un efecto positivo en la biodistribución del oligonucleótido. En una realización preferente, el oligonucleótido comprende más de un 50 % de los enlaces internucleótido mencionados anteriormente e incluso

más preferentemente más de un 75 %. En una realización, todos los enlaces internucleótido son de los tipos mencionados anteriormente.

5 También se desvela una disposición mediante la que el oligonucleótido de la invención no tiene bases emparejadas con un oligonucleótido complementario, es decir, el oligonucleótido de la invención tiene una sola hebra.

10 Por lo general, el oligonucleótido es capaz de mediar la represión de la traducción dependiente de RISC o degradación de los ARNm diana complementarios con el oligonucleótido. La persona experta reconocerá a RISC como el Complejo de Silenciamiento Inducido de ARN y entenderá que en esta realización, el oligonucleótido actuara como una secuencia guía para RISC y por lo tanto RISC guía para oligonucleótidos de ARN, por lo general los ARNm y albergan complementariedad parcial o total con el oligonucleótido de la invención. Cuando el oligonucleótido guía RISC a dianas de ARNm de complementariedad parcial, el oligonucleótido se puede observar como un imitador de microARN y cuando el oligonucleótido guía RISC a dianas de ARNm de complementariedad total; se puede observar como un ARNip de una o dos hebras.

15 La dependencia de RISC se puede evaluar en líneas celulares mediante desactivación génica de los componentes de RISC usando ARNip frente a los ARNm que codifican los componentes de RISC y evaluar la actividad del oligonucleótido en la línea celular con desactivación génica. Los expertos en la materia conocen bien tales experimentos.

20 **Décimo aspecto, dúplex de ARN que comprende oligonucleótido de la invención**

25 Un décimo aspecto de la invención es un dúplex de ARN que comprende un primer oligonucleótido como se define en el presente documento (por ejemplo, en el noveno aspecto discutido anteriormente) y un segundo oligonucleótido.

En una realización preferente, el segundo oligonucleótido del dúplex de ARN también es un oligonucleótido como se define en el presente documento (por ejemplo, un oligonucleótido del noveno aspecto discutido anteriormente).

30 Como será evidente, muchas de las características descritas con relación a los complejos de ARN de la invención en el primer aspecto, también se pueden aplicar a los dúplex de ARN del décimo aspecto.

35 Preferentemente, el dúplex de ARN de la invención comprende un número de pares de bases de entre 15 a 40 y en una realización preferente, comprende un número de pares de bases seleccionado de entre el grupo de 18 pares de bases, 19 pares de bases, 20 pares de bases, 21 pares de bases, 22 pares de bases y 23 pares de bases.

40 En otra realización más, el dúplex de ARN comprende un número de pares de bases de entre 25 a 30, más preferentemente de 26 a 28 y lo más preferentemente 27 pares de bases. Tales dúplex de ARN se pueden denominar ARN de sustrato dicer.

En una realización preferente, el dúplex de ARN de la invención comprende un saliente.

En otra realización, el dúplex de ARN comprende dos salientes.

45 Además, en otra realización, el primer oligonucleótido comprende un saliente en la posición 3'.

Además, en otra realización, el segundo oligonucleótido comprende un saliente en la posición 3'.

50 Preferentemente, la longitud del saliente es de 1 a 8 nucleótidos e incluso más preferentemente, la longitud del saliente se selecciona entre el grupo que consiste en salientes con una longitud de 1 nucleótido, 2 nucleótidos y 3 nucleótidos.

En otra realización, el dúplex de ARN comprende al menos un extremo romo.

55 En otra realización, el dúplex de ARN tiene los extremos romos en ambos extremos.

60 En una realización preferente, el dúplex de ARN comprende una región de doble hebra de 18-22 pares de bases, en la que cada uno del primer oligonucleótido y el segundo oligonucleótido comprende un saliente en la posición 3' de 1-3 nucleótidos. Tal dúplex de ARN se reconocerá como un ARNip canónico (ARN de interferencia corto).

En una realización, una hebra del dúplex de ARN es discontinua como se describe con detalle en el primer aspecto.

65 En una realización, el dúplex de ARN es capaz de mediar la represión de la traducción o degradación del ARNm diana complementario con el primer o el segundo oligonucleótido del dúplex de ARN. Es decir, el dúplex de ARN funcionará como por ejemplo un ARNip, microARN o pre-microARN.

5 En una realización, el dúplex de ARN es capaz de mediar la represión de la traducción o la degradación del ARNm diana a la vez que induce la reducción de los efectos colaterales en comparación con un dúplex de ARN idéntico con monómeros de ARN en lugar de monómeros acíclicos. La reducción de los efectos colaterales se puede conseguir debido a la disminución de la afinidad de unión y también debido a que cualquiera del primer o el segundo oligonucleótidos se pueden modificar de modo que no son capaces de funcionar como una hebra guía para RISC. Es decir, se puede controlar que el oligonucleótido del dúplex de ARN funcione como hebra pasajera (la cadena codificante) y que funcionará como hebra guía (cadena no codificante).

10 En otra realización, el dúplex de ARN es capaz de mediar la represión de la traducción o la degradación del ARNm diana a la vez que induce la reducción de los efectos colaterales cuando de forma específica un monómero acíclico está colocado en la posición 5-10 en la hebra guía (no codificante) de un dúplex de ARNip, en el que la posición se cuenta desde el extremo en la posición 5' del oligonucleótido.

15 En otra realización, el dúplex de ARN es capaz de mediar la represión de la traducción o la degradación del ARNm diana a la vez que induce la reducción de los efectos colaterales cuando de forma específica un monómero acíclico está colocado en la posición 6-8 en la hebra guía (no codificante) de un dúplex de ARNip. Sin pretender quedar ligado por la teoría, se cree que la reducción de la afinidad de unión inducida por la presencia del monómero acíclico en estas posiciones que conduce a la reducción de la capacidad de la hebra guía para inducir efectos de tipo microARN. Es decir, el monómero acíclico, cuando se coloca de forma correcta, reduce la denominada unión a la región semilla, que se supone que es más importante para la actividad del microARN que para la actividad del ARNip.

25 En una realización, el dúplex de ARN es capaz de mediar el direccionamiento del ARN, por ejemplo silenciamiento genético o ARN de interferencia, con aumento de la potencia en comparación con un dúplex de ARN idéntico con monómeros de ARN en lugar de monómeros acíclicos. El aumento de la potencia se puede conseguir debido a un aumento de la velocidad de disociación de los productos de escisión de la reacción de RISC. La velocidad de disociación puede aumentar debido a la disminución de la afinidad de unión. El aumento de la flexibilidad del sustrato también puede aumentar la tasa de hidrólisis. Además, el aumento de la flexibilidad de facilitar el desenrollamiento del dúplex de ARN antes de la carga de la hebra guía en RISC.

30 En una realización, el dúplex de ARN es capaz de mediar la represión de la traducción o la degradación del ARNm diana con potencia prolongada en comparación con un dúplex de ARN idéntico con monómeros de ARN en lugar de monómeros acíclicos. La potencia prolongada se puede conseguir, por ejemplo, debido a que los oligonucleótidos del dúplex de ARN y el dúplex *per se* son un sustrato de peor calidad para exo- y endonucleasas y por lo tanto la estabilidad de los oligonucleótidos y del dúplex aumenta.

35 En una realización, el dúplex de ARN es capaz de mediar la represión de la traducción o la degradación del ARNm diana en la que el dúplex de ARN tiene un aumento de la bioestabilidad en comparación con un dúplex de ARN idéntico con monómeros de ARN en lugar de monómeros acíclicos.

40 En otra realización más, el dúplex de ARN es capaz de mediar la represión de la traducción o la degradación del ARNm diana en la que el dúplex de ARN presenta una reducción de la estimulación inmune en comparación con un dúplex de ARN idéntico con monómeros de ARN en lugar de monómeros acíclicos. Una razón para la estimulación inmune es la interacción con receptores de tipo Toll que reconocen oligonucleótidos extraños. Dado que los dúplex de ARN de la invención no son naturales, serán más difíciles de detectar con los receptores de tipo Toll.

Referencias

50 Documento US2003/0108923

Documento US2005/0234007

Documento WO2005/073378

55 J. Kurreck, Eur. J. Biochem. 2003, 270, 1628

K. D. Nielsen *et al.*, Bioorg. Med. Chem. 1995, 3, 1493

60 H. Thrane *et al.*, Tetrahedron 1995, 51, 10389

P. Nielsen *et al.*, Bioorg. Med. Chem. 1995, 3, 19

Nawrot y Sipa, Curr. Topics Med. Chem. 2006, 6, 913-925

65 F. Eckstein, Oligonucleotides and Analogues, IRL Press, Oxford University Press, 1991

M. Petersen y J. Wengel, Trends Biotechnol. 2003, 21, 74-81

Pfundheller, Sørensen, Lomholt, Johansen, Koch y Wengel, J. "Locked Nucleic Acid Synthesis", Methods Mol. Biol. 2004, vol. 288 (Oligonucleotide Synthesis), 127-145., P. Herdewijn, Ed., Humana Press Inc.

5

Furniss, Hannaford, Smith y Tatchell, Vogel's Textbook of Organic Chemistry, 1989, John Wiley & Sons

Bryld, Højland y Wengel, Chem. Commun. 2004, 1064

10

Mokhir, Tetzlaff, Herzberger, Mosbacher y Richart, J. Comb. Chem. 2001, 3, 374

Mangos MM, Min KL, Viazovkina E, Galarneau A, Elzagheid MI, Parniak MA, Damha MJ., J Am Chem Soc. 2003 Jan 22; 125 (3): 654-61.

15 Procedimientos experimentales y Ejemplos

Ejemplo 1. Síntesis de los complejos de ARN de la invención.

Se ha informado de procedimientos para la preparación de los componentes básicos de fosforamidita para síntesis de ADN/ARN automatizada de los monómeros sustituidos con hidroximetilo de los complejos de ARN de la invención [derivados de timina; K. D. Nielsen *et al.*, Bioorg. Med. Chem. 1995, 3, 1493; H. Thrane *et al.*, Tetrahedron 1995, 51, 10389; P. Nielsen *et al.*, Bioorg. Med. Chem. 1995, 3, 19]. Por favor, véase el Ejemplo 11 para divulgación de procedimientos para preparación de derivados de fosforamidita a modo de ejemplo de adenina, guanina, citosina y uracilo.

25

La incorporación de estos monómeros sustituidos con hidroximetilo en los complejos de ARN de la invención sigue procedimientos convencionales para a) síntesis de ARNm en un sintetizador de ARN automatizado, a) tratamiento de ARN, c) purificación de ARN y d) aislamiento de ARN [F. Eckstein, Oligonucleotides and Analogues, IRL Press, Oxford University Press, 1991]. Esto demuestra que los oligonucleótidos de ARN sustituidos con hidroximetilo (= hebras de ARN) y complejos de ARN se pueden sintetizar usando derivados de fosforamidita conocidos usando las técnicas convencionales para síntesis de ARN.

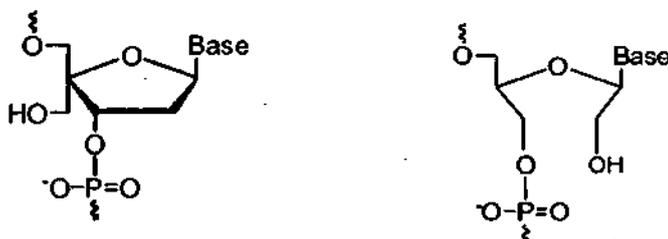
30

El LNA es un oligonucleótido que contiene uno o más ribonucleótidos unidos a 2'-O,4'-C-metileno (nucleótidos de LNA) [M. Petersen y J. Wengel, Trends Biotechnol. 2003, 21, 74-81]. El ARNip modificado con LNA es una construcción de ARNip que contiene uno o más monómeros de LNA. Se han usado algunos métodos conocidos para incorporar nucleótidos de LNA en los complejos de ARN de la invención mediante el uso de las fosforamiditas de LNA disponibles en el mercado [Pfundheller, Sørensen, Lomholt, Johansen, Koch y Wengel, J. "Locked Nucleic Acid Synthesis", Methods Mol. Biol. 2004, vol. 288 (Oligonucleotide Synthesis), 127-145., P. Herdewijn, Ed., Humana Press Inc.]

35

El ARNip sustituido con hidroximetilo ("ARN de interferencia pequeño sustituido con hidroximetilo) es una construcción de ARNip que contiene uno o más monómeros de nucleótido sustituido con hidroximetilo (véase la Figura 1 para estructuras del monómero de nucleótido sustituido con hidroximetilo). Los monómeros usados a modo de ejemplo se muestran a continuación:

40



45

Monómero C (C, I) Monómero D (X)

Oligonucleótidos - Cadenas no codificantes seleccionadas en construcciones de ARNip:

ARN nativo	5'-ACU UGU GGC CGU UUA CGU CGC U
JW1103	5'-ACU UGU GGC CGU UUA CGU <u>CG^LC^{MeL}</u> U
JW1186	5'-ACU UG <u>I</u> GGC CGU UUA CGU <u>CG^LC^{MeL}</u> U

Oligonucleótidos - Cadenas no codificantes seleccionadas en construcciones de ARNip:

JW1187	5'-ACT <u>I</u> UG <u>I</u> GGC CGU UTA CGT <u>CG^LC^{MeL}</u> U
W123	5'-ACU UG <u>X</u> GGC CGU UUA CGU <u>CG^LC^{MeL}</u> U
W124	5'-AC <u>X</u> UGU GGC CGU UUA CGU <u>CG^LC^{MeL}</u> U
W125	5'-ACU UGU GGC CGU UUA CG <u>X</u> <u>CG^LC^{MeL}</u> U
W126	5'-ACU UGU GGC CG <u>X</u> UUA CGU <u>CG^LC^{MeL}</u> U
W127	5'-ACU UGU GGC CGU UUA CGT CG <u>X</u> U
W128	5'-AC <u>X</u> UGU GGC CGU UUA CGT CG <u>X</u> U

Oligonucleótidos - Cadenas codificantes seleccionadas en construcciones de ARNip:

ARN nativo	5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG UUC U
JW1104	5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG UT ^L <u>C^{MeL}</u> U
JW1106	5'-GAC ^{MeL} GUA AAC ^{MeL} GGC CAC ^{MeL} AAG UT ^L <u>C^{MeL}</u> U
JW1188	5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG <u>TTC</u>
W043	5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG <u>UTC</u> U
W044	5'-GAC <u>GTA</u> AAC <u>CAC</u> AAG <u>UTC</u> U
JW1189	5'-GAC <u>GTA</u> AAC GGC CAC AAG <u>TTC</u>
W129	5'-GAC G <u>X</u> A AAC GGC CAC AAG UT ^L <u>C^{MeL}</u> U
W130	5'-GAC G <u>X</u> A AAC <u>X</u> GGC CAC AAG UT ^L <u>C^{MeL}</u> U
W131	5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG UU <u>X</u> U
W132	5'-GAC G <u>X</u> A AAC GGC CAC AAG UU <u>X</u> U

5 Se han sintetizado otras hebras de ARN sustituido con hidroximetilo:

5'-ACU UGU GGC CGU UUA CGU CGC U
 5'-GAC GTA AAC G
 5'-GC CAC AAG UTC U

- 10
- "L" en superíndice indica que el resto es un nucleótido de LNA.
 - "MeL" en superíndice indica que el residuo es un nucleótido de LNA con una base de 5-metilcitosina.
 - **I** en letra negrita subrayada es un monómero de nucleótido sustituido con hidroximetilo. En este ejemplo es el derivado de timin-1-ilo del Monómero C de C4'-ARN-ramificado (véase la Figura 1).
 - 15 - **C** en letra negrita subrayada es un monómero de nucleótido sustituido con hidroximetilo. En este ejemplo es el derivado de 5-metilcitosin-1-ilo del Monómero C de C4'-ARN-ramificado (véase la Figura 1).
 - **X** en letra negrita subrayada es un monómero de nucleótido acíclico sustituido con hidroximetilo. En las secuencias mencionadas anteriormente es el derivados de uracil-1-ilo del Monómero D de 2',3'-seco-ARN (véase la Figura 1). En otros ejemplos y figuras están incluidas otras variantes de base distintas de uracilo.

20 Para secuencias adicionales estudiadas véanse los Ejemplos 9 y 10.

25 Se han realizado estudios celulares (línea celular de cáncer de pulmón que expresa EGFP). Como ejemplos para ilustrar la invención se usa usan dúplex de ARNip que contienen dos o tres salientes de nucleótido. Este diseño de ejemplo es solamente una ilustración y otras muchas construcciones están incluidas en la invención y funcionan del mismo modo. Por lo tanto están incluidos, por ejemplo, dúplex de ARNip con extremo romo, dúplex de ARNip más cortos o más largos que los usados a modo de ejemplo, y cadenas no codificantes de una sola hebra. De forma análoga están incluidos complejos de ARN que comprenden una cadena no codificante y una hebra pasajera discontinua (la "hebra pasajera" también se puede denominar "cadena codificante").

30 **Ejemplo 2. Procedimiento de hibridación y transfección para complejos de ARNip de la invención.**

De las células se sembraron en placas de 6 pocillos y se cultivaron en una confluencia de un 40-60 %. Inmediatamente antes de la transfección, las células se volvieron a sembrar en 1 ml de medio de crecimiento

completo por pocillo. Las cadenas codificante y no codificante se mezclaron en tampón de hibridación (Tris-HCl 10 mM, pH 7,3, NaCl 50 mM) a concentración 20 µM de cada una y se incubaron a 95 °C durante 1 min y a 1 h a 37 °C. Por pocillo en una placa de 6 pocillos, se preparó la siguiente solución: 4 µl de TransIT-TKO en 150 µl de medio de RPMI sin suero. El complejo de ARNip hibridado se añadió, se mezcló con cuidado, se incubó durante 20 min a TA, y se vertió sobre las células. La concentración final del complejo de ARN era 50 nM. Después de 24 h de incubación a 37 °C, el medio se cambió y las células se incubaron durante otro periodo de 24 h a 37 °C. Las células se retiraron mediante tripsinación y se separaron en mitades para análisis de ARN y de flujo posterior.

A medida que se consigue el silenciamiento genético (véase a continuación), se demuestra que los complejos de ARN de la invención que contienen monómeros sustituidos con hidroximetilo pueden penetrar una membrana celular en condiciones convencionales de transfección.

Ejemplo 3. Silenciamiento genético

Procedimiento para cuantificación de ARNm y proteína. La expresión de la proteína eGFP se analizó mediante análisis de citometría de flujo. La transferencia de Western se realizó como sigue a continuación: las células se lavaron dos veces en PBS y una cantidad igual de células se lisó en tampón de muestra 2 x SDS [Dodecil-Sulfato Sódico al 4 % (SDS), glicerol al 20 %, Tris/HCl 125 mM a pH 6,8, 0,01 mg/ml de Azul de Bromofenol, 2-mercaptoetanol al 10 %] a 90 °C durante 2 x 10 min separado mediante pipeteo suave. Las proteínas se separaron en un gel de SDS al 8 %-acrilamida, y se hizo una electro-transferencia durante una noche en una membrana de PVDF (Immobilon). El filtro se bloqueó durante 1 h con PBS que contenía leche al 10 % en p/v. La proteína EGFP se detectó usando una dilución a 1:1000 de un anticuerpo EGFP policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology). El anticuerpo hnRNP C1 de ratón fue un obsequio de Seraphin Pinol-Roma. Un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (hrp) (DAKO) se usó con el reactivo de ECL (Amersham Biosciences) para visualización. El ARNm de eGFP se analizó mediante transferencia de Northern de acuerdo con procedimientos convencionales.

El siguiente es un listado con resultados de experimentos de silenciamiento genéticos realizados a una concentración de complejo de ARNip de 50 mM. Los resultados se proporcionan en porcentajes relativos al nivel de expresión genética obtenida con un control dúplex de ARNip de control con falta de coincidencias (establecido en un 100 %):

Entrada	Codificante / No codificante	GFP Medio	ARNm de EGFP
1	ARN / ARN	13 %	16 %
2	JW1104 / JW1103	13 %	28 %
3	JW1188 / JW1103	7 %	13 %
4	JW1189 / JW1103	6 %	15 %
5	W043 / JW1103		~13 %
6	W044 / JW1103		~19 %
7	JW1104 / JW1186	22 %	31 %
8	JW1104 / JW1187	62 %	90 %
9	W131 / W127	27 %	
10	W132 / W128	86 %	
11	W131 / W128	68 %	
12	W132 / W127	47 %	
13	W129 / JW1103	36 %	
14	W130 / JW1103	39 %	
15	JW1106 / W123	24 %	
16	JW1106 / W127	51 %	
17	JW1106 / W125	34 %	
18	JW1106 / W126	22 %	

La entrada 1 muestra que el complejo de ARNip sin modificar está silenciando de forma eficaz del gen GFP.

La entrada 2 muestra que un complejo de ARNip modificado con LNA está silenciando de forma eficaz del gen GFP.

Esta construcción tiene dos modificaciones de LNA hacia los extremos en la posición 3' de las dos hebras de ARN.

En los experimentos de silenciamiento genético a modo de ejemplo de las entradas 3-8 se estudia un complejo de ARNip que contiene monómeros sustituidos con hidroximetilo de C4'-ARN-ramificado de estructuras T/C (Figura 3).

5 La entrada 3 muestra que un complejo de ARNip de la invención que tiene un monómero sustituido con hidroximetilo en las posiciones 2 y 3 desde el extremo en la posición 3' de la cadena codificante es altamente funcional en el silenciamiento del gen GFP.

10 En el ejemplo de la entrada 3 y en los ejemplos de las entradas 4, 5, 6, 13 y 14 se encuentra la cadena no codificante como un ejemplo de una hebra de ARNm modificado con LNA, pero también sería funcional una cadena no codificante de ARNip modificar o una cadena no codificante de ARN modificado total o parcialmente. Los resultados obtenidos muestran que algunos monómeros modificados de forma alternativa similares a los monómeros de LNA son totalmente compatibles con los monómeros sustituidos con hidroximetilo de la invención.

15 La entrada 4 confirma que un complejo de ARNip de la invención que tiene monómeros T/C sustituidos con hidroximetilo en la cadena codificante es altamente eficaz en la mediación del silenciamiento genético.

20 Las entradas 5 y 6 confirman que un complejo de ARNip de la invención que tiene monómeros T/C incluidos con hidroximetilo en la cadena codificante es altamente eficaz en la mediación del silenciamiento genético.

25 Los resultados muestran que con complejos de ARNip de la invención que tienen monómeros sustituidos con hidroximetilo incorporados en la cadena codificante se consigue un silenciamiento genético muy eficaz. Los datos muestran el hallazgo sorprendente de que en general se consigue un silenciamiento genético incluso mejorado con estos complejos de ARN de la invención cuando se compara con el silenciamiento genético conseguido con ARNip sin modificar o ARNip modificado con LNA. Además con el silenciamiento es eficaz incluso con un complejo de ARN comprende una hebra de ARN codificante con varios monómeros sustituidos con hidroximetilo en la región núcleo que forma dúplex central (entrada, W044 como un ejemplo).

30 Las entradas 7 y 8 revelan que un complejo de ARNip de la invención que tiene monómeros T/C sustituidos con hidroximetilo en la cadena no codificante del complejo es capaz de mediar el silenciamiento genético. Parece que cuanto mayor es el número de monómeros T/C sustituidos con hidroximetilo se incorporan en la cadena no codificante menor es la actividad de silenciamiento genético.

35 Una cadena codificante modificada con LNA se usa como un ejemplo en los ejemplos de las entradas 7, 8, 15, 16, 17 y 18, pero también sería funcional una cadena codificante de ARN no modificada o una cadena codificante de ARN modificada total o parcialmente. Los resultados obtenidos muestran que algunos monómeros modificados de forma alternativa similares a los monómeros de LNA son totalmente compatibles con los monómeros sustituidos con hidroximetilo de la invención.

40 En los experimentos de silenciamiento genético a modo de ejemplo de las entradas 9-18 se estudia un complejo de ARNip de la invención que contiene monómero sustituido con hidroximetilo de 2',3'-seco-ARN de estructura X como se ha mostrado anteriormente en la Figura 3.

45 La entrada 9 demuestra que un complejo de ARNip de la invención que tiene un monómero X sustituido con hidroximetilo en cada una de las dos hebras de ARN (hacia el extremo en la posición 3' de las dos hebras) media un silenciamiento genético muy eficaz hasta un nivel comparable al del ARNip sin modificar. Esta sorprendente teniendo en cuenta la naturaleza no cíclica de la unidad de ribosa del monómero X sustituido con hidroximetilo.

50 Con un monómero X adicional en cada una de las dos hebras del complejo de ARN, la eficacia del silenciamiento genético no es eficaz (entrada 10).

55 La entrada 11 revela junto con la entrada 10 que la incorporación de un monómero X sustituido con hidroximetilo cerca del extremo en la posición 5' de la cadena no codificante reduce la eficacia del silenciamiento genético de un complejo de ARNip.

60 La entrada 12 revela que la incorporación de un monómero X sustituido con hidroximetilo cerca del extremo en la posición 5' de la cadena codificante reduce la eficacia del silenciamiento genético de un complejo de ARNip cuando otro monómero X se incorpora en el extremo en la posición 3' de la cadena codificante.

65 Las entradas 13 y 14 confirman que la incorporación de un monómero X sustituido con hidroximetilo cerca del extremo en la posición 5' de la cadena codificante reduce la eficacia del silenciamiento genético de un complejo de ARNip. Los resultados indican que la incorporación de un monómero X sustituido con hidroximetilo en la parte central de una cadena codificante de una construcción de ARNip ni mejora y reduce la actividad de silenciamiento genético.

Las entradas 15-18 presentan resultados de experimentos de silenciamiento genético con complejos de ARNip de la invención que comprenden una cadena codificante de ARN modificada con LNA y cadenas no codificantes que tienen un monómero X sustituido con hidroximetilo.

5 Los resultados muestran que los complejos de ARNip de la invención que contienen monómeros X ruidos con hidroximetilo en la región central de la cadena no codificante, por ejemplo W126 y W123, median un silenciamiento genético muy eficaz. Es sorprendente que W127, que junto con W131 media un silenciamiento genético muy eficaz, solamente induce un silenciamiento genético moderado con la cadena codificante de ADN JW1106 modificado con LNA. Esto destaca el aspecto sorprendente de la observación (entrada 9) de que un complejo de ARNip de la
10 invención que tiene un monómero X sustituido con hidroximetilo en cada una de las dos hebras de ARN (hacia los extremos en la posición 3' de las dos hebras) media un silenciamiento genético muy eficaz hasta un nivel comparable con el del ARNip sin modificar.

15 Se pueden obtener resultados similares a los descritos anteriormente con los complejos de ARN de la invención que contienen monómeros sustituidos con hidroximetilo que tienen otras nucleobases distintas de uracilo, timina o 5-metilcitosina. Por ejemplo, algunas actividades de silenciamiento genético comparables se pueden obtener usando protocolos similares para los complejos de ARN de la invención que contienen monómeros sustituidos con hidroximetilo que tienen adenina, citosina o guanina como nucleobases.

20 **Ejemplo 4. Estimulación inmune.**

Dado que los complejos de ARN de la invención que contienen monómeros sustituidos con hidroximetilo están modificados químicamente con respecto a los correspondientes complejos de ARN sin modificar, estos presentarán una actividad estimuladora inmune menor que los correspondientes complejos de ARN sin modificar.

25

Ejemplo 5. Efectos colaterales.

Dado que los complejos de ARN de la invención que contienen monómeros sustituidos con hidroximetilo se pueden modular de modo que los complejos de ARNip modificado su cadena no codificante sean inactivos, el silenciamiento genético con menos efectos colaterales se hace posible con la invención. La clave está en modificar las cadenas codificantes con monómeros sustituidos con hidroximetilo de modo que la cadena codificante no pueda funcionar como la cadena no codificante. Esto se puede conseguir por ejemplo mediante la incorporación de un monómero sustituido con hidroximetilo hacia el extremo en la posición 5' de la cadena codificante.

30

35 Con el monómero X acíclico se puede conseguir una reducción de los efectos colaterales mediante la incorporación del monómero X en la cadena no codificante, más preferentemente hacia las posiciones 6-8 del extremo en la posición 5' de la cadena no codificante, por ejemplo en la posición 7 del extremo en la posición 5' de la cadena no codificante.

40 **Ejemplo 6. Síntesis de los complejos de ARN de la invención que contienen monómeros de hidroximetilo funcionalizados y conjugados.**

El sustituyente hidroximetilo de los monómeros sustituidos con hidroximetilo de la invención está funcionalizado con un grupo de conjugación. Un grupo de conjugación se define en el presente documento como un grupo que modula, extiende o mejora las propiedades químicas, biofísicas o biológicas de un complejo de ARN de la invención. Tales grupos pueden ser útiles para modular distribución celular, distribución de órganos, distribución de tejidos, temperaturas de fusión, afinidades por diana, bioestabilidad, señalización de hibridación, etc.

45

Algunos métodos conocidos se pueden usar para convertir un sustituyente hidroximetilo en una diversidad de derivados que [Furniss, Hannaford, Smith y Tatchell, Vogel's Textbook of Organic Chemistry, 1989, John Wiley & Sons]. Esto se puede conseguir a nivel del nucleósido, es decir, antes de la conversión en un derivado de fosforamidita útil para la síntesis de ARN automatizada en un sintetizador de ADN automatizado. Después de conversión del grupo hidroximetilo en un derivado útil, el derivado de fosforamidita necesario para síntesis de ADN automatizará se sintetiza usando métodos convencionales, y la incorporación de los monómeros derivatizados o conjugados en oligonucleótidos (hebras) de ARN se consigue posteriormente usando métodos convencionales (véase el Ejemplo 1).

50

55

Conjugación a través de un enlace éter. El sustituyente hidroximetilo de los monómeros sustituidos con hidroximetilo de la invención está funcionalizado con un enlace éter entre un grupo de conjugación y el grupo metileno del sustituyente de hidroximetilo mediante una reacción de sustitución nucleófila. Esta reacción implica la conversión del grupo hidroxilo del sustituyente de hidroximetilo en un buen grupo saliente por ejemplo mediante mesilación o transformación en un haluro, y posterior unión nucleófila mediante un alcohol o un derivado alcóxido.

60

Conjugación a través de un enlace tioéter. El sustituyente hidroximetilo de los monómeros sustituidos con hidroximetilo de la invención está funcionalizado con un enlace tioéter entre un grupo de conjugación y el grupo metileno del sustituyente de hidroximetilo mediante una reacción de sustitución nucleófila. Esta reacción implica la

65

conversión del grupo hidroxilo del sustituyente de hidroximetilo en un buen grupo saliente por ejemplo mediante mesilación o transformación en un haluro, y posterior unión nucleófila mediante un derivado alquilíol o tioalcóxido. Si el nucleófilo alternativo es SH⁻, la protección por ejemplo mediante acetilación conduce a un derivado de fosoramidita que es útil a la introducción de grupos mercapto (SH) en los complejos de ARN de la invención. Como un procedimiento alternativo para introducir una funcionalidad mercapto en los complejos de ARN se puede usar la conjugación con un resto que contiene disulfuro. Después de reducción del complejo de ARN contiene disulfuro se obtiene el complejo de ARN funcionalizado con el grupo mercapto.

Derivatización en un grupo aminometilo. El sustituyente hidroximetilo de los monómeros sustituidos con hidroximetilo de la invención se puede convertir en un grupo aminometilo. Esta reacción implica la conversión del grupo hidroxilo del sustituyente de hidroximetilo en un buen grupo saliente por ejemplo mediante mesilación o transformación en un haluro, y posterior unión nucleófila con amoniaco o un derivado de amina protegida (como por ejemplo ftalimida) que posteriormente se desprotege (por ejemplo después de síntesis de ARN) para dar el derivado amino deseado. Un grupo protector de trifluoroacetilo o Fmoc son otras opciones para protección de amino durante la síntesis de ARN automatizada, con liberación de un grupo amino libre después de desprotección convencional de oligonucleótido.

Conjugación a través de un enlace amida. El sustituyente hidroximetilo de los monómeros sustituidos con hidroximetilo de la invención actúa como un asa para unión de grupos de conjugación unidos a amida. Esto implica la conversión de la unidad hidroxilo del sustituyente de hidroximetilo en una unidad de amina, por ejemplo como se ha descrito anteriormente, y posterior derivatización de este grupo amino por ejemplo con un grupo de conjugación a través de formación de enlace amida usando métodos conocidos. Esto se puede producir antes de la síntesis de ARN o después de la síntesis de ARN usando métodos conocidos por una persona experta en la materia [Bryld, Højland y Wengel, Chem. Commun. 2004, 1064; Mokhir, Tetzlaff, Herzberger, Mosbacher y Richart, J. Comb. Chem. 2001, 3, 374].

Conjugación a través de un enlace amino. El sustituyente hidroximetilo de los monómeros sustituidos con hidroximetilo de la invención también está actuando como un asa para unión de grupos de conjugación unidos a amino. Esto implica la conversión de la unidad hidroxilo del sustituyente de hidroximetilo en una unidad de amina, por ejemplo como se ha descrito anteriormente, y posterior derivatización de este grupo amino con un grupo de conjugación que contiene por ejemplo una funcionalidad aldehído mediante una reacción de aminación reductora que es una reacción conocida [Furniss, Hannaford, Smith y Tatchell, Textbook of Organic Chemistry de Vogel, 1989, John Wiley & Sons]. Esto se puede producir antes de la síntesis de ARN o después de la síntesis de ARN.

Conjugación a través de un grupo piperazino o un grupo diamino alquilo lineal. Un grupo piperazino o un grupo diamino alquilo lineal también se usa para derivatización mediante realización de reacciones como se describe [Bryld, Højland y Wengel, Chem. Commun. 2004, 1064-5]. Estos grupos serán útiles, ya que otros grupos de conjugación se pueden unir por ejemplo en el átomo de nitrógeno distal de un grupo piperazino (véase la Figura 2, Monómero J) por ejemplo mediante formación de enlace amida o mediante una reacción de aminación reductora, ya sea antes o después de la síntesis de oligonucleótido de ARN [Bryld, Højland y Wengel, Chem. Commun. 2004, 1064; Mokhir, Tetzlaff, Herzberger, Mosbacher y Richart, J. Comb. Chem. 2001, 3, 374]. Por ejemplo, de este modo algunas unidades de colesterol o ácido graso se pueden unir a los complejos de ARN de la invención a través de un sustituyente de piperazino-metilo.

Usando estos procedimientos, se pueden preparar los complejos de ARN de la invención que contienen por ejemplo unidades de colesterol, unidades de alquilo, unidades de ácido graso, derivados de poliamina, derivados tio, aminoácidos, polipéptidos, derivados de monosacárido, derivados de polisacárido o fluoróforos, todos conectados a los complejos de ARN de la invención a través del grupo metileno del sustituyente de hidroximetilo. Los grupos enumerados en esta parte son solamente ejemplos de grupos que se pueden unir usando los procedimientos usados anteriormente a modo de ejemplo. Véase la Figura 2 para ejemplos estructurales de los monómeros conjugados.

Ejemplo 7. Silenciamiento genético con los complejos de ARN de la invención que contienen monómeros de hidroximetilo funcionalizados y conjugados.

El silenciamiento genético es eficaz con los complejos de ARN de la invención que contienen los monómeros de hidroximetilo funcionalizados y conjugados (véase por ejemplo la Figura 2 o el Ejemplo 6).

El silenciamiento genético eficaz se consigue cuando estos monómeros de hidroximetilo funcionalizados y conjugados se colocan en o cerca de los extremos en la posición 3' de las dos hebras de un complejo de ARNip.

El silenciamiento genético eficaz se consigue adicionalmente cuando estos monómeros de hidroximetilo funcionalizados y conjugados se colocan en o cerca del extremo en la posición 3' y el extremo en la posición 5' de la cadena codificante de un complejo de ARNip.

El silenciamiento genético eficaz se consigue en particular cuando estos monómeros de hidroximetilo

funcionalizados y conjugados se colocan en o cerca del extremo en la posición 3' de la cadena codificante de un complejo de ARNip.

5 El silenciamiento genético eficaz se consigue adicionalmente cuando estos monómeros de hidroximetilo funcionalizados y conjugados se colocan en un oligonucleótido de ARN de cadena no codificante de una sola hebra. La modulación de las propiedades farmacocinéticas se consigue junto con silenciamiento genético eficaz cuando el grupo (R en la Figura 2) de un complejo de ARN de la invención es un derivado de colesterilo. Esto conduce por ejemplo a la mejora de la distribución tisular y absorción celular, y también al aumento de la bioestabilidad.

10 La modulación de las propiedades farmacocinéticas se consigue junto con silenciamiento genético eficaz cuando el grupo (R en la Figura 2) de un complejo de ARN de la invención es un derivado tio. Esto conduce a un aumento del tiempo de circulación en un cuerpo humano, es decir, reducción de la eliminación a través de los riñones.

15 La modulación de las propiedades farmacocinéticas se consigue junto con silenciamiento genético eficaz cuando el grupo (R en la Figura 2) de un complejo de ARN de la invención contiene un grupo amino. Esto conduce a mejora de la distribución tisular.

Ejemplo 8. Bioestabilidad de los complejos de ARN sustituidos con hidroximetilo.

20 Procedimiento experimental para el ensayo de estabilidad. Los complejos de ARN sustituidos con hidroximetilo se incubaron a 37 °C en suero bovino fetal al 10 % (Gibco) diluido en D-MEM (Gibco). Las muestras de 5 µl se recogieron en los puntos temporales indicados y se congelaron inmediatamente en hielo seco en 15 µl de 1,33 x TBE/tampón de carga de glicerol al 10 % y se sometieron a PAGE no desnaturizante en un gel al 15 %. Los ARN se visualizaron con oro SYBR (Invitrogen).

25 Tales experimentos muestran que la estabilidad de los complejos de ARN sustituidos con hidroximetilo presentan mejora de la estabilidad en medios biológicos con respecto a los complejos de ARN de control nativos (o "no modificados"). Por lo tanto, los ARNip sustituidos con hidroximetilo son significativamente más estables en suero al 10 % que el ARNip habitual. Por lo tanto, se puede prever que solamente se observe una disminución muy pequeña del tamaño del ARNip sustituido con hidroximetilo durante un periodo de incubación de más de una hora de duración. Los inventores concluyen que los complejos de ARN de la invención que contienen monómeros sustituidos con hidroximetilo son muy estables en células, en animales y en seres humanos, y que esta característica está contribuyendo a sus propiedades de silenciamiento genético muy eficaces. Debido a esta bioestabilidad pronunciada, los complejos de ARN de la invención que contienen monómeros sustituidos con hidroximetilo presentan silenciamiento genético durante un periodo de tiempo mayor que homólogos sin modificar.

Ejemplo 9. Una serie de experimentos de silenciamiento genético demuestran el fuerte potencial de los monómeros de estructura D para silenciamiento genético.

40 Usando procedimientos descritos en los experimentos anteriores, se desarrollan estudios de silenciamiento genético usando dúplex de ARNip de las secuencias descritas anteriormente así como de secuencias adicionales (véanse las Figuras 4-9 para las secuencias incluidas en los estudios de este ejemplo). Estos experimentos incluían secuencias que contienen una o más incorporaciones del monómero X (véase el Ejemplo 1 para descripción del monómero X). El Monómero X se usa en el presente documento solamente como una estructura a modo de ejemplo y resultados similares se predicen para derivados tales como por ejemplo el monómero E, monómero F, monómero G, monómero I y monómero J (véase la Figura 1 y la Figura 2). Los monómeros con letra en negrita y subrayada con un superíndice L son monómeros de LNA. En este ejemplo, en las Figuras 4-9 están incluidos $C^L = C^{MeL}$ = monómero de LNA de 5-metilcitosin-1-ilo.

50 Todos los experimentos para los que se representan los resultados en la Figura 4 implican a la cadena codificante que tiene dos incorporaciones de monómero X (W130). Se muestra que:

- es posible diseñar un dúplex de ARNip formado por hebras que contienen monómeros tanto sustituidos con hidroximetilo como de LNA que presenta funcionalidad de silenciamiento genético;
- 55 - es posible diseñar un dúplex de ARNip formado por una hebra que tiene un monómero X con falta de coincidencias en la cadena codificante que presenta funcionalidad de silenciamiento genético;
- la cadena no codificante de ARN completo (excepto para dos monómeros de LNA hacia el extremo en la posición 3') se tolera bien;
- un solo monómero X se tolera bien en la cadena no codificante (W123, W125 o W126);
- 60 - varios monómeros X se toleran pero se observa un silenciamiento genético menos eficaz con W186 y W187 que con W123, W125 o W126 como cadena no codificante;
- se observa actividad significativa de silenciamiento genético con W188 aunque esta cadena no codificante contiene seis monómeros de LNA que muestra que un monómero X colocado centralmente en una cadena no codificante es capaz de mejorar el silenciamiento genético con respecto a la situación en la que el monómero X está sustituido con el monómero de ARN correspondiente.

65

Todos los experimentos para los que se representan los resultados en la Figura 5 implican a la cadena codificante que tiene un monómero **X** situado hacia el extremo en la posición 3' de la hebra (W131). Se muestra que:

- 5 - la cadena no codificante de ARN completo (excepto para dos monómeros de LNA hacia el extremo en la posición 3') se tolera bien;
- un solo monómero **X** se puede tolerar bien en la cadena no codificante (W123);
- un solo monómero **X** podría conducir a un silenciamiento genético tan bueno o incluso mejorado con respecto al del control sin modificar (ARNip-EGFP) (W125 o W126);
- varios monómeros **X** se toleran bastante bien (W186, W187 o W281 como cadena no codificante);
- 10 - se observa actividad significativa de silenciamiento genético con W188 aunque esta cadena no codificante contiene seis monómeros de LNA que muestra que un monómero **X** colocado centralmente en una cadena no codificante es capaz de mejorar el silenciamiento genético con respecto a la situación en la que el monómero **X** está sustituido con el monómero de ARN correspondiente;
- se observa silenciamiento genético significativo con varias sustituciones del monómero **X** en la cadena no codificante en una situación sin la copresencia de monómeros de LNA (W281).

Todos los experimentos para los que se representan los resultados en la Figura 6 implican a la cadena codificante que tiene tres monómeros **X** dispersos a lo largo de la cadena codificante (W282). Se muestra que:

- 20 - la cadena no codificante de ARN completo (excepto para dos monómeros de LNA hacia el extremo en la posición 3') se tolera bien;
- un solo monómero **X** se puede tolerar bien en la cadena no codificante, lo más aparentemente hacia el extremo en la posición 3' por lo que se observó un silenciamiento genético bueno o incluso mejorado con respecto al del control sin modificar (ARNip-EGFP) (W123, W125, W126);
- 25 - varios monómeros **X** se toleran bastante bien (W186, W187 o W281 como cadena no codificante);
- se observa actividad significativa de silenciamiento genético con W188 aunque esta cadena no codificante contiene seis monómeros de LNA que muestra que un monómero **X** colocado centralmente en una cadena no codificante es capaz de mejorar el silenciamiento genético con respecto a la situación en la que el monómero **X** está sustituido con el monómero de ARN correspondiente, y que también cuando la cadena codificante contiene varios monómeros **X**;
- 30 - también se observa silenciamiento genético con varias sustituciones del monómero **X** en la cadena no codificante en una situación sin la copresencia de monómeros de LNA (W281).

Todos los experimentos para los que se representan los resultados en la Figura 7 implican a la cadena codificante sin el monómero **X** (W194). Se muestra que:

- un solo monómero **X** se puede tolerar bien en la cadena no codificante (W123);
- un solo monómero **X** podría conducir a un silenciamiento genético tan bueno o incluso mejorado con respecto al del control sin modificar (ARNip-EGFP) (W125 o W126);
- 40 - varios monómeros **X** se toleran bastante bien (W186, W187 o W281 como cadena no codificante);
- se observa actividad significativa de silenciamiento genético con W188 aunque esta cadena no codificante contiene seis monómeros de LNA que muestra que un monómero **X** colocado centralmente en una cadena no codificante es capaz de mejorar el silenciamiento genético con respecto a la situación en la que el monómero **X** está sustituido con el monómero de ARN correspondiente;
- 45 - también se observa silenciamiento genético significativo con varias sustituciones del monómero **X** en la cadena no codificante en una situación sin la copresencia de monómeros de LNA (W281).

Todos los experimentos para los que se representan los resultados en la Figura 8 implican a la cadena codificante sin el monómero **X** (W181) pero con cuatro monómeros de LNA incorporados en el segmento que forma dúplex (más dos monómeros de LNA en el extremo la posición 3'). Se muestra que:

- un solo monómero **X** se tolera bien en la cadena no codificante (W123, W125 o W126);
- varios monómeros **X** se toleran bastante bien (W186, W187 o W281 como cadena no codificante);
- 55 - se observa actividad significativa de silenciamiento genético con W188 aunque esta cadena no codificante contiene seis monómeros de LNA que muestra que un monómero **X** colocado centralmente en una cadena no codificante es capaz de mejorar el silenciamiento genético con respecto a la situación en la que el monómero **X** está sustituido con el monómero de ARN correspondiente;
- se observa silenciamiento genético significativo con varias sustituciones del monómero **X** en la cadena no codificante también en una situación sin la copresencia de monómeros de LNA (W281).

Todos los experimentos para los que se representan los resultados en la Figura 9 implican a la cadena codificante que tiene un monómero **X** situado hacia el extremo la posición 5' de la hebra (W129). Se muestra que:

- 65 - la cadena no codificante de ARN completo (excepto para dos monómeros de LNA hacia el extremo en la posición 3') se tolera bien;
- un solo monómero **X** se puede tolerar bien en la cadena no codificante y podría conducir a una mejora del

- silenciamiento genético relativo al del control sin modificar (ARNip-EGFP) (W123, W125 o W126);
 - varios monómeros **X** se toleran bastante bien (W186, W187 o W281 como cadena no codificante);
 - se observa actividad significativa de silenciamiento genético con W188 aunque esta cadena no codificante contiene seis monómeros de LNA que muestra que un monómero **X** colocado centralmente en una cadena no codificante es capaz de mejorar el silenciamiento genético con respecto a la situación en la que el monómero **X** está sustituido con el monómero de ARN correspondiente;
 - se observa silenciamiento genético significativo con varias sustituciones del monómero **X** en la cadena no codificante en una situación sin la copresencia de monómeros de LNA (W281).
- 10 Los datos que se muestran a continuación indican que los monómeros sustituidos con hidroximetilo son compatibles con el enfoque de ARNsisi. Como un ejemplo, el uso de la combinación tri-molecular de la cadena no codificante W123 + las cadenas codificantes (W004 + W005) conduce a un silenciamiento genético eficaz (es decir, el "efecto de ARNip" tiene un valor bajo, en el caso del efecto de ARNip es 0,24) que muestra que el monómero **X** se puede colocar en la cadena no codificante de complejos de ARNsisi (comparar con el Control; lectura de salida 1,0).
- 15 También se muestran datos para ARNip sin modificar. El diseño de la cadena no codificante es importante, ya que la combinación de la cadena no codificante W186 + las cadenas codificantes (W004 + W005) es incapaz de inducir un efecto de silenciamiento genético. Esto muestra que el número de monómeros sustituidos con hidroximetilo (por ejemplo, Monómero D) debería ser bajo, y debería estar limitado de la forma más favorable a un monómero (además de los monómeros sustituidos con hidroximetilo opcionales en el saliente de la cadena no codificante).
- 20 Otros complejos de ARN incluidos en el estudio representados en la Figura 9 son igualmente eficaces con respecto al silenciamiento genético.

Cadena no codificante	efecto de ARNip
W123	0,24
W125	0,26
W126	0,23
W186	1,12
ARNSi	0,11
Control	1,0

Ejemplo 10. Las modificaciones de semilla reducen los efectos colaterales.

- 25 Usando la cadena no codificante W124, y W207 (5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG UT^LC^{MeL}) (SEQ ID NO:) como la cadena codificante en un dúplex de ARNip a concentración 50 nM, los inventores mostraron que el monómero **X**, cuando está presente en la denominada región semilla de la cadena no codificante tiene un efecto de aumento de la selectividad que conducirá a menos efectos colaterales. De este modo, el equipo experimental permitió la discriminación entre el efecto del ARNip (silenciamiento genético con escisión de hebra) y el efecto del ARNmi (represión de la traducción; sensor colateral basado en plásmido que tiene cuatro regiones diana formada solamente por emparejamiento de región semilla). Usando la combinación mencionada anteriormente, el efecto del ARNip en el mismo que para el control de ARNip sin modificar mientras que el efecto del ARNmi se reducía de forma significativa. Un efecto similar se obtuvo para el siDharma (un producto comercial que tiene un monómero de 2'-O-Me-ARN incorporado en la posición n.º 2 del extremo en la posición 5' de la cadena no codificante). Como se ha indicado anteriormente, esto muestra que un monómero sustituido con hidroximetilo (por ejemplo, Monómero D) presente en la denominada región semilla de la cadena no codificante conduce a un efecto favorable (es decir, reducción o eliminación del efecto colateral). Por lo tanto, un método para reducir o eliminar el efecto colateral de un complejo de ARN, método que comprende la incorporación de uno o más monómeros sustituidos con hidroximetilo (por ejemplo, Monómero D) en un complejo de ARN o preparar un complejo de ARN que contenga uno o más monómeros sustituidos con hidroximetilo (por ejemplo, Monómero D). Véase la tabla que sigue a continuación para los resultados de silenciamiento genético (es decir, "efecto de ARNip") y efecto colateral (es decir, "efecto de ARNmi"). Estos datos indican que un complejo de ARN que contiene uno o más monómeros sustituidos con hidroximetilo (por ejemplo, Monómero D) reduce la expresión de la diana a la vez que minimiza el efecto colateral.

Cadena no codificante	efecto de ARNip	efecto de ARNmi
W124	0,12	0,38
W125	0,04	0,19
ARNSi	0,06	0,15
siDharma	0,08	0,37
Control	1,0	1,0

Para estudios de semilla guiados adicionales, los inventores han preparado las siguientes secuencias formadas por monómeros de ARN (rA, rC, rG y rU) y monómeros modificados con hidroximetilo (Monómero D; sA, sC, sG y sU etiquetados para los derivados de adenin-9-ilo, citosin-1-ilo, guanin-9-ilo y uracil-1-ilo, respectivamente). El Monómero X representa al Monómero D con una nucleobase:

5 La numeración de los primeros nueve oligonucleótidos mostrados a continuación es la que sigue a continuación (desde el n.º 1 de la parte superior - n.º 9):

10 W313; W314; W315; W316; W317; W123; W318; W319 y W320

```

sA rC rU rU rG rU rG rG rC rC rG rU rU rU rA rC rG rU rC IG IC rU
rA sC rU rU rG rU rG rG rC rC rG rU rU rU rA rC rG rU rC IG IC rU
rA rC sU rU rG rU rG rG rC rC rG rU rU rU rA rC rG rU rC IG IC rU
rA rC rU sU rG rU rG rG rC rC rG rU rU rU rA rC rG rU rC IG IC rU
rA rC rU rU sG rU rG rG rC rC rG rU rU rU rA rC rG rU rC IG IC rU
rA rC rU rU rG sU rG rG rC rC rG rU rU rU rA rC rG rU rC IG IC rU
rA rC rU rU rG rU sG rG rC rC rG rU rU rU rA rC rG rU rC IG IC rU
rA rC rU rU rG rU rG sG rC rC rG rU rU rU rA rC rG rU rC IG IC rU
rA rC rU rU rG rU rG rG sC rC rG rU rU rU rA rC rG rU rC IG IC rU

sA rC rU rU rG rU rG rG rC rC rG rU rU rU rA rC rG rU rC rG sU rU
rA sC rU rU rG rU rG rG rC rC rG rU rU rU rA rC rG rU rC rG sU rU
rA rC sU rU rG rU rG rG rC rC rG rU rU rU rA rC rG rU rC rG sU rU
rA rC rU sU rG rU rG rG rC rC rG rU rU rU rA rC rG rU rC rG sU rU
rA rC rU rU sG rU rG rG rC rC rG rU rU rU rA rC rG rU rC rG sU rU
rA rC rU rU rG sU rG rG rC rC rG rU rU rU rA rC rG rU rC rG sU rU
rA rC rU rU rG rU sG rG rC rC rG rU rU rU rA rC rG rU rC rG sU rU
rA rC rU rU rG rU rG sG rC rC rG rU rU rU rA rC rG rU rC rG sU rU
rA rC rU rU rG rU rG rG sC rC rG rU rU rU rA rC rG rU rC rG sU rU
    
```

15 Usando técnicas experimentales similares a las descritas en los ejemplos anteriores con los oligómeros W313; W314; W315; W316; W317; W123; W318; W319 y W320 como cadena no codificante y el oligómero JW1104 como la cadena codificante en experimentos de silenciamiento genético se mostró que la potencia de las construcciones de ARNip que contenían el monómero D sustituido con hidroximetilo puede aumentar con respecto al ARNip sin modificar o un producto de ARNip comercial modificado químicamente (Dharma) que tiene un monómero de 2'-O-Me-ARN en la posición n.º 2 del extremo en la posición 5' de la cadena no codificante). Además, los complejos de ARNip que contienen al Monómero D de 2',3'-seco-ARN que muestran que este monómero se puede incorporar en construcciones de ARNip de modo que los efectos colaterales (efectos de ARNmi) se reducen con respecto al ARNip sin modificar de referencia (ARNSi)

25 Los resultados para complejos de ARN 1 nM, 10 nM y 100 nM se presentan a continuación en forma de tabla (Control; datos ajustados a 1,0). Los efectos del silenciamiento genético a través de ARNip y ARNmi (microARN) se estudiaron a diversas concentraciones de los diferentes dúplex de ARNip como se indica. Se esperan resultados similares a partir de hebras tales como las nueve veras mostradas anteriormente que contienen exclusivamente ARN y monómeros de 2',3'-seco-ARN acíclicos.

30 El monómero D modificado con hidroximetilo como modificación de cadena no codificante reduce los efectos colaterales y aumenta la potencia del silenciamiento genético.

	efecto del ARNSi			efecto del ARNmi	
	1 nm	10 nm	100 nm	1 nm	10 nm
W313	0,45	0,76	0,81	0,52	0,67
W314	0,58	0,96	0,88	0,72	0,64
W315	0,48	0,82	0,85	0,62	0,64
W316	0,46	0,75	0,78	0,85	0,97
W317	0,26	0,32	0,92	0,39	0,52
W318	0,17	0,18	0,45	0,46	0,62

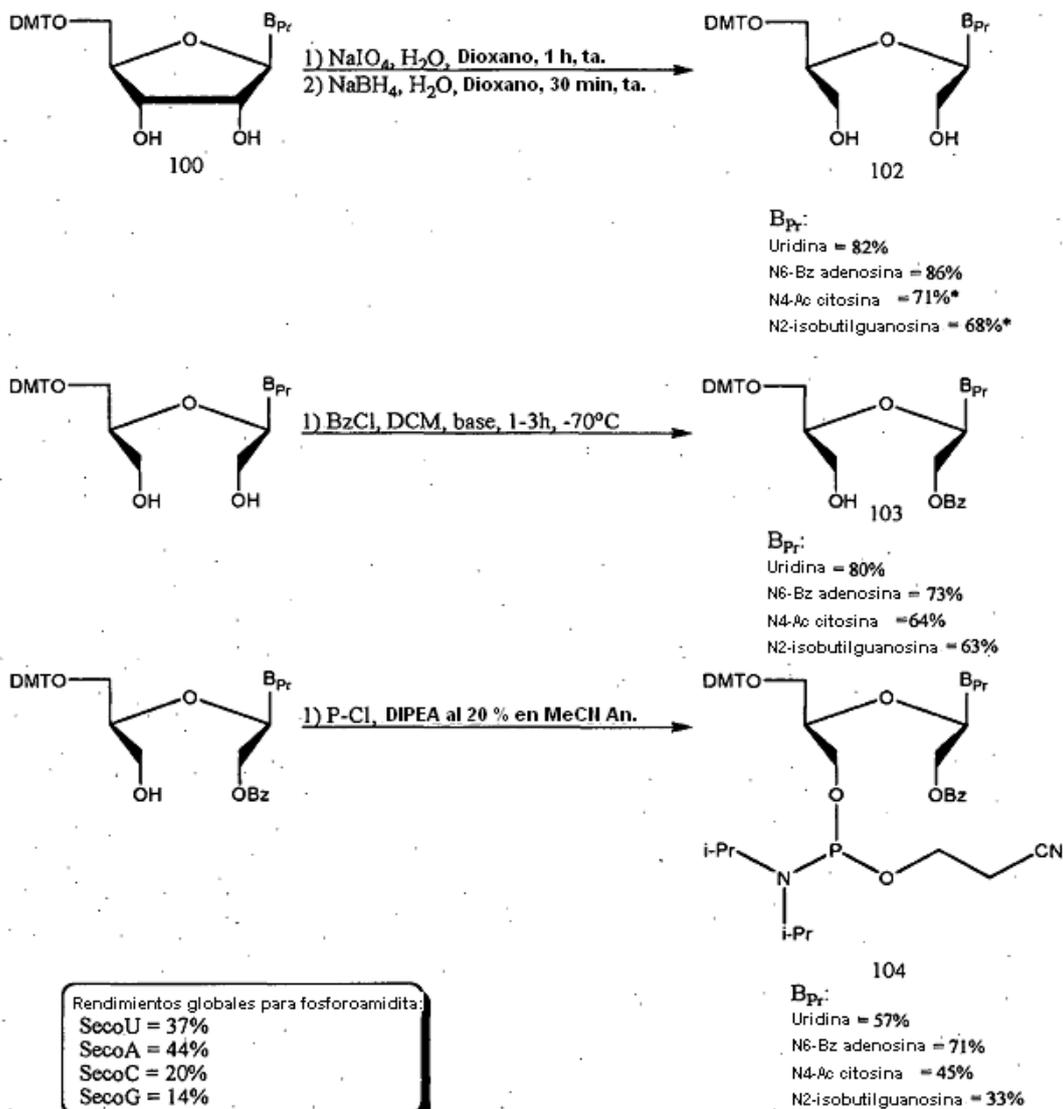
	efecto del ARNSi			efecto del ARNmi	
W319	0,34	0,50	0,66	0,23	0,29
W320	0,87	0,96	0,97	0,13	0,12
Dharma	0,52	0,47	0,89	0,37	0,40
ARNSI	0,23	0,24	0,54	0,12	0,14
Control	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

El diseño es importante, y la más potente de las series de oligómeros mencionadas anteriormente para efectos de ARNip es W318 que tiene un monómero D sustituido con hidroximetilo en la posición n.º 7 del extremo en la posición 5' de la cadena no codificante. W318 también conduce a efectos colaterales favorablemente bajos (ARNmi) con respecto al ARNip sin modificar o con respecto un producto comercial (Dharma). En general, el uso de las cadenas no codificantes mencionadas anteriormente que tienen un monómero D sustituido con hidroximetilo incorporado conduce a efectos colaterales favorablemente bajos (ARNmi). De forma importante y sorprendente, se pueden observar potencia elevada y efectos colaterales bajos de forma simultánea usando una construcción con una cadena no codificante que contiene un monómero D sustituido con hidroximetilo (véase la tabla mencionada anteriormente). En particular, el diseño de W318 es favorable mostrando que un monómero D sustituido con hidroximetilo se puede incorporar de forma favorable alrededor del límite de la denominada región diana de la cadena no codificante, lo más favorablemente alrededor de las posiciones n.º 5-10 desde el extremo en la posición 5' de la cadena no codificante, tal como por ejemplo la posición n.º 7 del extremo en la posición 5' de la cadena no codificante. En las dos hebras se pueden realizar incorporaciones adicionales de uno o más monómeros D sustituidos con hidroximetilo.

Además, se puede observar que el efecto se puede invertir si el monómero X se coloca en la cadena no codificante alrededor de las posiciones 9-16, en el que las posiciones se cuentan desde el extremo de la posición 5'. Si por ejemplo el monómero X en la cadena no codificante está presente en la posición n.º 9 del extremo en la posición 5' de la cadena no codificante, la cadena no codificante y el dúplex actúa como un microARN (el efecto del ARNip serán mínimos y el efecto del microARN mucho más elevado). Este efecto aparece probablemente a partir de la tendencia reducida hacia la unión de longitud completa debido a la afinidad reducida causada por la presencia de un monómero X (= monómero D) sustituido con hidroximetilo acíclico.

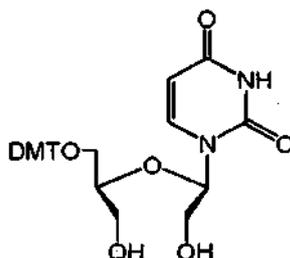
25 **Ejemplo 11. Síntesis de componentes básicos monoméricos de fosforamidita**

El esquema que sigue a continuación presenta procedimientos que se han realizado para síntesis a modo de ejemplo de componentes básicos de amidita (= fosforamidita) monomérica:



'La etapa de apertura del anillo para dar SecoG y SecoC se realizó sin purificación después de la protección de DMT, por lo tanto, los rendimientos escritos son rendimientos globales de las dos etapas.

- Los compuestos 100 son materiales de partida ribonucleósidos. Los compuestos 102 son dioles preparados mediante reacciones de escisión oxidativa seguido de reducción. Los compuestos 103 son derivados O2'-benzoylados preparados por benzoylación selectiva del grupo O2'-hidroxi de los compuestos 102. Los compuestos 104 son amiditas (= fosforamiditas) preparados por O3'-fosforilación del grupo O3'-hidroxi de los compuestos 103. A continuación se detallan procedimientos y datos de caracterización incluidos como procedimientos a modo de ejemplo.
- 10 5'-O-(4,4'-Dimetoxitritil)-2',3'-secouridina (102-U)



El nucleósido 100-U (5'-O-(4,4'-Dimetoxitritil)uridina; 10,35 g, 18,94 mmol) se disolvió en dioxano (250 ml) y agua (50 ml). El NaIO_4 (4,47 g, 20,90 mmol) se disolvió en agua (50 ml) y SE añadió a nucleósido disuelto. La mezcla se agitó durante 1 h, periodo durante el que se formó un precipitado de color blanco. Se añadió dioxano (200 ml) adicional y la suspensión se agitó durante 15 min, tras lo cual la suspensión se filtró a través de un filtro de vidrio y la torta de filtro se lavó con dioxano (100 ml). Los filtrados se combinaron, se añadió NaBH_4 (797 mg, 21,1 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 30 min. La mezcla de reacción se neutralizó con un tampón (piridina:AcOH a 1:1, v/v, ~10 ml). Después de la evaporación de la mezcla hasta aproximadamente 150 ml de CH_2Cl_2 (100 ml) se añadió y la mezcla se lavó con NaHCO_3 ac. sat. (2 x 100 ml). La fase orgánica se separó, se secó con Na_2SO_4 , se evaporó a sequedad, y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (acetona al 40 % en éter de petróleo) proporcionando el nucleósido deseado 102-U en forma de una espuma de color blanco después de la evaporación de los disolventes.

Rendimiento: 8,53 g (82 %).

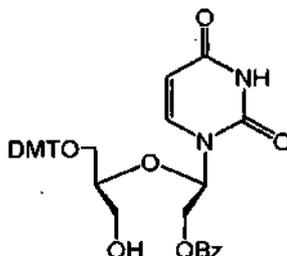
R_f: 0,2 (MeOH al 10 % en CH_2Cl_2).

RMN ¹H (DMSO-*d*₆): δ 11,34 (s a, NH), 7,62 (d, 1H, $J = 8,05$ Hz, H6), 7,45-7,15 (m, 9H, ar), 6,85 (d, 4H, ar), 5,80 (t, 1H, $J = 6,2$ Hz, H1'), 5,52 (d, 1H, $J = 8,05$ Hz, H5), 5,12 (t, 1H, $J = 5,86$ Hz, 2'OH), 4,74 (t, 1H, $J = 5,49$ Hz, 3'OH), 3,72 (s, 6H, OCH₃), 3,55-3,47 (m, 3H, H2'/H4'), 3,40 (t, 2H, $J = 5,13$ Hz, H3'), 3,01-2,90 (m, 2H, H5').

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆): δ 163,2, 157,9, 151,4, 144,8, 141,1 (C5), 135,4, 129,5 (ar), 127,7, 127,5 (ar), 126,5 (ar), 113,0, 101,6 (C6), 85,3, 83,6 (C1'), 79,3 (C2'/C4'), 63,5 (C5'), 61,1, 60,5 (C2'/C4'), 54,9 (-OCH₃).

ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 571,1743 calc.: 571,2051.

2'-O-Benzoil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2',3'-secouridina (103-U)



25

El nucleósido 102-U (3,01 g, 5,50 mmol) se coevaporó con tolueno an. (15 ml). El residuo resultante se disolvió en DCM an. (150 ml) junto con Pir. an. (4,4 ml) y la mezcla se enfrió a -70 °C. Se añadió cloruro de benzoilo (700 μl , 6 mmol) lentamente a la mezcla de reacción y se agitó durante 1 h a -70 °C. Se añadió EtOH (5 ml) a la solución y posteriormente se permitió que alcanzara la ta. La mezcla de reacción se lavó con NaHCO_3 ac. sat. (3 x 100 ml) y salmuera (100 ml). La fase acuosa combinada se volvió a extraer con CH_2Cl_2 (100 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se evaporaron. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (MeOH al 3,5 % en DCM) proporcionando el producto 103-U en forma de una espuma de color blanco después de la evaporación de los disolventes.

Rendimiento: 3,44 g (79 %).

R_f: 0,3 (MeOH al 5 % en CH_2Cl_2).

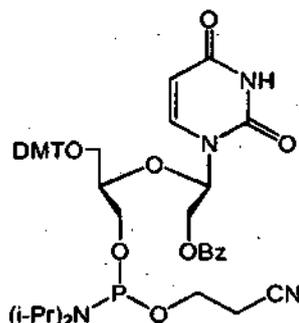
RMN ¹H (DMSO-*d*₆): δ 11,43 (s, 1H, NH, ex), 7,93-7,87 (m, 2H, ar), 7,80 (d, 1H, $J = 8,05$ Hz, H6), 7,70-7,63 (m, 1H), 7,56-7,48 (m, 2H, ar), 7,35-7,17 (m, 10H, ar), 6,89-6,81 (m, 4H, ar), 6,20 (t, 1H, $J = 5,49$ Hz, H1'), 5,56 (d, 1H, $J = 8,05$ Hz, H5), 4,83 (t, 1H, OH-3', ex), 4,58 (dc, 2H, H2'), 3,73 (s, 7H, -OCH₃), 3,70-3,62 (m, 1H, H4'), 3,45 (t, 2H, H3'), 3,11-2,96 (m, 2H, H5').

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆): δ 164,92, 162,98, 157,89, 151,00, 144,67, 140,51, 135,45, 135,35, 133,54, 129,49, 129,45, 129,13, 129,02, 128,92, 128,74, 128,61, 127,65, 127,51, 126,49, 113,16, 113,01, 102,06, 85,35, 80,84, 79,57, 71,8, 71,8, 63,4, 60,5, 54,9, 54,8.

ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 675,1949 calc.: 675,2313.

45

2'-O-Benzoil-3'-O-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfino)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2',3'-secouridina (104-U)



El nucleósido 103-U (679 mg, 1,04 mmol) se coevaporó con DCE (3 x 6 ml) y se secó durante 12 h al vacío. El residuo se disolvió en DIPEA al 20 % en MeCN (6,5 ml) y la mezcla se agitó. Se añadió 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilclorofosforamidita [P(Cl)(OCH₂CH₂CN)(N(iPr)₂): 0,66 ml, 3,02 mmol] a la mezcla de reacción y la agitación continuó durante 40 min. La mezcla de reacción se vertió en DCE (10 ml) y se lavó con NaHCO₃ ac. sat. (10 ml) y la fase acuosa se extrajo de nuevo con DCE (10 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se evaporaron para proporcionar una espuma de color blanco. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (EtOAc al 0-20 % en tolueno) para dar el nucleósido 104-U en forma de un material sólido de color blanco después de la evaporación de los disolventes.

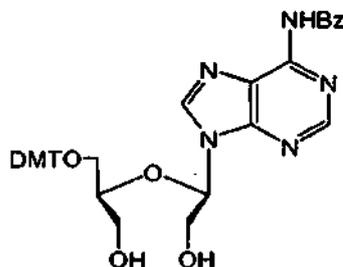
Rendimiento: 600 mg (68 %).

R_f: 0,6 (EtOAc al 50 % en tolueno).

RMN ³¹P (MeCN): δ 147,8.

ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 875,2946 calc.: 875,3391.

6-*N*-Benzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)-2',3'-secoadenosina (102-A)



Se disolvió 6-*N*-benzoil-5'-*O*-(4,4'-Dimetoxitritil)adenosina (100-A; 7,02 g, 10,42 mmol) en dioxano (150 ml) y agua (25 ml). El NaIO₄ (2,73 g, 11,77 mmol) se disolvió en agua (25 ml) y se añadió a nucleósido disuelto. La mezcla se agitó durante 1 h, periodo durante el que se formó un precipitado de color blanco. Se añadió dioxano (100 ml) adicional y la suspensión se agitó durante 15 min, tras lo cual la suspensión se filtró a través de un filtro de vidrio y la torta de filtro se lavó con dioxano (50 ml). Los filtrados se combinaron, se añadió NaBH₄ (435 mg, 11,5 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 30 min. A continuación se añadió acetona para inactiva el NaBH₄ residual. La mezcla de reacción se neutralizó con un tampón (piridina:AcOH a 1:1, v/v, ~10 ml). La mezcla de reacción se redujo hasta aproximadamente 100 ml y se añadió CH₂Cl₂ (100 ml) y la mezcla se lavó con NaHCO₃ ac. sat. (2 x 100 ml). La fase orgánica se separó, se secó con Na₂SO₄, se evaporó a sequedad, y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna usando DCM e *i*-PrOH para dar el producto en forma de un material sólido de color blanco después de la evaporación de los disolventes.

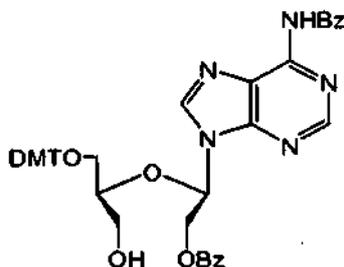
Rendimiento: 6,07 g (86 %).

R_f: 0,22 (*i*-PrOH al 5 % en DCM).

RMN ¹H (DMSO-*d*₆): δ 11,23 (s a, 1H, N6H), 8,76 (s, 1H, adenina C8/C2), 8,68 (s, 1H, adenina C8/C2), 8,07 (d, 2H, J = 6,96 Hz, Ar), 7,69-7,50 (m, 3H, Ar), 7,25-6,91 (m, 9H, Ar), 6,79 (dd, 4H, Ar), 6,06 (t, 1H, H1'), 5,29 (t, 1H, 2'OH), 4,84 (t, 1H, 3'OH), 4,19-4,02 (m, 2H, H2'), 3,90-3,80 (m, 1H, H4'), 3,69 (s, 6H, 2 x -OCH₃), 3,49 (t, 2H, H3'), 2,93-2,74 (m, 2H, H5').

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆): δ 165,6, 157,9, 152,8, 151,6 (adenina CH), 150,2, 144,6, 143,1 (adenina CH), 135,7, 135,4, 132,4 (Ar), 129,4 (Ar), 128,5 (Ar), 128,4 (Ar), 127,7 (Ar), 127,5 (Ar), 126,4 (Ar), 125,2, 113,0 (Ar), 85,0, 84,5 (1'C), 79,6 (4'C), 63,6 (5'C), 61,4 (2'C), 60,9 (3'C), 54,9 (-OCH₃).

6-*N*-Benzoil-2'-*O*-benzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)-2',3'-secoadenosina (103-A)



El nucleósido 102-A (2,01 g, 2,98 mmol) se coevaporó con an. MeCN (2 x 30 ml) y se secó durante una noche. El residuo resultante se disolvió en DCM an. (150 ml) junto con DBU an. (900 mg, 5,96 mmol) y la mezcla se enfrió a -70 °C. Una solución de cloruro de benzoilo 0,5 M (6,56 ml, 3,28 mmol) se añadió lentamente a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a -70 °C y posteriormente se permitió que alcanzara la temperatura ambiente lo cual se añadieron 5 ml de EtOH. La mezcla de reacción se lavó con NaHCO₃ ac. sat. (3 x 150 ml) y salmuera (150 ml). La fase acuosa combinada se extrajo de nuevo con CH₂Cl₂ (100 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se evaporaron. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (EtOAc al 0-100 % en éter de petróleo) proporcionando el nucleósido 103-A producto en forma de una espuma de color blanco después de la evaporación de los disolventes.

Rendimiento: 1,69 g (73 %).

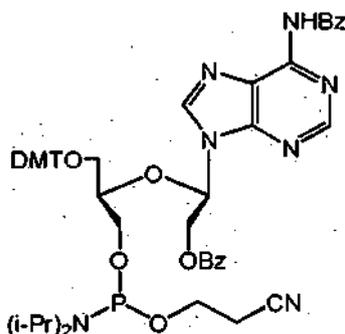
R_f: 0,49 (EtOAc).

RMN ¹H (DMSO-*d*₆): δ 11,28 (s, 1H, NH), 8,82 (s, 1H, adenina CH), 8,76 (s, 1H, adenina CH), 8,06 (d, 2H, Ar), 7,79 (d, 2H, Ar), 7,55-7,40 (m, 6H, Ar), 7,25-6,89 (m, 10, Ar), 6,77 (dd, 4H, Ar), 6,51 (t, 1H, H1'), 4,99 (m, 2H, H2'), 4,91 (t, 1H, 3'OH), 3,89 (s ap., 1H, H4'), 3,72 (s, 6H, 2 x -OCH₃), 3,54 (m, 2H, H3'), 2,81 (m, 2H, H5').

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆): δ 165,0, 157,9, 152,4, 150,5, 144,6, 142,9 (Adenina CH), 135,6, 133,6 (Ar), 132,4 (Ar), 129,0 (Ar), 128,8 (Ar), 128,4 (Ar), 127,5 (Ar), 125,2 (Ar), 113,0 (Ar), 85,1, 81,5 (C1'), 79,9 (C4'), 63,8 (C2'), 63,5, 54,9 (-OCH₃).

ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 802,2848 calc.: 802,2847.

6-N-Benzoil-2'-O-benzoil-3'-O-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfino)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2',3'-secoadenosina (104-A)



El nucleósido 103-A (1,69 g, 2,17 mmol) se coevaporó con an. MeCN (2 x 20 ml) y se secó durante 12 h al vacío. El residuo se disolvió en DIPEA al 20 % en MeCN (40 ml) y la mezcla resultante se agitó. Se añadió 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilclorofosforamidita [P(Cl)(OCH₂CH₂CN)(N(iPr)₂); 1,0 ml] a la mezcla de reacción que se agitó durante 40 min. Se añadió una cantidad adicional de 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilclorofosforamidita (0,2 ml) y la mezcla resultante se agitó durante 3 horas. Se añadió EtOH (5 ml) y la mezcla se lavó con NaHCO₃ ac. sat. (3 x 50 ml) y la fase acuosa se extrajo de nuevo con DCM (50 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se evaporaron. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (EtOAc al 0-100 % en éter de petróleo) para proporcionar una espuma de color blanco después de la evaporación de los disolventes.

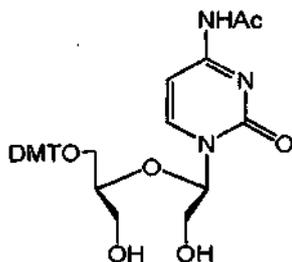
Rendimiento: 1,52 g (71 %).

R_f: 0,75 (MeOH al 5 % en DCM).

RMN ³¹P (MeCN): δ 148,9.

ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 1002,3885 calc.: 1002,3926.

40 4-N-Acetil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2',3'-secocitidina (102-C)



Se coevaporó 4-*N*-acetilcitidina (11,75 g, 41,18 mmol) con pir an. (50 ml). El residuo resultante se disolvió en pir an. (160 ml). Se añadió DMT-Cl (cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo; 16,76 g, 49,42 mmol) en forma de un material sólido y la mezcla resultante se agitó durante 2 horas a ta. La mezcla de reacción se lavó con NaHCO₃ ac. sat. (3 x 50 ml), y la fase orgánica se evaporó para producir una espuma de color blanco que se secó. Este residuo se disolvió en dioxano (500 ml) y agua (100 ml). El NaIO₄ (10,62 g, 49,5 mmol) se disolvió en agua (100 ml) y se añadió a nucleósido disuelto. La mezcla se agitó durante 1 h periodo durante el que se formó un precipitado de color blanco. Se añadieron 400 ml de dioxano adicionales y la agitación continuó durante 15 min. El precipitado se retiró por filtración y se lavó con dioxano (200 ml). Los filtrados se combinaron y se añadió NaBH₄ (1720 mg, 45,5 mmol), y la agitación continuó durante 30 min. Para neutralizar la mezcla de reacción, se añadió un tampón (10 ml, 1:1 - AcOH:piridina) hasta que se alcanzó el pH 7. La mezcla de reacción se evaporó hasta 300 ml y se extrajo con EtOAc (150 ml). La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ ac. sat. (3 x 200 ml) y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en columna con un gradiente de MeOH en EtOAc para dar el producto en forma de un material sólido de color blanco después de la evaporación de los disolventes.

Rendimiento: 17,24 g (71 %).

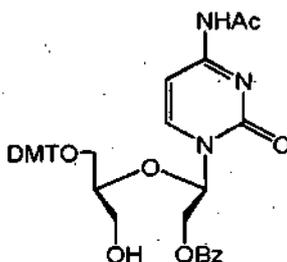
R_f: 0,19 (MeOH al 5 % en CHCl₃).

RMN ¹H (DMSO-*d*₆): δ 10,94 (s, 1H, NH), 8,08 (d, 1H, J = 7,32 Hz, Citidina CH), 7,31-7,12 (m, 12H, Ar/Citidina CH), 6,85 (d, 4H, Ar), 5,96 (t, 1H, H1'), 5,13 (t, 1H, 2'OH), 4,74 (t, 1H, 3'OH), 3,73 (s, 6H, 2 x -OCH₃), 3,63 (m, 3H, H2'/H4'), 3,43 (m, 2, H3'), 3,00 (m, 2H, H5'), 2,13 (s, 3H, -CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆): δ 170,9, 162,3, 158,0, 155,4, 146,1 (Citidina C5/C6), 144,6, 135,6, 129,6 (ar), 127,7 (ar), 126,6 (ar), 113,1 (ar), 95,4 (Citidina C5/C6), 85,5, 84,7 (C1'), 79,4 (C2'/C4'), 63,8 (C5'), 61,7 (C2'/C4'), 60,5 (C3'), 55,0 (-OCH₃), 24,3 (-CH₃).

ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 612,2298 calc.: 612,2316.

4-*N*-Acetil-2'-*O*-benzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)-2',3'-secocitidina (103-C)



El nucleósido 102-C (3,03 g, 5,14 mmol) se coevaporó con tolueno an. (2 x 30 ml) y se secó durante 12 h al vacío. El residuo resultante se disolvió en DCM an. (150 ml) junto con DBU an. (1,5 ml, 10,3 mmol) y la mezcla resultante se enfrió a -70 °C. Se añadió cloruro de benzoílo (6,56 ml, 5,65 mmol) lentamente a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a -70 °C y posteriormente se permitió que alcanzara la ta tras lo cual se añadió EtOH (4 ml). La mezcla de reacción se lavó con NaHCO₃ ac. sat. (2 x 150 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se evaporaron. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (MeOH al 0-5 % en CHCl₃) proporcionando el nucleósido 103-C producto en forma de una espuma de color blanco después de la evaporación de los disolventes.

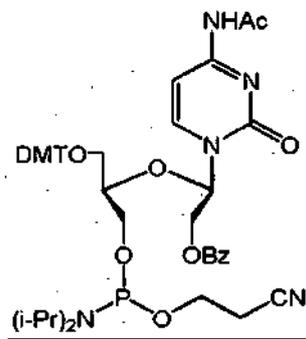
Rendimiento: 2,08 g (64 %).

R_f: 0,24 (MeOH al 5 % en CHCl₃).

RMN ¹H (DMSO-*d*₆): δ 10,97 (s, 1H, NH), 8,25 (d, 1H, Citidina CH), 7,91 (d, 2H, Ar), 7,65 (t ap., 1H, Ar) 7,32-7,12 (m, 12H, Ar/Citidina CH), 6,83 (d, 4H, Ar), 6,34 (t, 1H, H1'), 4,84 (t, 1H, 3'OH), 4,58 (dc, 2H, H2'), 3,74 (s, 6H, 2 x -OCH₃), 3,70-3,64 (m, 1H, H4'), 3,48 (m, 2H, H3'), 3,07 (m, 2H, H5'), 2,14 (s, 3H, -CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆): δ 171,0, 165,0, 162,5, 157,1, 145,5 (Citidina C5/C6), 144,6, 135,48, 133,6, 129,6 (Ar), 128,8 (Ar), 127,7 (Ar), 127,6 (Ar), 126,6 (Ar), 113,1 (Ar), 95,8 (Citidina C5/C6), 85,6, 82,0 (C1'), 79,6 (C4'), 79,2 63,9 (C2'), 63,7, 60,5 (C3'), 54,9 (-OCH₃), 24,3 (-CH₃).

ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 716,2589 calc.: 716,2759.

4-N-Acetil-2'-O-benzoil-3'-O-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfino)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2',3'-secocitidina (104-C)

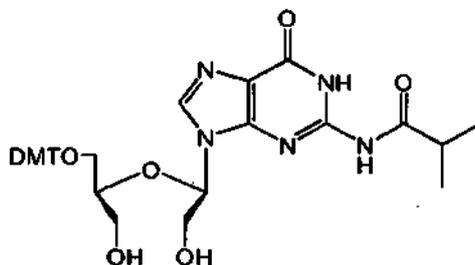
- 5 El nucleósido 103-C (1,49 g, 2,15 mmol) se coevaporó con MeCN an. (2 x 20 ml). El residuo se disolvió en DIPEA al 20 % en MeCN (20 ml) y la mezcla se agitó. Se añadió 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilclorofosforamidita [P(Cl)(OCH₂CH₂CN)(N(iPr)₂); 0,8 ml] a la mezcla y la agitación continuó durante 40 min. Se añadió 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilclorofosforamidita (0,4 ml) adicional y la agitación continuó durante 3 h. Se añadió EtOH (5 ml) y la mezcla resultante se lavó con NaHCO₃ ac. sat. (3 x 50 ml) y la fase acuosa se extrajo de nuevo con DCM (50 ml).
- 10 Las fases orgánicas se combinaron y se evaporaron. El residuo se purificó por cromatografía en columna (EtOAc al 0-100 % in éter de petróleo) para proporcionar el nucleósido 104-C en forma de una espuma de color blanco después de la evaporación de los disolventes.

Rendimiento: 940 mg (44 %).

R_f: 0,42 (MeOH al 5 % en DCM).

- 15 **RMN ³¹P (MeCN):** δ 148,8.

ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 916,3622 calc.: 916,3657.

5'-O-(4,4'-Dimetoxitritil)-2-N-isobutiril-2',3'-secoquanosina (102-G)

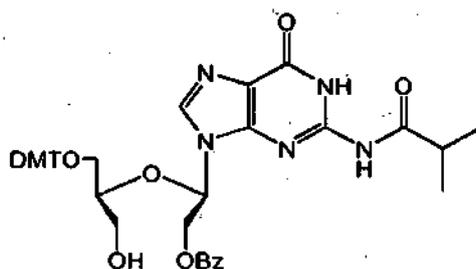
- 20 Se coevaporó 2-*N*-isobutirilguanosina (11,68 g, 17,8 mmol) con pir an. (50 ml). El residuo resultante se disolvió en pir an. (100 ml). Se añadió DMT-Cl (cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo; 7,26 g, 21,46 mmol) en forma de un material sólido y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a ta. Se añadió DMAP (50 mg, 0,40 mmol) y la mezcla resultante se agitó durante un periodo adicional de 12 h. La mezcla de reacción se lavó a continuación con NaHCO₃ ac. sat. (3 x 50 ml) y la fase orgánica se evaporó para producir una espuma de color blanco. Este residuo se disolvió en dioxano (250 ml) y agua (50 ml). El NaIO₄ (4,57 g, 21,3 mmol) se disolvió en agua (50 ml) y se añadió al nucleósido disuelto. La mezcla se agitó durante 1 h periodo durante el que se formó un precipitado de color blanco. Se añadieron 200 ml de dioxano adicionales y la agitación continuó durante 15 min. El precipitado se retiró por filtración y se lavó con dioxano (100 ml). Los filtrados se recogieron y se añadió NaBH₄ (748 mg, 19,77 mmol) y la mezcla resultante se agitó durante 30 min a ta. Para neutralizar, se añadió un tampón (10 ml, 1:1 - AcOH:piridina) hasta que se alcanzó el pH 7. El volumen de la mezcla resultante se redujo hasta 150 ml y la extracción se realizó usando EtOAc (150 ml). La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ ac. sat. (3 x 100 ml) y se evaporó, y el residuo se purificó por cromatografía en columna usando un gradiente de 0-10 % (MeOH:i-PrOH a 1:1) en DCM para producir el producto
- 30 en forma de un material sólido de color blanco después de la evaporación de los disolventes. **Rendimiento:** 8,02 g (68 %).

R_f: 0,24 (7 % MeOH en CH₂Cl₂).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆): δ 180,2, 157,9, 154,9, 147,8, 144,7, 135,4, 129,3 (Ar), 127,5 (Ar), 127,4 (Ar), 126,4 (Ar), 120,4, 113,0 (Ar), 85,2, 85,1 (C1'), 79,9 (C4'), 63,5 (C5'), 61,7 (C2'), 61,1 (C3'), 54,9 (-OCH₃), 34,7 (i-Pr cuaternario), 18,9 (i-Pr), 18,8 (i-Pr).

- 40 **MALDI-HiRes (mNa⁺):** m/z: 680,2679 calc.: 680,2691.

2'-O-Benzoil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2-N-isobutiril-2',3'-secoquanosina (103-G)



El nucleósido 102-G se suspendió en tolueno an. (2 x 30 ml) y se evaporó. El residuo resultante se secó durante 12 h al vacío. El residuo se disolvió en DCM an. (100 ml) junto con DBU an. (0,9 ml, 6,1 mmol) y la mezcla resultante se enfrió a -70 °C. Se añadió cloruro de benzoilo (390 µl, 3,36 mmol) lentamente a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a -70 °C y posteriormente se permitió que alcanzara la temperatura a la cual se añadió EtOH (4 ml). La mezcla resultante se lavó con NaHCO₃ ac. sat. (2 x 100 ml), y las fases orgánicas se combinaron y se evaporaron. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (MeOH al 0-5 % en CHCl₃) proporcionando el nucleósido 103-G en forma de una espuma de color blanco después de la evaporación de los disolventes.

Rendimiento: 1,49 g (63 %).

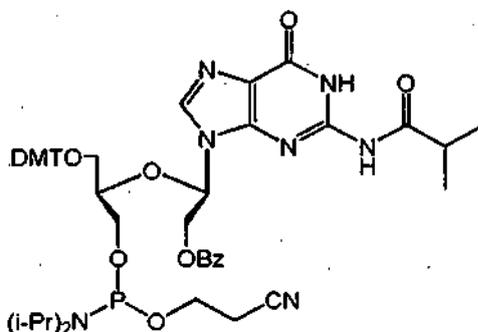
R_f: 0,47 (MeOH al 7 % en CH₂Cl₂).

RMN ¹H (DMSO-*d*₆): δ 12,10 (s, 1H, NH), 11,72 (s, 1H, NH), 8,32 (s, 1H, guanidina H8), 7,85-7,79 (m, 2H, Ar), 7,65-7,63 (m, 1H, Ar), 7,51-7,45 (m, 2H, Ar), 7,26-6,97 (m, 11H, Ar), 6,79 (m, 4H, Ar), 6,18 (t, 1H, H1'), 5,04-4,82 (m, 3H, H2'/3'OH), 3,82 (m, 1H, H4'), 3,72 (s, 6H, 2 x -OCH₃), 3,49 (t, 2H, H3'), 3,03-2,74 (m, 3H, H5'/i-Pr cuaternario), 1,11 (t ap., 6H, 2 x -CH₃).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆): δ 180,1, 164,9, 157,8, 154,8, 148,6, 147,9, 144,6, 138,4, 135,5, 135,3, 133,6, 129,3 (Ar), 129,0 (ar), 128,8 (ar), 128,7 (ar), 127,6 (ar), 127,4 (ar), 126,3 (ar), 120,6, 112,9 (ar), 85,1, 82,0 (C1'), 80,1 (C4'), 63,7, 63,3 (C5'), 61,0 (C3'), 54,8 (-OCH₃), 34,6 (i-Pr cuaternario), 18,8 (-CH₃), 18,6 (-CH₃).

ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 784,2943 calc.: 784,2953.

2'-O-Benzoil-3'-O-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfino)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2-N-isobutiril-2',3'-secoguanosina (104-G)



El nucleósido 103-G (1,45 g, 1,9 mmol) se coevaporó con MeCN an. (2 x 20 ml). El residuo se disolvió en DIPEA al 20 % en MeCN (20 ml) y la mezcla resultante se agitó. Se añadió 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilclorofosforamidita [P(Cl)(OCH₂CH₂CN)(N(iPr)₂); 0,65 ml] a la mezcla de reacción y la agitación continuó durante 40 min. Se añadió EtOH (5 ml) y la mezcla resultante se lavó con NaHCO₃ ac. sat. (3 x 50 ml), y la fase acuosa se extrajo de nuevo con DCM (50 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se evaporaron. El residuo se precipitó en éter de petróleo a partir de una solución en EtOAc para formar la amidita 104-G en forma de un material sólido de color blanco después del secado.

Rendimiento: 607 mg (33 %).

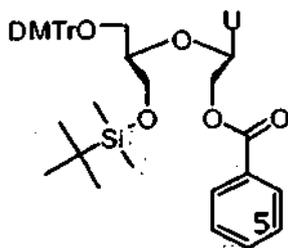
R_f: 0,3 (Acetona:tolueno a 1:3).

RMN ³¹P (MeCN): δ 148,6.

ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 984,4028 calc.: 984,4031.

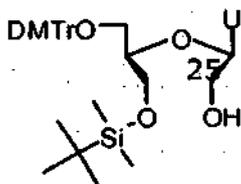
Ejemplo 12. Síntesis de componentes básicos monoméricos funcionalizados con piperazino

El ejemplo describe procedimientos que se han realizado para hacer síntesis a modo de ejemplo de componentes básicos de amidita monomérica que tienen una funcionalidad amino unida en la posición C2' de un monómero, es decir, síntesis del componente básico 111 monomérico funcionalizado con C2'-piperazino (Amidita J; base = uracilo) partiendo del nucleósido 103-U a través de los compuestos 105, 106, 107, 108, 109 y 110.



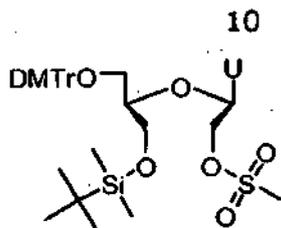
2'-O-Benzoyl-3'-O-tert-butildimetilsilil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2',3'-secouridina (105)

- 5 El nucleósido 103-U (328 mg, 0,50 mmol) se disolvió en piridina an. (2 ml) y se agitó a ta. Se añadió TBDMSCI (113 mg, 0,75 mmol) a la mezcla de reacción que se agitó durante 19 h. A continuación se añadió agua (1 ml) y la agitación continuó durante un periodo adicional de 15 min tras lo cual la mezcla de reacción se diluyó con DCM (50 ml) y se lavó con NaHCO₃ ac. sat. (2 x 25 ml) y salmuera (25 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó a sequedad a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando MeOH (0-8 %) en DCM como eluyente proporcionando de este modo el nucleósido 105 en forma de un material sólido de color blanco. Rendimiento 294 mg (78 %). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,46 (s, 1H, NH), 7,95-7,79 (m, 3H), 7,71-7,63 (m, 1H), 7,57-7,48 (m, 2H), 7,37-7,13 (m, 9H), 6,84 (d, *J* = 8,8 Hz, 4H), 6,22 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H, H1'), 5,58 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, H5), 4,69-4,45 (m, 2H, H2'), 3,80-3,64 (m, 8H, 2 x OMe y H4'), 3,54 (t, *J* = 4,7 Hz, 1H, H3'), 3,09-2,97 (m, 2H, H5'), 0,73 (s, 9H, 3 x Me), -0,07 y -0,09 (2 x s, 6H, 2 x Me). RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 165,0, 163,1, 158,0, 151,1, 144,7, 140,6, 135,5, 135,4, 133,7, 129,6, 129,1, 129,0, 128,8, 127,8, 127,6, 126,6, 113,1, 102,3, 85,5, 81,1, 79,2, 63,4, 63,1, 62,1, 55,0, 25,6, 17,7, 2 x -5,7. ESI-HRMS: *m/z* 789,3147 ([M+Na]⁺, C₄₃H₅₀N₂O₉Si⁺Na calc. 789,3178).



20 3'-O-tert-Butildimetilsilil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2',3'-secouridina (106)

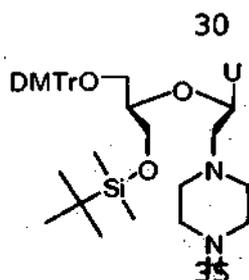
- Se mezcló NaOH (845 mg, 21,1 mmol) con MeOH an. (200 ml) y la mezcla resultante se enfrió a 0 °C. El nucleósido 105 (3,10 g, 4,05 mmol) se disolvió en MeOH an. (40 ml) y la mezcla resultante se añadió a la mezcla mencionada anteriormente y la mezcla de reacción resultante se agitó durante 2,5 h. Se añadió NH₄Cl ac. sat. (10 ml) y la agitación continuó durante un periodo adicional de 10 min tras lo cual se añadió agua (100 ml) y la extracción se realizó usando DCM (4 x 200 ml). La fase orgánica se evaporó a sequedad a presión reducida y a continuación el residuo se coevaporó con piridina an. (10 ml). El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando MeOH (5-10 %) en DCM como eluyente proporcionando de este modo el nucleósido 106 en forma de un material sólido de color blanco. Rendimiento 2,54 g (95 %). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,35 (s, 1H, NH), 7,66 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, H6), 7,33-7,14 (m, 9H), 6,88-6,82 (m, 4H), 5,82 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H, H1'), 5,53 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H5), 5,11 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H, 2'-OH), 3,73 (s, 6H, 2 x OMe), 3,69-3,45 (m, 5H, H2', H4' y H3'), 3,01-2,93 (m, 2H, H5'), 0,76 (s, 9H, 3 x Me), -0,03 y -0,05 (2 x s, 6H, 2 x Me). RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163,2, 158,0, 151,6, 144,8, 135,6, 135,4, 129,6, 127,7, 127,6, 126,6, 113,1, 101,8, 85,4, 83,5, 78,5, 63,3, 61,8, 61,0, 55,0, 25,6, 17,7, 23-5,6. ESI-HRMS: *m/z* 685,2885 ([M+Na]⁺, C₃₆H₄₆N₂O₈Si⁺Na calc. 685,2916).



40 3'-O-tert-Butildimetilsilil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-metanosulfonyl-2',3'-secouridina (107)

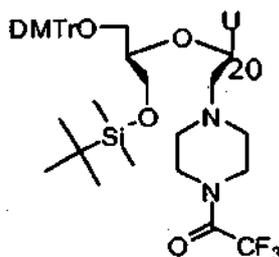
El nucleósido 106 (927 mg, 1,40 mmol) se disolvió en piridina an. (20 ml) y la mezcla resultante se agitó a 0 °C. Se añadió MsCl (220 µl, 2,83 mmol) gota a gota y la mezcla resultante se agitó durante 3 h a ta. Se añadió EtOH (2 ml)

y la agitación continuó durante un periodo adicional de 10 min. A continuación, la mezcla se evaporó a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando MeOH (0-7 %) en DCM como eluyente proporcionando de este modo el nucleósido 107 en forma de una espuma de color blanco. Rendimiento 834 mg (81 %). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,49 (s, 1H, NH), 7,77 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, H6), 7,35-7,14 (m, 9H), 6,86 (d, *J* = 8,5 Hz, 4H), 6,11 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H, H1'), 5,60 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, H5), 4,49 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H, H2'), 3,77-3,48 (m, 9H, 2 x OMe, H4' y H3'), 3,22 (s, 3H, Me), 3,10-2,89 (m, 2H, H5'), 0,77 (s, 9H, 3 x Me), -0,02 y -0,04 (2 x s, 6H, 2 x Me). RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163,1, 158,0, 151,7, 144,7, 140,5, 135,5, 135,3, 129,6, 127,8, 127,6, 126,6, 113,1, 102,4, 85,5, 80,6, 79,1, 67,8, 63,1, 61,8, 55,0, 36,8, 25,6, 17,7, -5,6, -5,7. ESI-HRMS: *m/z* 763,2662 ([M+Na]⁺, C₃₇H₄₈N₂O₁₀SSi-Na calc. 763,2692).



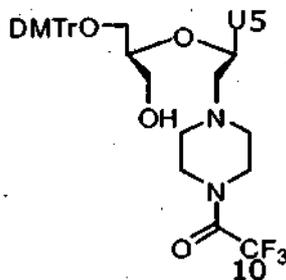
3'-O-terc-butildimetilsilil-2'-desoxi-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-piperazino-2',3'-secouridina (108)

El nucleósido 107 (276 mg, 0,373 mmol) se disolvió en piridina an. (3 ml) y se añadió piperazina (3,21 g, 37,3 mmol) con agitación a ta. A continuación, la mezcla de reacción se calentó a 150 °C y se agitó durante 1 h seguido de enfriamiento a ta. La mezcla de reacción se diluyó con NaHCO₃ ac. sat. (200 ml) tras lo cual la extracción se realizó usando cloroformo (7 x 100 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando primero MeOH (0-5 %) en DCM y a continuación amoniaco metanólico semi sat. (5 %) en DCM como sistemas de eluyente proporcionando de este modo el nucleósido 108 en forma de un material sólido de color blanco. Rendimiento, 182 mg (67 %). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,64 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, H6), 7,34-7,13 (m, 9H), 6,85 (d, *J* = 7,8 Hz, 4H), 5,98 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H, H1'), 5,53 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, H5), 3,72 (s, 6H, 2 x OMe), 3,68-3,51 (m, 3H, H4' y H3'), 3,04-2,90 (m, 2H, H5'), 2,77-2,54 (m, 6H, H2', piperazino), 2,48-2,27 (m, 4H, piperazino), 0,77, (s, 9H, 3 x Me), -0,02 y -0,04 (2 x s, 6H, 2 x Me). RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163,2, 158,0, 151,3, 144,8, 141,1(C6), 135,6, 135,4, 129,5, 127,7, 127,6, 126,6, 113,1, 113,1, 101,8 (C5), 85,4, 81,3 (C1'), 78,3, 63,1, 62,1, 60,1, 55,0 (OMe), 55,0 (OMe), 53,8, 45,3, 25,7 (Me), 17,8, -5,5 (Me), -5,6 (Me). ESI-HRMS: *m/z* 731,3859 ([M+H]⁺, C₄₀H₅₄N₄O₇Si-H calc. 731,3834).



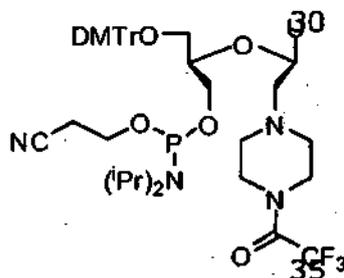
3'-O-terc-Butildimetilsilil-2'-desoxi-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-(4-N-trifluoroacetil)piperazino-2',3'-secouridina (109)

El nucleósido 108 (102 mg, 0,14 mmol) se disolvió en MeOH an. (2 ml) y la mezcla resultante se agitó a ta. Se añadieron DMAP (10 mg, 0,08 mmol) y trifluoroacetato de etilo (22 µl, 0,184 mmol) y la agitación continuó durante 16 h. A continuación, la mezcla se evaporó a sequedad a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando MeOH (0-2 %) en DCM como eluyente proporcionando de este modo el nucleósido 109 en forma de un material sólido de color blanco. Rendimiento 100 mg (86 %). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,37 (s, 1H, NH), 7,66 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, H6), 7,38-7,12 (m, 9H), 6,93-6,80 (m, 4H), 6,00 (t, *J* = 5,9 Hz, 1H, H1'), 5,54 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, H5), 3,73 (s, 6H, 2 x OMe), 3,70-3,40 (m, 7H, H3', H4' y piperazino), 3,08-2,92 (m, 2H, H5'), 2,90-2,52 (m, 6H, H2' y piperazino), 0,77 (s, 9H, 3 x Me), 0,00 y -0,04 (2 x s, 6H, 2 x Me). RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163,2, 158,0, 151,3, 144,8, 140,8, 135,6, 135,4, 129,5, 127,7, 127,6, 126,6, 113,1, 102,0, 85,5, 81,0, 78,2, 63,1, 62,0, 58,9, 55,0, 52,6, 52,0, 45,4, 43,0, 25,6, 17,8, -5,6, -5,6. ESI-HRMS: *m/z* 849,3452 ([M+Na]⁺, C₄₂H₅₃F₃N₄O₈Si-Na calc. 849,3477).



2'-Desoxi-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-(N-trifluoroacetil)piperazino-2',3'-secouridina (110)

- 5 El nucleósido 109 (251 mg, 0,304 mmol) se coevaporó con an. THF (2 x 5 ml) y a continuación se disolvió en THF an. (10 ml). Se añadió TBAF 1 M en THF (606 μ l, 0,606 mmol) gota a gota con agitación a esta mezcla a ta durante 1 h y la agitación a ta continuó a continuación durante 21 h. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad a presión reducida y el residuo se disolvió a continuación en EtOAc (40 ml). La mezcla resultante se lavó con NaHCO₃ ac. sat. (3 x 10 ml) y agua (3 x 10 ml), y a continuación la fase orgánica separado se secó sobre Na₂SO₄,
- 10 se filtró y se evaporó a sequedad a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando EtOAc (60-100 %) en éter de petróleo como eluyente proporcionando de este modo el nucleósido 110 en forma de un material sólido de color blanco. Rendimiento 111 mg (51 %). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 11,36 (s, 1H, NH), 7,66 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, H6), 7,34-7,27 (m, 4H), 7,24-7,14 (m, 5H), 6,92-6,82 (m, 4H), 5,98 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H, H1'), 5,53 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, H5), 4,80 (t, *J* = 5,3 Hz, 1H, 3'-OH), 3,73 (s, 6H, 2 x OMe), 3,63-3,38 (m, 8H, H4', H3' y piperazino), 3,07-2,89 (m, 2H, H5'), 2,77 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H, H2'), 2,66-2,54 (m, 3H, piperazino). RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-d₆): δ 163,2, 158,0, 151,2, 144,8, 140,9, 135,6, 135,5, 129,6, 129,6, 127,8, 127,6, 126,6, 113,1, 101,9, 85,4, 81,3, 79,2, 63,5, 60,7, 59,1, 55,0, 52,7, 52,1, 45,4, 42,9. ESI-HRMS: *m/z* 735,2585 ([M+Na]⁺, C₃₆H₃₉F₃N₄O₈·Na calc. 735,2612).
- 15



20

3'-(2-Cianoetoxi(diisopropilamino)fosfino)-2'-desoxi-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-(N-trifluoroacetil)piperazino-2,3'-secouridina (111)

- 25 El nucleósido 110 (91 mg, 0,128 mmol) se coevaporó con DCM an. (2 x 5 ml) y a continuación se disolvió en DCM an. (2,5 ml). Se añadió DIPEA (111 μ l, 0,64 mol) con agitación a esta mezcla a ta tras lo cual se añadió 2-cianoetil *N,N*-diisopropilfosforamidocloridita (57 μ l, 0,256 mmol) gota a gota. La agitación a ta continuó durante 1 h, tras lo cual se añadió EtOH (0,5 ml) seguido de agitación durante un periodo adicional de 10 min. Se añadió DCM (40 ml) seguido de lavado con NaHCO₃ ac. sat. (20 ml). La fase orgánica separada se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se
- 30 evaporó a sequedad a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando EtOAc (60-80 %) en éter de petróleo como eluyente proporcionando de este modo la amidita 111 en forma de un material sólido de color blanco. Rendimiento 106 mg (91 %). RMN ³¹P (CDCl₃) δ 150,0 y 149,5. ESI-HRMS: *m/z* 913,3841 ([M+H]⁺, C₄₅H₅₆F₃N₆O₉P·H calc. 913,3871).

35 **Ejemplo 13. Síntesis de oligonucleótidos que contienen componentes básicos monoméricos funcionalizados con piperazino.**

- Usando métodos descritos en el Ejemplo 1, la incorporación eficaz del monómero J con un NH terminal libre en el resto de piperazino se consiguió usando amiditas de ARN y la amidita 111. El acoplamiento proporcionado por esta
- 40 amidita fue superior a un 95 %.

LISTADO DE SECUENCIAS

45 <110> Nastech Pharmaceutical Company Inc.

<120> Oligonucleótidos de ARN y complejos de ARN hidroximetilo sustituidos

<130> 08-07PCT
 5 <140>
 <141>
 <150> PA 2007 00751
 <151> 22-05-2007
 10 <150> PA 2007 01718
 <151> 30-11-2007
 <150> PA 2007 01785
 15 <151> 14-12-2007
 <150> PA 2008 00534
 <151> 11-04-2008
 20 <160> 25
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 25 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 1
 acuuguggcc guuuacgucg cu 22
 <210> 2
 35 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 2
 acuuguggcc guuuacgucg cu 22
 45 <210> 3
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <100> 3
 55 acuugtggcc guuuacgucg cu 22
 <210>4
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 4
 65 actugtggcc guutacgtcg cu 22

<210> 5
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 5
 10 acuuguggcc guuuacgucg cu 22
 <210>6
 <211> 22
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 20 <400> 6
 acuuguggcc guuuacgucg cu 22
 <210> 7
 <211> 22
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 30 <100> 7
 acuuguggcc guuuacgucg cu 22
 <210> 8
 <211> 22
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 8
 acuuguggcc guuuacgucg cu 22
 45 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 9
 55 acuuguggcc guuuacgtcg uu 22
 <210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 10
 65 acuuguggcc guuuacgtcg uu 22

<210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 11
 10 gacguaaacg gccacaaguu cu 22
 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 20 <400> 12
 gacguaaacg gccacaagut cu 22
 <210> 13
 <211> 22
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 30 <400> 13
 gacguaaacg gccacaagut cu 22
 <210> 14
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 14
 gacguaaacg gccacaagtt c 21
 45 <210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 15
 55 gacguaaacg gccacaagut cu 22
 <210> 16
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <100> 16
 65 gacgtaaacg gccacaagut cu 22

ES 2 573 936 T3

<210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 17
 10 gacgtaaacg gccacaagtt c 21
 <210> 18
 <211> 22
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 20 <100> 18
 gacguaaacg gccacaagut cu 22
 <210> 19
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 30 <400> 19
 gacguaaacu ggccacaagu tcu 23
 <210> 20
 <211> 22
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Oligonucleótido Sintético
 <100> 20
 gacguaaacg gccacaaguu uu 22
 45 <210> 21
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 21
 55 gacguaaacg gccacaaguu uu 22
 <210> 22
 <211> 22
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <100> 22
 65 acuugggcc guuuacgucg cu 22

ES 2 573 936 T3

5
<210> 23
<211> 10
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

10
<400> 23
gacgtaaacg 10

15
<210> 24
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

20
<400> 24
gccacaagut cu 12

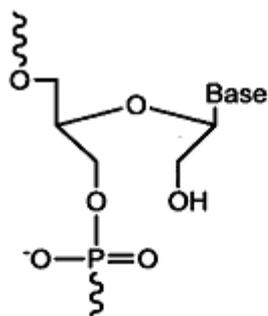
25
<210> 25
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30
<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

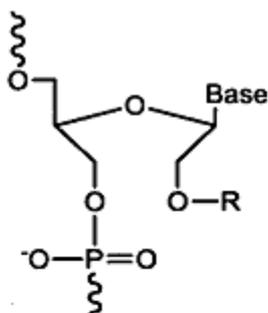
<400> 25
gacgaaaacg gccacaag 18

REIVINDICACIONES

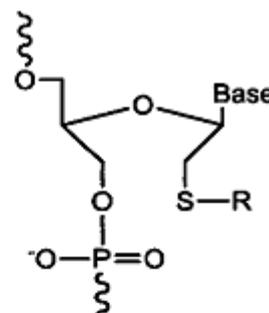
1. Un dúplex de ARN que comprende al menos un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria con un ARNm diana, en el que el oligonucleótido comprende un monómero de 2'-3'-secu-
 5 nucleótido acíclico, en el que el dúplex de ARN disminuye la expresión de un ARNm diana.
2. El dúplex de ARN de la reivindicación 1, en el que el monómero acíclico es un monómero de 2'-3'-secu-
 10 nucleótido que tiene el grupo 2'-hidroxi sustituido en un grupo amino, amino acilado, amino alquilado, amino dialquilado, amino carbamoilado, piperazino, piperazino acilado, piperazino alquilado, piperazino carbamoilado, mercapto, mercapto acilado, mercapto alquilado, disulfuro, hidroxi acilado, hidroxi alquilado o hidroxi carbamoilado.
3. El dúplex de ARN de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el monómero de nucleótido acíclico se selecciona de entre el grupo de monómeros D, F, G, H, I y J:



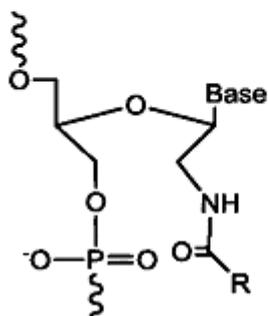
Monómero D



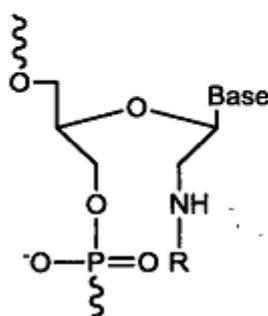
Monómero F



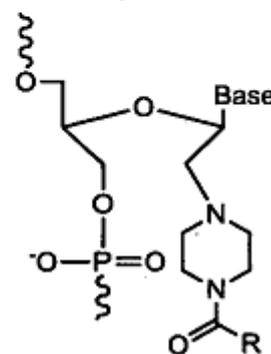
Monómero G



Monómero H



Monómero I

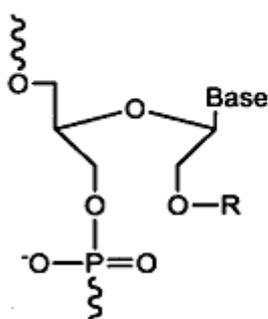


Monómero J

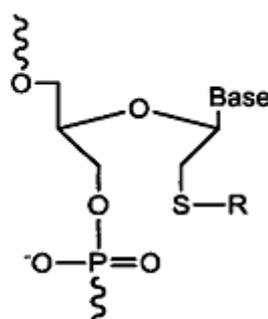
- 15 en los que R se selecciona de entre el grupo que consiste en H, alquilo, derivados de colesterol, fluoróforos, poliaminas, ácidos grasos, aminoácidos, sacáridos o polipéptidos.
- 20 4. El dúplex de ARN de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que el monómero acíclico está situado en la región semilla de la cadena no codificante.
5. El dúplex de ARN de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que comprende al menos un oligonucleótido que comprende de entre 15 a 40 monómeros de nucleótido y un monómero de nucleótido acíclico.
- 25 6. El dúplex de ARN de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que comprende al menos un oligonucleótido que comprende de uno a cinco monómeros de nucleótido acíclico.
- 30 7. El dúplex de ARN de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que comprende al menos un oligonucleótido que comprende menos de cuatro monómeros de ADN consecutivos y un monómero de nucleótido acíclico.
8. El dúplex de ARN de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 que comprende al menos un oligonucleótido que comprende más de un 50 % de monómeros de ARN y un monómero de nucleótido acíclico.
- 35 9. El dúplex de ARN de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 que comprende al menos un oligonucleótido que

comprende un monómero de nucleótido acíclico y un análogo de nucleótido seleccionado de entre monómeros de 2'-O-alkil-ARN, monómeros de 2'-amino-ADN, monómeros de 2'-fluoro-ADN, monómeros de LNA, monómeros de PNA, monómeros de HNA, monómeros de ANA, monómeros de FANA, monómeros de CeNA, monómeros de ENA, monómeros de ADN y monómeros de INA.

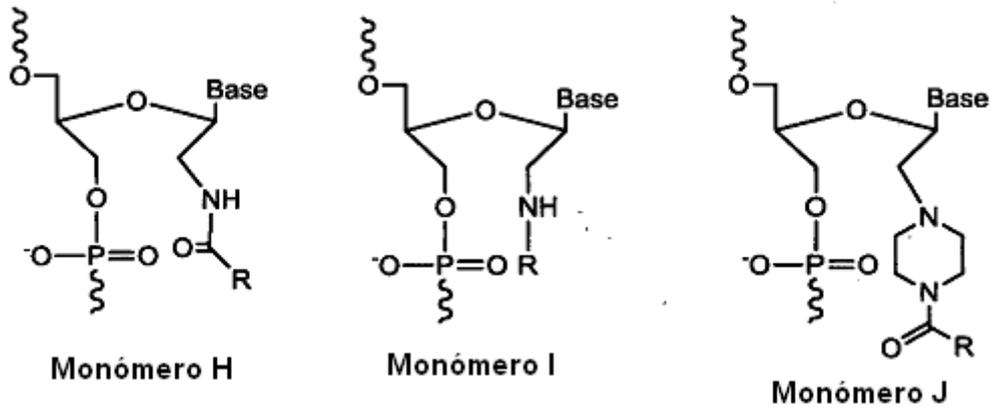
- 5 10. El dúplex de ARN de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 que comprende al menos un oligonucleótido que comprende un monómero de nucleótido acíclico y al menos dos análogos de nucleótido de LNA.
- 10 11. El dúplex de ARN de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 que comprende al menos un oligonucleótido que comprende un monómero de nucleótido acíclico y un enlace fosforotioato o un enlace boranofosfato.
- 15 12. El dúplex de ARN de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en las que el dúplex de ARN es capaz de mediar la represión de la traducción dependiente de RISC o la degradación de la complementariedad de los ARNm diana al oligonucleótido.
13. El dúplex de ARN de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 que comprende un número de pares de bases de entre 15 a 40; o que comprende un número de pares de bases de entre 14 a 26 pares de bases.
- 20 14. El dúplex de ARN de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que comprende al menos un saliente preferentemente al menos un saliente en la posición 3'.
15. El dúplex de ARN de la reivindicación 14, en el que la longitud del saliente es de entre 1 a 14 nucleótidos.
- 25 16. El dúplex de ARN de cualquiera de las reivindicaciones 1-15 que comprende adicionalmente al menos un saliente de la cadena no codificante que comprende al menos un monómero acíclico.
17. El dúplex de ARN de cualquiera de las reivindicaciones 1-16 que comprende al menos un extremo romo.
- 30 18. El dúplex de ARN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en las que el dúplex de ARN comprende un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un ARNm diana en el que el dúplex de ARN disminuye la expresión del ARNm diana.
- 35 19. Un oligonucleótido que comprende un monómero acíclico, en el que el oligonucleótido disminuye la expresión de un ARNm diana y en el que el monómero acíclico es un monómero de 2'-3'-seco-nucleótido que tiene el grupo 2'-hidroxi sustituido en un grupo amino, amino acilado, amino alquilado, amino dialquilado, amino carbamoilado, piperazino, piperazino acilado, piperazino alquilado, piperazino carbamoilado, mercapto, mercapto acilado, mercapto alquilado, disulfuro, hidroxilado, hidroxilado alquilado o hidroxilado carbamoilado.
- 40 20. Un oligonucleótido que comprende un monómero acíclico seleccionado de entre el grupo de monómeros F, G, H, I y J:



Monómero F



Monómero G



en el que el oligonucleótido disminuye la expresión de un ARNm diana y R es alquilo, derivado de colesterol, un fluoróforo, una poliamina, un ácido graso, un aminoácido, un sacárido, o un polipéptido.

- 5
21. Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido de la reivindicación 19 o la reivindicación 20, o un dúplex de ARN de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, y un diluyente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 10
22. El dúplex de ARN de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18 para uso en la disminución del nivel de expresión de un ARNm diana en una célula.
23. El dúplex de ARN de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18 para uso en el tratamiento de enfermedad.
- 15
24. El dúplex de ARN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-18, para uso en regulación genética guiada por ARN o análisis genético; preferentemente para uso en ARN de interferencia.

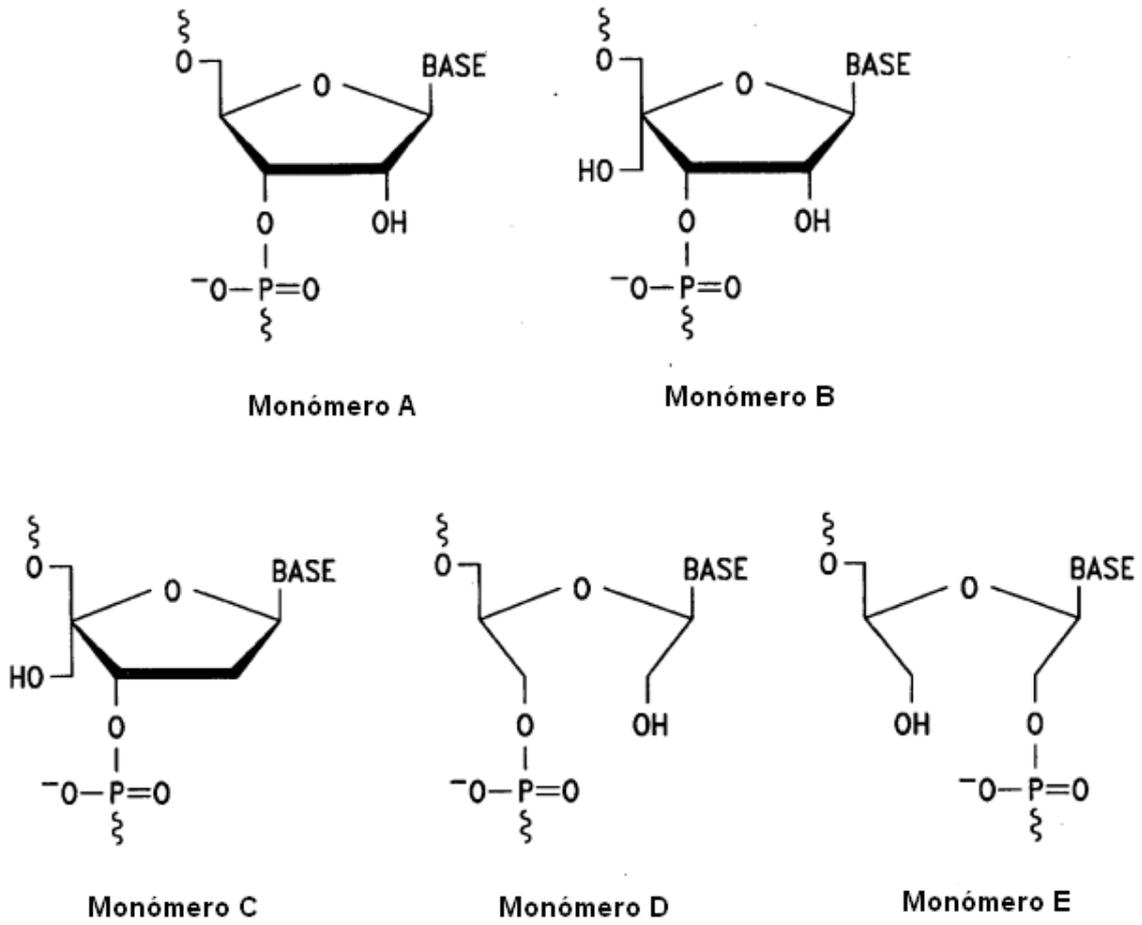
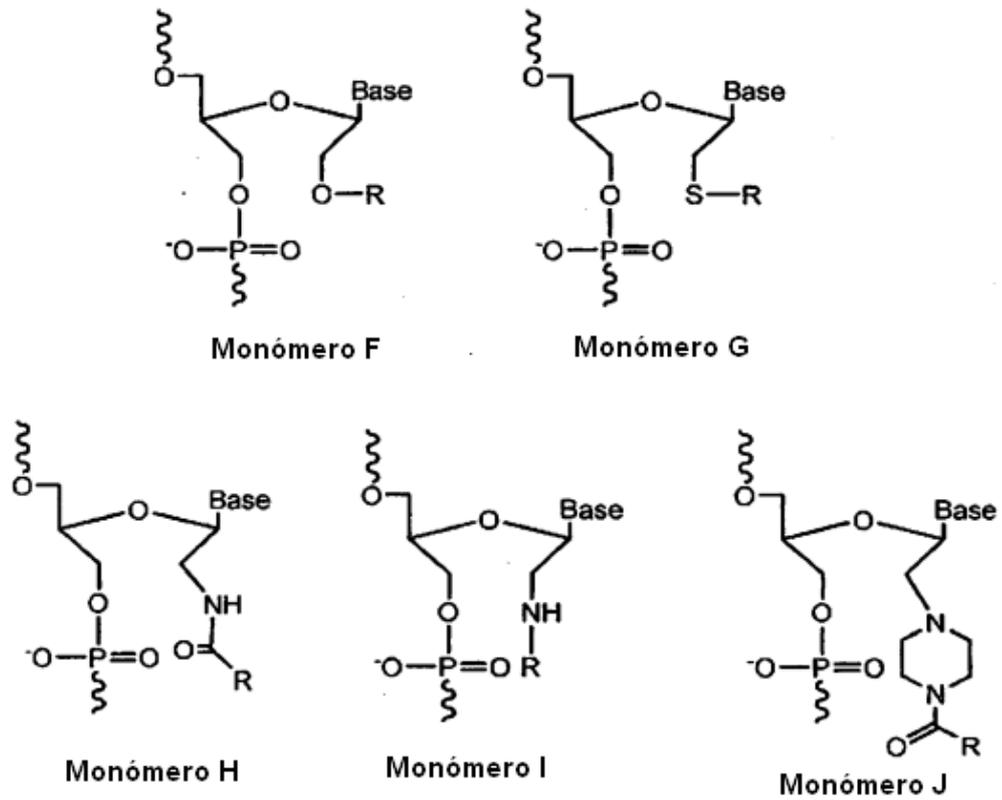


Fig. 1



R = hidrógeno, alquilo, derivado de colesterol, fluoróforo, poliamina, ácido graso, aminoácido, sacárido, o polipéptido

Fig. 2

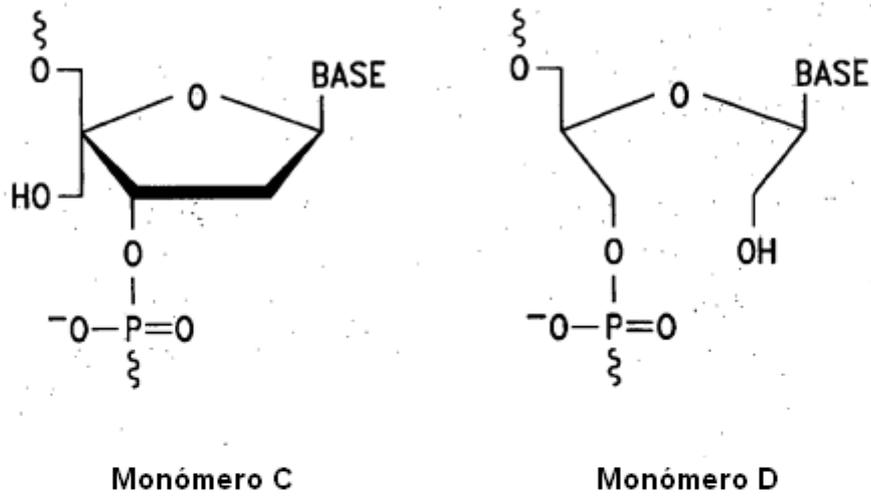
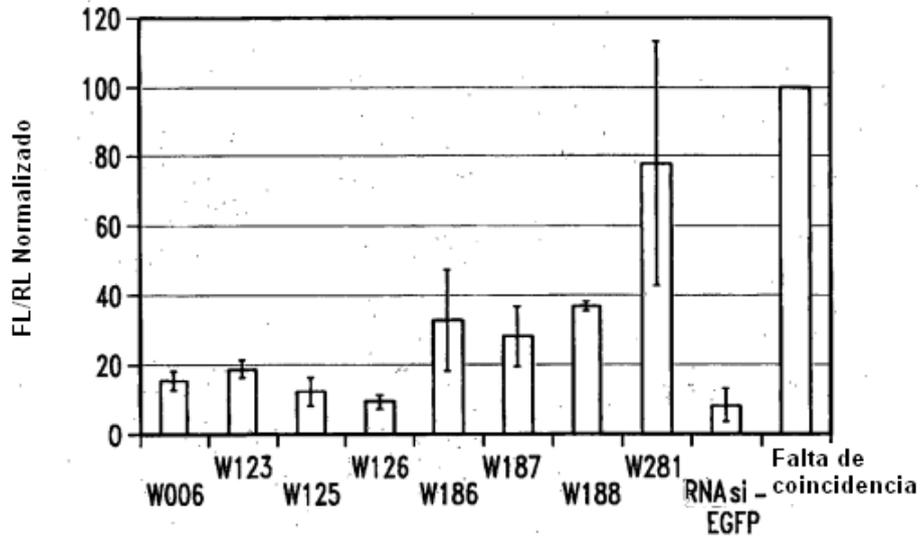
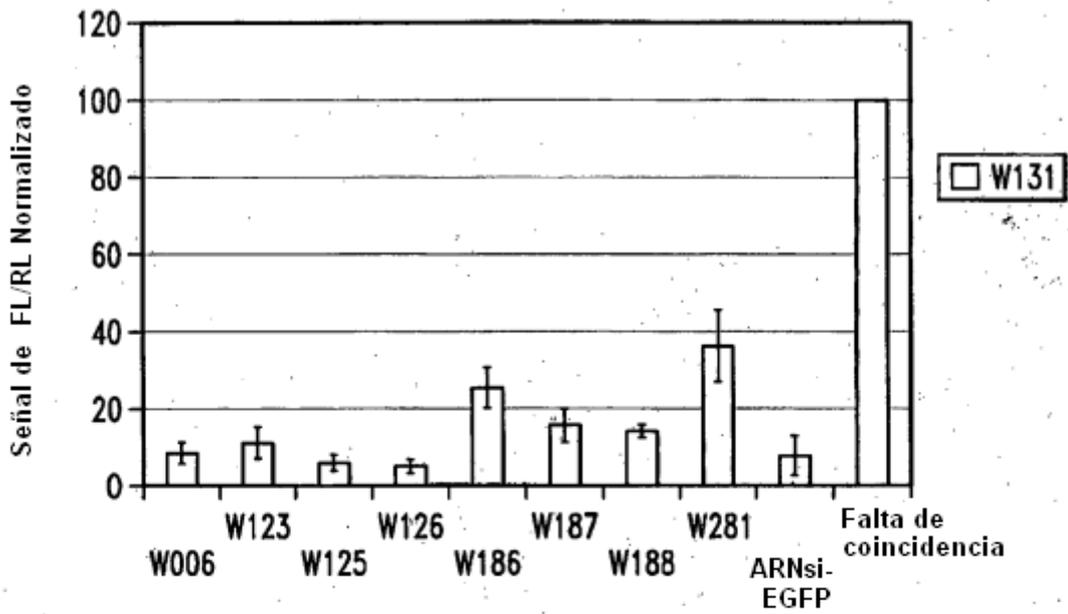


Fig. 3



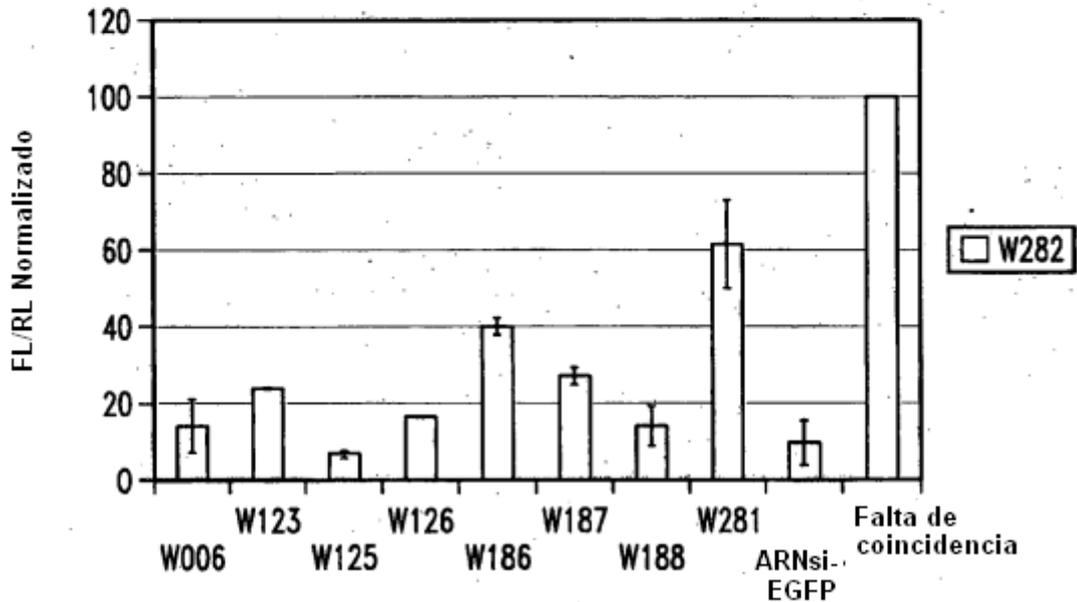
Cadena No Codificante W006: 5' - ACUUGUGGCCGUUUACGUCG^LC^LU (SEQ ID NO: 1)
 Cadena No Codificante W123: 5' - ACUUGXGGCCGUUUACGUCG^LC^LU (SEQ ID NO:)
 Cadena No Codificante W125: 5' - ACUUGUGGCCGUUUACGXCG^LC^LU (SEQ ID NO:)
 Cadena No Codificante W126: 5' - ACUUGUGGCCGXUUACGUCG^LC^LU (SEQ ID NO:)
 Cadena No Codificante W186: 5' - ACUUGXGGCCGXUUACGXCG^LC^LU (SEQ ID NO:)
 Cadena No Codificante W187: 5' - ACUUGXGGCCGXUUACGUCG^LC^LU (SEQ ID NO:)
 Cadena No Codificante W188: 5' - ACT^LUGT^LGGCCGXUT^LCACGT^LCG^LC^LU (SEQ ID NO: 4)
 Cadena No Codificante W281: 5' - ACUUGUXGCCGUUUXCGUCGXU (SEQ ID NO:)
 Cadena Codificante W130: 5' - GACGXAAACXGCCACAAGGUT^LC^LU (SEQ ID NO:)

Fig. 4



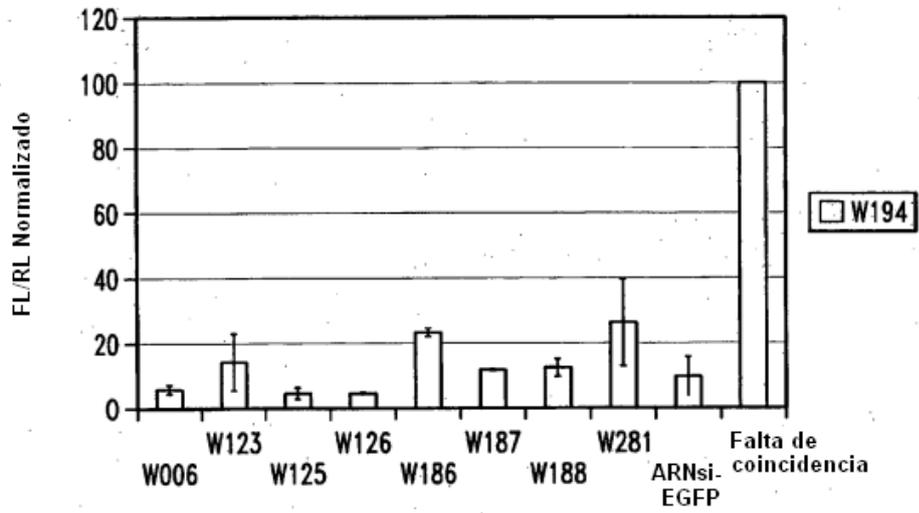
Cadena Codificante W131: 5' - ACGUAAACGGCCACAAGUUXU (SEQ ID NO: 1)

Fig. 5



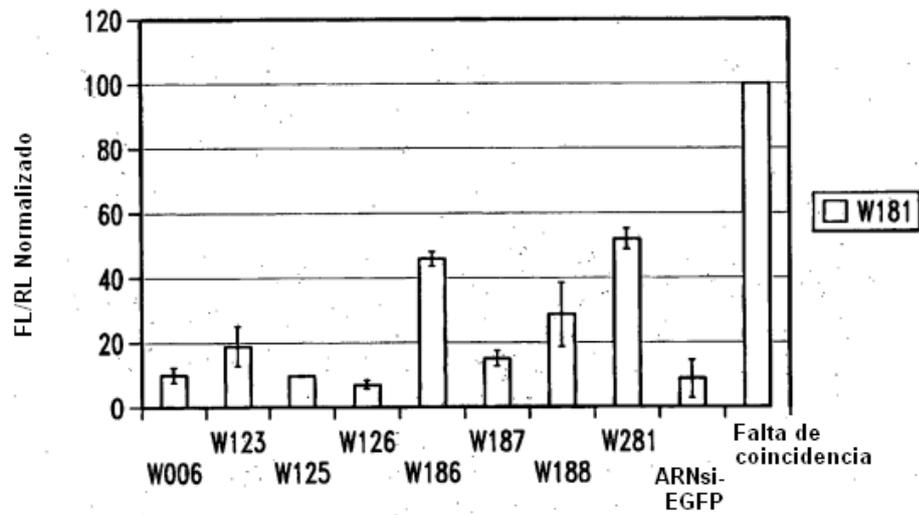
Cadena Codificante W282: 5' - GAXGUAAACGGCCACAXGUUXU (SEQ ID NO: 11)

Fig. 6



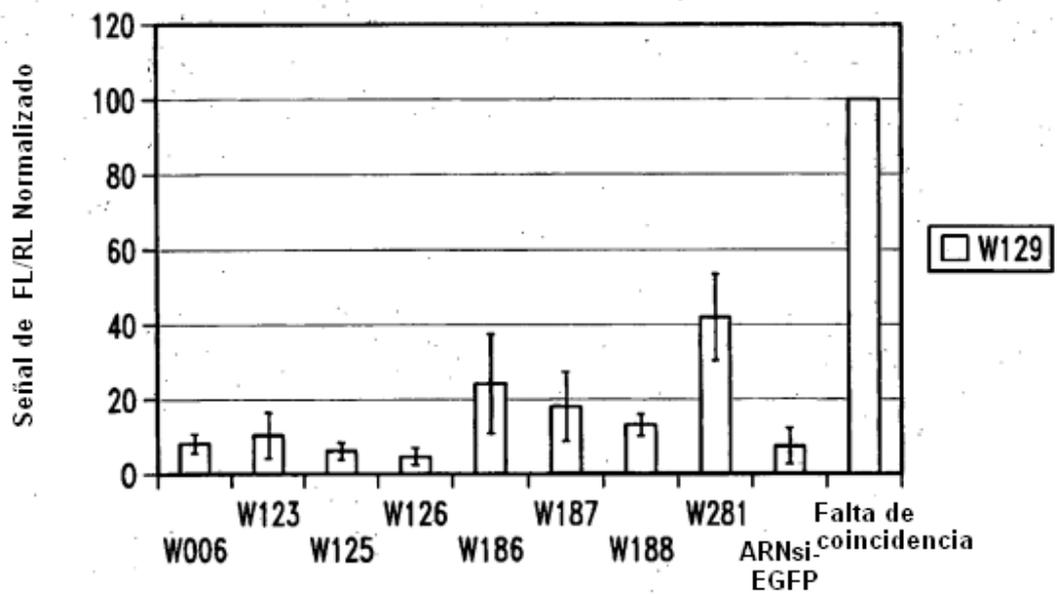
Cadena Codificante W194: 5' - GACGUAACGGCCACAAGGUT^LC^LU (SEQ ID NO:)

Fig. 7



Cadena Codificante W181: 5' - GAC^LGUAAC^LGGCC^LAC^LAAGGUT^LC^L(SEQ ID NO:)

Fig. 8



Cadena Codificante W129: 5' - GACGAAAACGGCCACAAGUT^LC^LU (SEQ ID NO:)

Fig. 9