

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 996**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C07C 225/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.12.2012 PCT/JP2012/084247**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.07.2013 WO13103146**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2012 E 12864101 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2801617**

54 Título: **Molécula de ácido nucleico monocatenario que tiene una cadena principal de aminoácidos**

30 Prioridad:

07.01.2012 JP 2012001711
09.02.2012 JP 2012026745

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

OHGI, TADAAKI;
SUZUKI, HIROSHI;
HAMASAKI, TOMOHIRO y
AOKI, ERIKO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 645 996 T3

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

DESCRIPCIÓN

Molécula de ácido nucleico monocatenario que tiene una cadena principal de aminoácidos

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico monocatenario que inhibe la expresión genética. Más particularmente, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico monocatenario que tiene una cadena principal de aminoácidos, una composición que contiene a la misma y al uso de la misma.

Antecedentes de la técnica

10 Como técnica para inhibir la expresión genética, por ejemplo, se conoce el ARN de interferencia (ARNi) (Documento de no patente 1). La inhibición de la expresión genética por el ARN de interferencia por lo general se lleva a cabo, por ejemplo, mediante la administración de una molécula de ARN bicatenario corta para una célula o similar. La molécula de ARN bicatenario mencionada anteriormente por lo general se denomina ARNsi (ARN de interferencia pequeño). Se ha informado que la expresión genética también puede ser inhibida por una molécula de ARN circular que tiene una doble hebra formada parcialmente en el mismo por medio de hibridación intermolecular (Documento de Patente 1). El Documento de Patente 2 describe composiciones y métodos para modular la expresión genética usando polinucleótidos precursores asimétricamente activos. El Documento de Patente 3 describe oligonucleótidos de tipo de fibras cortas y fármacos que los comprenden. El Documento de Patente 4 describe composiciones y métodos para modular la expresión genética usando oligonucleótidos autoprotectidos. El Documento de Patente 5 describe moléculas complejas que interfieren con la expresión de genes diana y sus métodos de preparación. El Documento de No Patente 2 describe la síntesis, estructura y actividad biológica de los ARN nanocirculares con forma de pesa para el ARN de interferencia.

[Listado de Documentos]

[Documento de no patente]

Documento de no patente 1: Fire *et al.*, Nature, 19 de Feb de 1998; 391 (6669) :806-11

25 Documento de no patente 2: Abe et al., Bioconjugate Chemistry, 19 de Oct de 2011; 22 (10) : 2082-92 [documento de patente]

Documento de patente 1: US-A-2004-058886

Documento de patente 2: WO-2009-076321

Documento de patente 3: US-2006-0276421

Documento de patente 4: US-2009-0005332

30 Documento de patente 5: US-2010-0317714.

Compendio de la Invención**Problemas a resolver por la invención**

Sin embargo, en cada una de las técnicas mencionadas anteriormente, las moléculas de ARN para inducir la inhibición de la expresión genética tienen los problemas que siguen a continuación.

35 En primer lugar, para producir el ARNsi mencionado anteriormente, es necesario sintetizar una hebra sentido y una hebra antisentido por separado e hibridar estas hebras al final del proceso. Por lo tanto, existe un problema de baja eficacia de fabricación. Además, cuando el ARNsi mencionado anteriormente se administra a una célula, es necesario administrar el ARNsi a la célula mientras se reprime la disociación a los ARN de una sola hebra, lo que requiere una laboriosa tarea de establecer las condiciones para la manipulación del ARNsi. La molécula de ARN circular presenta el problema de que su síntesis es difícil.

40 Estas moléculas de ARN están formadas básicamente por restos de nucleótidos. En la actualidad, para impartir una cierta función o para etiquetar las moléculas de ARN mencionadas anteriormente, no hay ningún otro modo más que modificar, por ejemplo, cualquiera de los componentes, es decir, una base, un resto de azúcar, o un grupo fosfato, del resto(s) de nucleótidos. Por lo tanto, en el desarrollo de productos farmacéuticos y similares utilizando ARN de interferencia, es muy difícil alterar las moléculas de ARN para impartir una función adicional a los mismos o para etiquetarlos a la vez que mantienen su función de inhibición de la expresión genética.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una nueva molécula de ácido nucleico que se pueda producir de forma fácil y eficaz y que pueda inhibir la expresión genética.

Medios para resolver los problemas

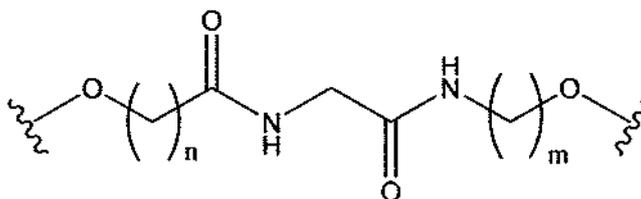
5 Para conseguir el objeto mencionado anteriormente, la molécula de ácido nucleico de la presente invención es una molécula de ácido nucleico monocatenario que comprende una secuencia inhibidora de la expresión que inhibe la expresión de un gen diana, y que comprende la región (X), la región (Y), la región conectora (Lx), la región conectora (Ly), la región (Xc) y la región (Yc), en donde

la región conectora (Lx) está unida entre la región (X) y la región (Xc),

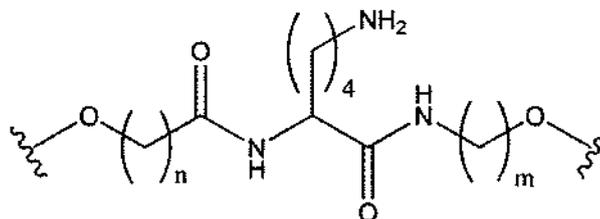
la región conectora (Ly) está unida entre la región (Y) y la región (Yc),

la región (Xc) es complementaria a la región (X), la región (Yc) es complementaria a la región (Y), una región interna (Z) está formada por la región (X) y la región (Y) que están unidas entre sí,

10 al menos una de la región (Z), la región (Xc) y la región (Yc) contiene la secuencia inhibidora de la expresión, y la región conectora (Lx) y la región conectora (Ly) están representadas por la siguiente fórmula (I-1) o (I-4) en donde n es un número entero de 0 a 30 y m es un número entero de 0 a 30:



(I - 1)



(I - 4)

15 opcionalmente en donde,

(i) en la fórmula (I-1), n = 11 y m = 12;

(ii) en la fórmula (I-1), n = 5 y m = 4; o

(iii) en la fórmula (I-4), n = 5 y m = 4.

20 En la presente memoria también se describe una molécula de ácido nucleico monocatenario que contiene una secuencia inhibidora de la expresión que inhibe la expresión de un gen diana, y que contiene la región (X), la región conectora (Lx) y la región (Xc), en donde la región conectora mencionada anteriormente (Lx) está unida entre la región mencionada anteriormente (X) y la región mencionada anteriormente (Xc), la región mencionada anteriormente (Xc) es complementaria a la región mencionada anteriormente (X), al menos una de la región mencionada anteriormente (X) y la región mencionada anteriormente (Xc) contiene la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente, y la región conectora mencionada anteriormente (Lx) contiene un grupo atómico obtenido a partir de un aminoácido.

La primera composición de la presente invención es una composición para inhibir la expresión de un gen diana, y de forma característica contiene la molécula de ácido nucleico monocatenario de la presente invención mencionada anteriormente.

30 La segunda composición de la presente invención es una composición farmacéutica que de forma característica contiene la molécula de ácido nucleico monocatenario de la presente invención mencionada anteriormente.

El método para inhibir la expresión de la presente invención es un método *in vitro* para inhibir la expresión de un gen diana, que de forma característica usa la molécula de ácido nucleico monocatenario de la presente invención

mencionada anteriormente.

El método de inducción de la expresión de la presente invención es un método *in vitro* para inducir ARN de interferencia que inhibe la expresión del gen diana, en donde se emplea la molécula de ácido nucleico monocatenario de la presente invención mencionada anteriormente.

- 5 La invención incluye una molécula de ácido nucleico monocatenario de la invención para su uso en un método para tratar una enfermedad. El método incluye una etapa de administración de la molécula de ácido nucleico a un paciente, en donde la molécula de ácido nucleico tiene, como secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente, una secuencia que inhibe la expresión de un gen produciendo la enfermedad mencionada anteriormente.

10 Efecto de la invención

La molécula de ácido nucleico monocatenario de la presente invención puede inhibir la expresión genética. Dado que no es circular, su síntesis es fácil. Dado que se trata de una sola hebra que no requiere una etapa de hibridación para una doble hebra, se puede producir de forma eficaz. Además, dado que la región conectora mencionada anteriormente contiene el resto no nucleotídico mencionado anteriormente, por ejemplo, la alteración convencional de un resto de nucleótido no es la opción limitada pero, por ejemplo, también es posible una alteración tal como la modificación de la región conectora mencionada anteriormente y similares.

Los inventores de la presente invención fueron los que descubrieron en primer lugar que la expresión genética se puede inhibir según la estructura de la molécula de ácido nucleico monocatenario de la presente invención. Se especula que el efecto inhibidor de la expresión genética de la molécula de ácido nucleico monocatenario de la presente invención está causado por un fenómeno similar al del ARN de interferencia. Sin embargo, se debe observar que la inhibición de la expresión genética en la presente invención no está limitada ni restringida por el ARN de interferencia.

Breve descripción de las figuras

25 FIG. 1 muestra vistas esquemáticas que ilustran un ejemplo de la molécula de ácido nucleico monocatenario de la presente descripción.

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

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

30 FIG. 4 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión genética de GAPDH en el Ejemplo de la presente invención.

FIG. 5 muestra el ARNss usado en un Ejemplo de Referencia.

FIG. 6 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión genética de GAPDH en un Ejemplo de Referencia.

FIG. 7 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión genética de TGF- β 1 en un Ejemplo de Referencia.

35 FIG. 8 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen LAMA en un Ejemplo de Referencia.

FIG. 9 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen LMNA en un Ejemplo de Referencia.

FIG. 10 muestra el ARNss usado en un Ejemplo de Referencia.

FIG. 11 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión genética de GAPDH en un Ejemplo de Referencia.

40 Fig. 12 es un gráfico que muestra el efecto inhibidor de la expresión del gen de luciferasa de luciérnaga (actividad relativa de luciferasa) de la línea de células MCF-7 de cáncer de mama expresa de forma estable la luciferasa de luciérnaga (pGL3 Luc) en el Ejemplo de la presente invención.

Descripción de realizaciones

45 A menos que se especifique de otro modo, los términos usados en la presente memoria descriptiva hacen referencia a lo que por lo general se refieren en la técnica.

1. Molécula de ssPN

La molécula de ácido nucleico monocatenario de la presente invención es, como se ha descrito anteriormente, una molécula de ácido nucleico monocatenario que comprende una secuencia inhibidora de la expresión que inhibe la

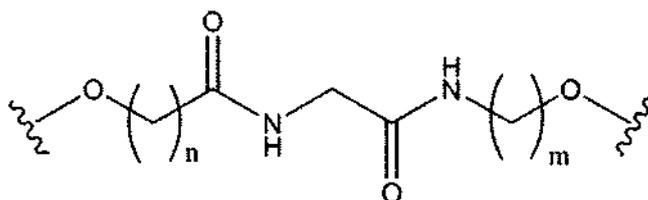
expresión de un gen diana, y que comprende la región (X), la región (Y), la región conectora (Lx), la región conectora (Ly), la región (Xc) y la región (Yc), en donde

la región conectora (Lx) está unida entre la región (X) y la región (Xc),

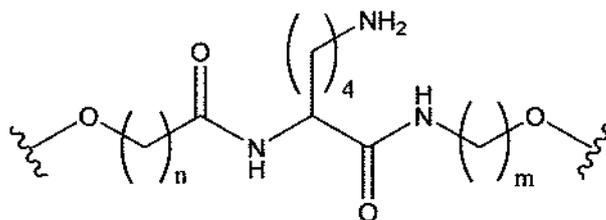
la región conectora (Ly) está unida entre la región (Y) y la región (Yc),

- 5 la región (Xc) es complementaria a la región (X), la región (Yc) es complementaria a la región (Y), una región interna (Z) está formada por la región (X) y la región (Y) que están unidas entre sí,

al menos una de la región (Z), la región (Xc) y la región (Yc) contiene la secuencia inhibidora de la expresión, y la región conectora (Lx) y la región conectora (Ly) están representadas por la siguiente fórmula (I-1) o (I-4) en donde n es un número entero de 0 a 30 y m es un número entero de 0 a 30:



(I - 1)



(I - 4)

10

opcionalmente en donde,

(i) en la fórmula (I-1), n = 11 y m = 12;

(ii) en la fórmula (I-1), n = 5 y m = 4; o

(iii) en la fórmula (I-4), n = 5 y m = 4.

- 15 En la presente memoria también se describe una molécula de ácido nucleico monocatenario que contiene una secuencia inhibidora de la expresión que inhibe la expresión de un gen diana, y que contiene la región (X), la región conectora (Lx) y la región (Xc), en donde la región conectora mencionada anteriormente (Lx) está unida entre la región mencionada anteriormente (X) y la región mencionada anteriormente (Xc), la región mencionada anteriormente (Xc) es complementaria a la región mencionada anteriormente (X), al menos una de la región mencionada anteriormente (X) y la región mencionada anteriormente (Xc) contiene la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente, y la región conectora mencionada anteriormente (Lx) contiene un grupo atómico obtenido a partir de un aminoácido.

25 En la presente invención, "inhibición de la expresión de un gen diana" se refiere, por ejemplo, a la inhibición de la expresión del gen diana mencionado anteriormente. El mecanismo a través del cual se consigue la inhibición mencionada anteriormente no está limitado en particular, y puede ser, por ejemplo, regulación negativa o silenciamiento. La inhibición mencionada anteriormente de la expresión del gen diana se puede verificar, por ejemplo, mediante una disminución de la cantidad aductor de transcripción obtenido a partir del gen diana; una disminución de la actividad del producto de transcripción mencionado anteriormente; una disminución de la cantidad de un producto de traducción generado a partir del gen diana mencionado anteriormente; una disminución de la actividad del producto de traducción mencionado anteriormente; o similares. Las proteínas mencionadas anteriormente pueden ser, por ejemplo, proteínas maduras, proteínas precursoras antes de ser sometidas a procesamiento o modificación después de la traducción, o similares.

35 En lo sucesivo en la presente memoria, la molécula de ácido nucleico monocatenario de la presente invención también se puede denominar "molécula de ssPN" de la presente invención. La molécula de ssPN de la presente invención se puede usar para inhibir, por ejemplo, la expresión de un gen diana *in vivo* o *in vitro* y también se puede denominar "molécula de ssPN para inhibir la expresión de un gen diana" o "inhibidor de la expresión de un gen

diana". Además, la molécula de ssPN de la presente invención puede inhibir la expresión del gen diana mencionado anteriormente, por ejemplo, mediante ARN de interferencia, y también se puede denominar "molécula de ssNP para ARN de interferencia", "molécula de ssPN para inducir ARN de interferencia", o "ARN de agente de interferencia o agente inductor de ARN de interferencia". La presente invención también puede inhibir, por ejemplo, un efecto secundario tal como la inducción con interferón.

En la molécula de ssPN de la presente invención, el extremo en la posición 5' y el extremo en la posición 3' no están unidos entre sí. Por lo tanto, la molécula de ssPN de la presente invención también se puede denominar "molécula de ácido nucleico monocatenario lineal".

En la molécula de ssPN de la presente invención, la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente es una secuencia que presenta, por ejemplo, una actividad de inhibición de la expresión mencionada anteriormente de un gen diana cuando la molécula de ssPN de la presente invención se introduce en una célula *in vivo* o *in vitro*. La secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente no está limitada en particular, y se puede establecer como apropiada dependiendo del tipo de gen diana. Como secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente, por ejemplo, una secuencia implicada en el ARN de interferencia producida por ARNsi se puede usar como apropiada. Por lo general, el ARN de interferencia es un fenómeno en el que un ARN bicatenario largo (ARNds) se extingue en una célula con Dicer para producir un ARN bicatenario (ARNsi: ARN de interferencia pequeño) formado por aproximadamente 19 a 21 pares de bases y que tiene un extremo en la posición 3' que se proyecta, y uno de los ARN monocatenarios se une a un ARNm diana para degradar el ARNm mencionado anteriormente, mediante se inhibe lo cual la traducción del ARNm. Dado que la secuencia del ARN monocatenario del ARNsi mencionado anteriormente se une al ARNm diana mencionado anteriormente, por ejemplo, se ha informado de diversos tipos de secuencias para diversos tipos de genes diana. En la presente invención, por ejemplo, la secuencia del ARN monocatenario del ARNsi mencionado anteriormente se puede usar como la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente.

Se debería indicar que el objeto de la presente invención no es la información de secuencias de la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente para el gen diana mencionado anteriormente, sino, por ejemplo, la estructura de una molécula de ácido nucleico que permita la función de la actividad inhibidora de la expresión del gen diana mencionada anteriormente debido a la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente en una célula. Por lo tanto, en la presente invención, no solamente se pueden usar las secuencias del ARN monocatenario del ARNsi conocido en el momento de la presentación de la presente solicitud sino también secuencias que se podrían identificar en él, por ejemplo, como la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente.

La secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente es complementaria, por ejemplo, preferiblemente en al menos un 90 %, más preferiblemente complementaria en un 95 %, aún más preferiblemente complementaria en un 98 %, y de forma particularmente preferible complementaria en un 100 % con una región determinada del gen diana mencionado anteriormente. Cuando se satisface tal complementariedad, por ejemplo, un efecto colateral se puede reducir suficientemente.

Como ejemplos específicos, cuando el gen diana es un gen GAPDH como secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente se puede usar, por ejemplo, una secuencia con una longitud de 19 bases mostrada como SEQ ID NO: 5. Cuando el gen diana es TGF- β 1, como secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente se puede usar, por ejemplo, una secuencia con una longitud de 21 bases mostrada como SEQ ID NO: 15; cuando el gen diana es un gen LAMA1, como secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente se puede usar, por ejemplo, una secuencia con una longitud de 19 bases mostrada como SEQ ID NO: 16; y cuando el gen diana es un gen LMNA, se puede usar, por ejemplo, una secuencia con una longitud de 19 bases mostrada como SEQ ID NO: 17.

5'-GUUGUCAUACUUCUCAUGG-3' (SEQ ID NO: 5)

5'-AAAGUCAUGUACAGCUGCUU-3' (SEQ ID NO: 15)

5'-AUUGUAACGAGACAAACAC-3' (SEQ ID NO: 16)

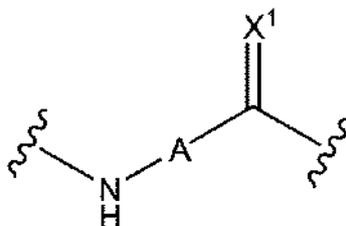
5'-UUGCGCUUUUJGGUGACGC-3' (SEQ ID NO: 17)

Se especula que la inhibición de la expresión de un gen diana mencionada anteriormente por la molécula de ssPN de la presente invención se consigue, por ejemplo, con ARN de interferencia. Sin embargo, se debería indicar que la presente invención no está limitada al monóculo por este mecanismo. A diferencia del denominado ARNsi, por ejemplo, la molécula de ssPN de la presente invención no se introduce en una célula o similares en forma de ARNds formado por los ARN monocatenarios, y no siempre es necesario escindir la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente en la célula. Por lo tanto, se puede decir, por ejemplo, que la molécula de ssPN de la presente invención presenta una función similar a la del ARN de interferencia.

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

Cada una de las regiones conectoras mencionadas anteriormente que se describen en la presente memoria puede estar formada, por ejemplo, el resto(s) no nucleotídico que tiene solamente la estructura no nucleotídica mencionada anteriormente, o puede contener el resto(s) no nucleotídico que tiene la estructura no nucleotídica mencionada anteriormente y el resto(s) de nucleótido.

- 5 En la región conectora mencionada anteriormente que se describe en la presente memoria, aunque el "grupo atómico obtenido a partir de un aminoácido" mencionado anteriormente no está limitada en particular, este es, por ejemplo, un grupo atómico representado por la siguiente fórmula (IA).

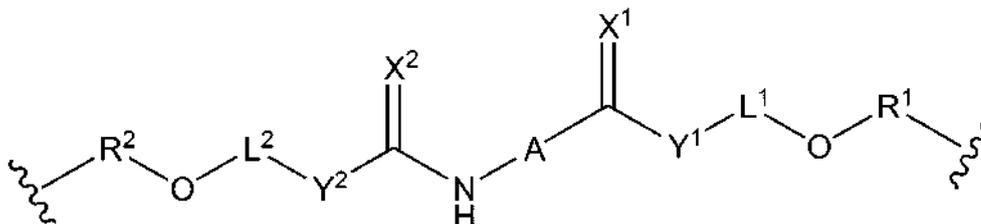


(I A)

En la fórmula mencionada anteriormente (IA), por ejemplo, X¹ es H₂, O, S o NH, y

- 10 el grupo atómico A es opcional pero no contiene un enlace peptídico.

En la molécula de ssPN de la presente descripción, la región conectora mencionada anteriormente está representada, por ejemplo, con la siguiente fórmula (I):



(I)

En la fórmula mencionada anteriormente (I), por ejemplo, en la que:

- 15 X¹ y X² son cada uno independientemente H₂, O, S o NH;
 Y¹ e Y² son cada uno independientemente un enlace sencillo, CH₂, NH, O, o S;
 L¹ es una cadena de alquileo que tiene n átomos de carbono, y un átomo de hidrógeno en un átomo de carbono de alquileo que puede estar o no sustituido con OH, OR^a, NH₂, NHR^a, NR^aR^b, SH, o SR^a, o,
 20 L¹ es una cadena de poliéter obtenida por sustitución de al menos un átomo de carbono en la cadena de alquileo mencionada anteriormente con un átomo de oxígeno,
 con la condición de que: cuando Y¹ es NH, O, o S, un átomo unido a Y¹ en L¹ es carbono, un átomo unido a OR¹ en L¹ es carbono, y los átomos de oxígeno son adyacentes entre sí;
 L² es una cadena de alquileo que tiene m átomos de carbono, y un átomo de hidrógeno en un átomo de carbono de alquileo que puede estar o no sustituido con OH, OR^c, NH₂, NHR^c, NR^cR^d, SH, o SR^c, o,
 25 L² es una cadena de poliéter obtenida por sustitución de al menos un átomo de carbono en la cadena de alquileo mencionada anteriormente con un átomo de oxígeno,
 con la condición de que: cuando Y² es NH, O, o S, un átomo unido a Y² en L² es carbono, un átomo unido a OR² en L² es carbono, y los átomos de oxígeno son adyacentes entre sí;
 R^a, R^b, R^c, y R^d son cada uno independientemente un sustituyente o un grupo protector;

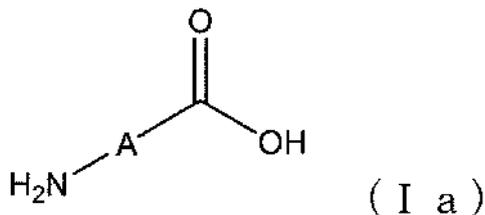
m es un número entero en el intervalo de 0 a 30;

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

las regiones mencionadas anteriormente (Xc) y (X) están cada una unidas a la región conectora mencionada anteriormente (Lx) a través de $-OR^1-$ u $-OR^2-$,

- 5 en donde R^1 y R^2 pueden estar o no estar presentes, y cuando están presentes, R^1 y R^2 son cada uno independientemente un resto de nucleótido o la estructura mencionada anteriormente (I); y

A es cualquier grupo atómico, la siguiente fórmula (Ia) es el aminoácido mencionado anteriormente, y la siguiente fórmula (Ia) es un aminoácido distinto de péptido.



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

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

- 15 En la fórmula mencionada anteriormente (I), L^1 es una cadena de alquileo que tiene n átomos de carbono. Un átomo(s) de hidrógeno en el átomo(s) de carbono de alquileo mencionado anteriormente puede estar o no estar sustituido con, por ejemplo, OH, OR^a , NH_2 , NHR^a , NR^aR^b , SH, o SR^a . Como alternativa, L^1 puede ser una cadena de poliéter obtenida por sustitución de al menos un átomo de carbono en la cadena de alquileo mencionada anteriormente con un átomo de oxígeno. La cadena de poliéter mencionada anteriormente es, por ejemplo, polietilenglicol. Cuando Y^1 es NH, O, o S, un átomo unido a Y^1 en L^1 es carbono, un átomo unido a OR^1 en L^1 es carbono, y los átomos de oxígeno son adyacentes entre sí. Es decir, por ejemplo, cuando Y^1 es O, este átomo de oxígeno y el átomo de oxígeno en L^1 no son adyacentes entre sí, y el átomo de oxígeno en OR^1 y el átomo de oxígeno en L^1 no son adyacentes entre sí.
- 20

- 25 En la fórmula mencionada anteriormente (I), L^2 es una cadena de alquileo que tiene m átomos de carbono. Un átomo(s) de hidrógeno en el átomo(s) de carbono de alquileo mencionado anteriormente puede estar o no estar sustituido con, por ejemplo, OH, OR^c , NH_2 , NHR^c , NR^cR^d , SH, o SR^c . Como alternativa, L^2 puede ser una cadena de poliéter obtenida por sustitución de al menos un átomo de carbono en la cadena de alquileo mencionada anteriormente con un átomo de oxígeno. Cuando Y^2 es NH, O, o S, un átomo unido a Y^2 en L^2 es carbono, un átomo unido a OR^2 en L^2 es carbono, y los átomos de oxígeno son adyacentes entre sí. Es decir, por ejemplo, cuando Y^2 es O, este átomo de oxígeno y el átomo de oxígeno en L^2 no son adyacentes entre sí, y el átomo de oxígeno en OR^2 y el átomo de oxígeno en L^2 no son adyacentes entre sí.
- 30

- n de L^1 y m de L^2 no están limitados en particular, y el límite inferior de cada uno de ellos puede ser 0, por ejemplo, y el límite superior de los mismos no está limitado en particular. Por ejemplo, se puede establecer que n y m son apropiados dependiendo de una longitud deseada de la región conectora mencionada anteriormente (Lx). Por ejemplo, desde el punto de vista del coste de fabricación, rendimiento, y similares, n y m son cada uno preferiblemente de 0 a 30, más preferiblemente de 0 a 20, aún más preferiblemente de 0 a 15. n y m pueden ser iguales ($n = m$) o diferentes. n + m es, por ejemplo, de 0 a 30, preferiblemente de 0 a 20, y más preferiblemente de 0 a 15.
- 35

- 40 Por ejemplo, R^a , R^b , R^c y R^d son cada uno independientemente un sustituyente o un grupo protector, y pueden ser iguales o diferentes. Los ejemplos del sustituyente mencionado anteriormente incluyen hidroxilo, carboxilo, sulfato, halógeno, haluro de alquilo (haloalquilo, p. ej., CF_3 , CH_2CF_3 , CH_2CCl_3), nitro, nitroso, ciano, alquilo (p. ej., metilo, etilo, isopropilo, terc-butilo), alqueno (p. ej., vinilo), alquino (p. ej., etinilo), cicloalquilo (p. ej., ciclopropilo, adamantilo), cicloalquilalquilo (p. ej., ciclohexilmetilo, adamantilmetilo), cicloalqueno (p. ej., ciclopropeno), cicloalquilalquilo (p. ej., hidroxilalquilo (p. ej., hidroximetilo, hidroxietilo), alcoxilalquilo (p. ej., metoximetilo, etoximetilo, etoxietilo), arilo (p. ej., fenilo, naftilo), arilalquilo (p. ej., bencilo, fenetilo), alquilarilo (p. ej., p-metilfenilo), heteroarilo (p. ej., piridilo, furilo), heteroarilalquilo (p. ej., piridilmetilo), heterocicilo (p. ej., piperidilo), heterocicilalqueno, heterocicilalquilo (p. ej., morfollmetilo), alcoxi (p. ej., metoxi, etoxi, propoxi, butoxi), alcoxi halogenado (p. ej., OCF_3), alquenoiloxi (p. ej., viniloxi, aliloxi), ariloxi (p. ej., feniloxi), alquiloxicarbonilo (p. ej., metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, terc-butoxicarbonilo), arilalquiloiloxi (p. ej., benciloxi), amino [alquilamino (p. ej., metilamino, etilamino, dimetilamino), acilamino (p. ej., acetilamino, benzoilamino), arilalquilamino (p. ej., bencilamino, tritilamino), hidroxiamino],
- 50

aminoalquilo (p. ej., aminometilo), alquilaminoalquilo (p. ej., dietilaminometilo), carbamoilo, sulfamoilo, oxo, sililo, sililoxialquilo y similares. Estos sustituyentes están opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes adicionales o grupos protectores adicionales. Aunque el sustituyente adicional mencionado anteriormente no está limitado en particular, por ejemplo, este puede ser un sustituyente usado a modo de ejemplo anteriormente. El grupo protector adicional mencionado anteriormente no está limitado en particular y, por ejemplo, puede ser un grupo protector que se emplea a modo de ejemplo a continuación. En lo sucesivo en la presente memoria del mismo modo.

El grupo protector mencionado anteriormente (o el grupo protector adicional mencionado anteriormente) es un grupo funcional que inactiva, por ejemplo, un grupo funcional altamente reactivo. Los ejemplos del grupo protector incluyen grupos protectores conocidos. El grupo protector mencionado anteriormente, por ejemplo, se describe en la bibliografía (J. F. W. McOmie, "Protecting Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, Londres y Nueva York, 1973). El grupo protector mencionado anteriormente no está limitado en particular, y los ejemplos del mismo incluyen un grupo terc-butildimetilsililo (TBDMS), un grupo bis (2-acetoxietiloxi)metilo (ACE), un grupo triisopropilsililoximetilo (TOM), un grupo 1-(2-cianoetoxi)etilo (CEE), un grupo 2-cianoetoximetilo (CEM), un grupo toilsulfonietoximetilo (TEM), y un grupo dimetoxitritilo (DMTr). Cuando R^3 es OR^4 , el grupo protector mencionado anteriormente no está limitado en particular, y los ejemplos del mismo incluyen un grupo TBDMS, un grupo ACE, un grupo TOM, un grupo CEE, un grupo CEM, y un grupo TEM. Otros ejemplos del grupo protector incluyen grupos que contienen sililo representados por las fórmulas químicas (P1) y (P2) que se mostrarán posteriormente. Lo mismo se aplica en lo sucesivo en la presente memoria.

En la fórmula mencionada anteriormente (I), cada uno de los átomos de hidrógeno puede estar independientemente sustituido con, por ejemplo, un halógeno tal como Cl, Br, F, o I.

Cada una de las regiones mencionadas anteriormente (X_c) y (X) están unidas, por ejemplo, a la región conectora mencionada anteriormente (L_x) a través de $-OR^1-$ u $-OR^2-$. R^1 y R^2 pueden estar o no estar presentes. Cuando R^1 y R^2 están presentes, R^1 y R^2 son cada uno independientemente un resto de nucleótido o la estructura representada por la fórmula mencionada anteriormente (I). Cuando R^1 y/o R^2 son/es el resto de nucleótido mencionado anteriormente, la región conectora mencionada anteriormente (L_x) está formada, por ejemplo, por el resto no nucleotídico mencionado anteriormente que tiene la estructura de la fórmula mencionada anteriormente (I) excluyendo el resto de nucleótido R^1 y/o R^2 , y el resto(s) de nucleótido mencionado anteriormente. Cuando R^1 y/o R^2 son/es la estructura representada con la fórmula mencionada anteriormente (I), la estructura de la región conectora mencionada anteriormente (X_c) es tal que, por ejemplo, dos o más de los restos nucleotídicos mencionados anteriormente que tienen la estructura de la fórmula mencionada anteriormente (I) están unidos entre sí. El número de estructuras de la fórmula mencionada anteriormente (I) puede ser, por ejemplo, 1, 2, 3 o 4. Cuando la región conectora (L_x) incluye una pluralidad de las estructuras mencionadas anteriormente, las estructuras de la fórmula (I) mencionada anteriormente se pueden unir, por ejemplo, ya sea directamente o a través del resto(s) de nucleótido mencionado anteriormente. Por otro lado, cuando R^1 y R^2 no están presentes, la región conectora mencionada anteriormente (L_x) está formada, por ejemplo, por el resto no nucleotídico mencionado anteriormente que tiene la estructura de la fórmula mencionada anteriormente (I) sola.

La combinación de las regiones mencionadas anteriormente (X_c) y (X) con $-OR^1-$ y $-OR^2-$ no está limitada en particular, y puede ser, por ejemplo, cualquiera de las siguientes condiciones.

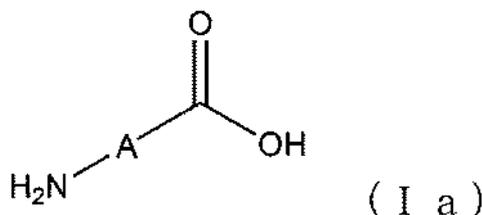
Condición (1):

las regiones mencionadas anteriormente (X_c) y (X) están unidas a la estructura de la fórmula mencionada anteriormente (I) a través de $-OR^2-$ y $-OR^1-$, respectivamente.

Condición (2):

las regiones mencionadas anteriormente (X_c) y (X) están unidas a la estructura de la fórmula mencionada anteriormente (I) a través de $-OR^1-$ y $-OR^2-$, respectivamente.

En la molécula de ssPN de la presente descripción, el grupo atómico A en la fórmula mencionada anteriormente (I) no está limitado en particular y es opcional; sin embargo, es un aminoácido representado con la siguiente fórmula (Ia), que no es un péptido, como se ha mencionado anteriormente.



El grupo atómico A en la fórmula mencionada anteriormente (I), (IA) o (Ia) puede contener o no, por ejemplo, al menos uno seleccionado del grupo que consiste en grupo atómico de cadena, grupo atómico alicíclico, y grupo atómico aromático. Aunque el grupo atómico de cadena mencionado anteriormente no está limitado en particular, se pueden mencionar por ejemplo, alquilo, alqueno, alquino, haloalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, aminoalquilo, sililo, sililoxialquilo y similares. Aunque el grupo atómico alicíclico mencionado anteriormente no está limitado en particular, por ejemplo, se pueden mencionar cicloalquilo, cicloalqueno, cicloalquilalquilo, ciclilalquilo y similares. Aunque el grupo atómico aromático mencionado anteriormente no está limitado en particular, se pueden mencionar por ejemplo, arilo, arilalquilo, alquilarilo, arilo de anillos condensados, arilalquilo de anillos condensados, alquilarilo de anillos condensados y similares. En el grupo atómico A en la fórmula mencionada anteriormente (I), (IA) o (Ia), cada uno de los grupos atómicos mencionados anteriormente pueden tener o no adicionalmente un sustituyente o un grupo protector. Cuando el sustituyente o grupo protector mencionados anteriormente están en pluralidad, estos pueden ser iguales o diferentes. Los sustituyentes mencionados anteriormente son, por ejemplo, los usados a modo de ejemplo para R^a, R^b, R^c y R^d mencionados anteriormente, y de forma más específica, por ejemplo, halógeno, hidróxido, alcoxi, amino, carboxi, sulfato, nitro, carbamoilo, sulfamoilo, alquilo, alqueno, alquino, haloalquilo, arilo, arilalquilo, alquilarilo, cicloalquilo, cicloalqueno, cicloalquilalquilo, ciclilalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, aminoalquilo, sililo, sililoxialquilo, pirrolilo, imidazolilo, y similares. Los grupos protectores mencionados anteriormente son, por ejemplo, los mismos que los usados a modo de ejemplo para R^a, R^b, R^c y R^d mencionados anteriormente.

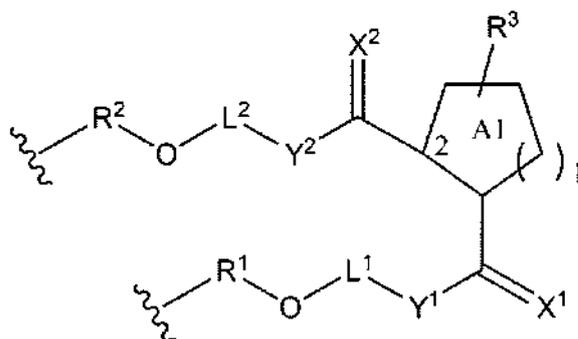
En la presente invención, el "aminoácido" se refiere a cualquier compuesto orgánico que contenga al menos un grupo amino y al menos un grupo carboxi en una molécula. El "péptido" se refiere a un compuesto orgánico que tiene una estructura en donde no menos de 2 moléculas de aminoácido están unidas a través de un enlace peptídico. El enlace peptídico mencionado anteriormente puede ser una estructura de amida ácida o una estructura de imida ácida. Cuando están presentes varios grupos amino en la molécula de aminoácido representada con la fórmula mencionada anteriormente (Ia), el grupo amino mostrado claramente en la fórmula mencionada anteriormente (Ia) puede ser cualquier grupo amino. Además, cuando están presentes varios grupos carboxi en la molécula de aminoácido representada con la fórmula mencionada anteriormente (Ia), el grupo carboxi mostrado claramente en la fórmula mencionada anteriormente (Ia) puede ser cualquier grupo carboxi.

En la región conectora mencionada anteriormente del ácido nucleico monocatenario de la presente invención, el aminoácido mencionado anteriormente puede ser, por ejemplo, un aminoácido natural o un aminoácido artificial. En la presente invención, el "aminoácido natural" se refiere a un aminoácido que tiene una estructura de origen natural o un isómero óptico del mismo. El método de producción del aminoácido natural mencionado anteriormente no está limitado en particular y, por ejemplo, se puede extraer de la naturaleza, o se puede sintetizar. En la presente invención, además, el "aminoácido artificial" se refiere a un aminoácido que tiene una estructura que no se produce de forma natural. Es decir, el aminoácido artificial mencionado anteriormente es un aminoácido, es decir, un derivado del ácido carboxílico que contiene un grupo amino (compuesto orgánico que contiene al menos un grupo amino y al menos un grupo carboxi en una molécula) y que tiene una estructura que no se produce de forma natural. El aminoácido artificial mencionado anteriormente preferiblemente no contiene, por ejemplo, un hetero anillo. El aminoácido mencionado anteriormente puede ser un aminoácido que constituye, por ejemplo, una proteína. El aminoácido mencionado anteriormente puede ser, por ejemplo, glicina, α -alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, cistina, glutamina, ácido glutámico, histidina, isoleucina, leucina, lisina, hidroxilisina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, tirosina, valina, triptófano, β -alanina, 1-amino-2-carboxiciclopentano, o ácido aminobenzoico, y pueden tener o no adicionalmente un sustituyente o un grupo protector. Los ejemplos del sustituyente mencionado anteriormente incluyen los sustituyentes usados a modo de ejemplo para R^a, R^b, R^c y R^d mencionados anteriormente. De forma más específica, por ejemplo, se pueden mencionar halógeno, hidróxido, alcoxi, amino, carboxi, sulfato, nitro, carbamoilo, sulfamoilo, alquilo, alqueno, alquino, haloalquilo, arilo, arilalquilo, alquilarilo, cicloalquilo, cicloalqueno, cicloalquilalquilo, ciclilalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, aminoalquilo, sililo, sililoxialquilo, pirrolilo, imidazolilo, y similares. El grupo protector mencionado anteriormente es el mismo que, por ejemplo, los grupos protectores usados a modo de ejemplo para R^a, R^b, R^c y R^d mencionados anteriormente. Cuando el aminoácido de la fórmula mencionada anteriormente (Ia), que no es péptido, contiene isómeros tales como isómero óptico, isómero geométrico, estereoisómero y similares, se puede usar cualquier isómero.

En la molécula de ssPN de la presente invención, la región conectora mencionada anteriormente (Lx) y la región conectora que se menciona a continuación (Ly) no contienen, por ejemplo, una estructura no nucleotídica que contiene una estructura principal de pirrolidina y una estructura no nucleotídica que contiene una estructura principal de piperidina. Los ejemplos de la estructura principal de pirrolidina mencionada anteriormente incluyen la estructura principal de un derivado de pirrolidina en donde una o más carbonos que constituyen el anillo de 5 miembros de la pirrolidina está/están sustituidos, y los ejemplos del carbono sustituido incluyen átomos de carbono distintos del carbono C-2. El carbono mencionado anteriormente puede estar sustituido, por ejemplo, con nitrógeno, oxígeno o azufre. La estructura principal de pirrolidina mencionada anteriormente puede contener, por ejemplo, un doble enlace carbono-carbono o un doble enlace carbono-nitrógeno en el anillo de 5 miembros de la pirrolidina. En la estructura principal de pirrolidina mencionada anteriormente, el carbono y el nitrógeno que constituyen el anillo de 5 miembros de la pirrolidina pueden estar unidos, por ejemplo, a hidrógeno o al sustituyente mencionado anteriormente. La región conectora mencionada anteriormente (Lx) puede estar unida, por ejemplo, a la región mencionada anteriormente (X) y la región mencionada anteriormente (Xc) a través de cualquier átomo en la estructura principal de pirrolidina mencionada anteriormente. El átomo de la estructura principal de pirrolidina mencionada anteriormente

a unir a la región mencionada anteriormente (X) y la región mencionada anteriormente (Xc) es, por ejemplo, un átomo de carbono cualquiera o un átomo de nitrógeno cualquiera del anillo de 5 miembros mencionado anteriormente. De forma más específica, por ejemplo, se trata del carbono en la posición 2 (C-2) fue nitrógeno del anillo de 5 miembros mencionado anteriormente. Los ejemplos de la estructura principal de pirrolidina mencionada anteriormente incluyen estructura principal de prolina, estructura principal de prolinol y similares. Como estructura principal de piperidina mencionada anteriormente se puede mencionar, por ejemplo, la estructura principal de un derivado de piperidina, en donde uno o más carbonos que constituyen el anillo de 6 miembros de la piperidina están sustituidos. Cuando el carbono está sustituido, este es, por ejemplo, un átomo de carbono distinto del carbono C-2. El carbono mencionado anteriormente puede estar, por ejemplo, sustituido con nitrógeno, oxígeno o azufre. La estructura principal de piperidina mencionada anteriormente también puede contener, por ejemplo, en el anillo de 6 miembros de la piperidina, por ejemplo, un doble enlace carbono-carbono o un doble enlace carbono-nitrógeno. En la estructura principal de piperidina mencionada anteriormente, el carbono y el nitrógeno que constituyen el anillo de 6 miembros de la piperidina se pueden unir, por ejemplo, a un grupo hidrógeno o el sustituyente que se menciona a continuación. La región conectora mencionada anteriormente (Lx) también puede estar unida a, por ejemplo, la región mencionada anteriormente (X) y la región mencionada anteriormente (Xc) a través de cualquier átomo de la estructura principal de piperidina mencionada anteriormente. El átomo de la estructura principal de piperidina mencionada anteriormente a unir a la región mencionada anteriormente (X) y la región mencionada anteriormente (Xc) es, por ejemplo, un átomo cualquiera de carbono o un átomo cualquiera de nitrógeno del anillo de 6 miembros mencionado anteriormente, de forma más específica, por ejemplo, el carbono en la posición 2 (C-2) y el nitrógeno del anillo de 6 miembros mencionado anteriormente.

Como estructura no nucleotídica mencionada anteriormente que contiene una estructura principal de pirrolidina o como estructura no nucleotídica mencionada anteriormente que contiene una estructura principal de piperidina se pueden mencionar, por ejemplo, una estructura representada con la siguiente fórmula (Ib). En la molécula de ssPN de la presente invención, la región conectora mencionada anteriormente (Lx) y la región conectora que se menciona a continuación (Ly) no contienen, por ejemplo, una estructura no nucleotídica que contiene una estructura principal de pirrolidina y una estructura no nucleotídica que contiene una estructura principal de piperidina.



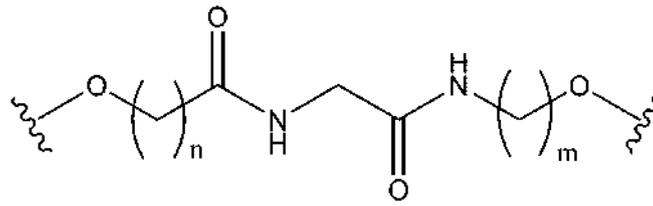
(I b)

En la fórmula mencionada anteriormente (Ib), por ejemplo, X^1 , X^2 , Y^1 , Y^2 , L^1 , L^2 , R^1 y R^2 son como se han definido para la fórmula mencionada anteriormente (I).

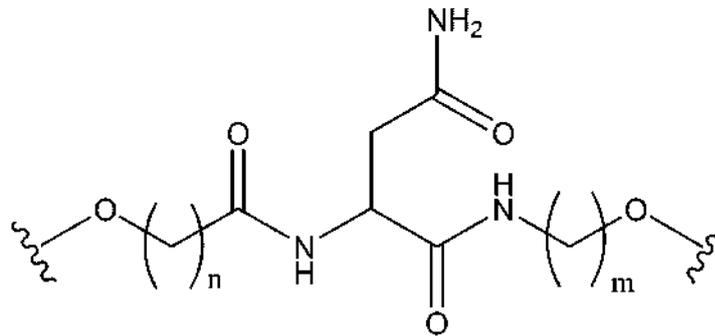
R^3 es un átomo de hidrógeno o sustituyente unido a C-3, C-4, C-5 o C-6 en el anillo A. Cuando R^3 es el sustituyente mencionado anteriormente, el sustituyente R^3 puede ser uno o más, o puede estar ausente. Cuando R^3 está presente en pluralidad, estos pueden ser iguales o diferentes. El sustituyente R^3 es, por ejemplo, halógeno, OH, OR^4 , NHR^4 , NR^4R^5 , SH, SR^4 , grupo oxo (=O) y similares. R^4 y R^5 son, por ejemplo, cada uno independientemente un sustituyente o un grupo protector, y pueden ser iguales o diferentes.

l es 1 o 2; cuando l = 1, el anillo A es un anillo de 5 miembros, por ejemplo, la estructura principal de pirrolidina mencionada anteriormente. La estructura principal de pirrolidina mencionada anteriormente es, por ejemplo, estructura principal de prolina, estructura principal de prolinol o similares, y se emplean a modo de ejemplo mediante las estructuras divalentes de los mismos. Cuando l = 2, el anillo A es un anillo de 6 miembros, por ejemplo, la estructura principal de piperidina mencionada anteriormente. En el anillo A, un átomo de carbono distinto de C-2 en el anillo A puede estar sustituido con nitrógeno, oxígeno o azufre. El anillo A puede contener, en el anillo A, un doble enlace carbono-carbono o un doble enlace carbono-nitrógeno. El anillo A es, por ejemplo, de tipo L o de tipo D. En el anillo A, un átomo de carbono distinto del C-2 mencionado anteriormente en el anillo A puede estar sustituido con nitrógeno, oxígeno o azufre, y puede contener, en el anillo A mencionado anteriormente, un doble enlace carbono-carbono o un doble enlace carbono-nitrógeno.

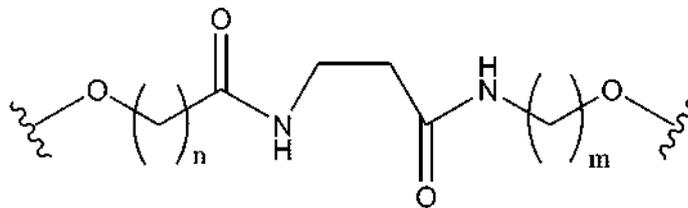
Ejemplos de la estructura de la fórmula mencionada anteriormente (I) incluyen las estructuras de las siguientes fórmulas de la invención, (I-1) e (I-4). En la presente memoria también se describen las fórmulas (I-2) e (I-3). En las siguientes fórmulas, n y m son los mismos que en la fórmula mencionada anteriormente (I).



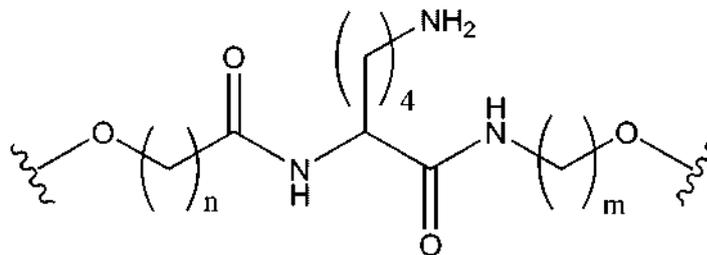
(I - 1)



(I - 2)

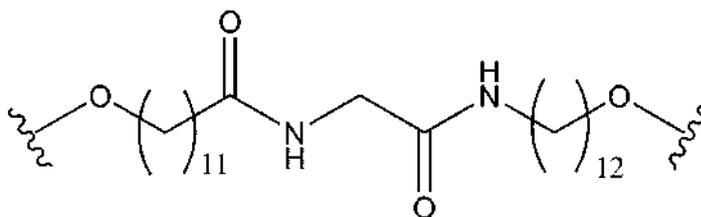


(I - 3)

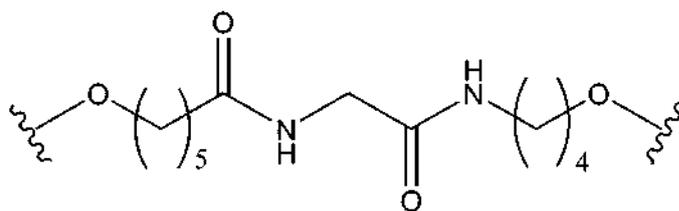


(I - 4)

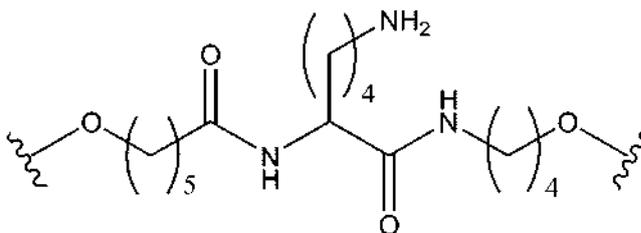
5 En las fórmulas mencionadas anteriormente (I-1) a (I-4), n y m no están limitados en particular, y son como se han descrito anteriormente. Un ejemplo específico de las mismas es la fórmula mencionada anteriormente (I-1) en donde n = 11 y m = 12. La estructura de la misma se muestra con la siguiente fórmula (I-1a). Otro ejemplo específico es la fórmula mencionada anteriormente (I-1) en donde n = 5 y m = 4. La estructura de la misma se muestra con la siguiente fórmula (I-1b). Además otro ejemplo específico es la fórmula mencionada anteriormente (I-4) en donde n = 5 y m = 4. La estructura de la misma se muestra con la siguiente fórmula (I-4a).



(I - 1 a)



(I - 1 b)



(I - 4 a)

5 En la molécula de ssPN de la presente invención, la región mencionada anteriormente (Xc) es complementaria a la región mencionada anteriormente (X). Por lo tanto, en la molécula de ssPN de la presente invención, una doble hebra se puede formar mediante retroplegamiento de la región mencionada anteriormente (Xc) hacia la región (X) y autohibridación de las regiones mencionadas anteriormente (Xc) y (X). La molécula de ssPN de la presente invención puede formar una doble hebra de forma intramolecular como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, la estructura de la molécula de ssPN es totalmente diferente a, por ejemplo, la estructura de un ARN bicatenario obtenido a través de hibridación de dos ARN monocatenarios separados, tal como el ARNsi usado convencionalmente en el ARN de interferencia.

10 En la molécula de ssPN de la presente descripción, por ejemplo, solamente la región mencionada anteriormente (Xc) se puede retroplegar para formar una doble hebra con la región mencionada anteriormente (X), o cualquier otra doble hebra se puede formar en otra región. En lo sucesivo en la presente memoria, la molécula de ssPN anterior, es decir, la molécula de ssPN en la que la formación de la doble hebra se produce en una ubicación se denomina "primera molécula de ssPN", y la molécula de ssPN última, es decir, la molécula de ssPN en la que la formación de la doble hebra se produce en dos ubicaciones se denomina "segunda molécula de ssPN". A continuación se proporcionan ejemplos de la primera y segunda moléculas de ssPN mencionadas anteriormente. Sin embargo, se debería indicar que la presente descripción no se limita a estos ejemplos ilustrativos.

(1) Primera molécula de de ssPN

20 La primera molécula de ssPN mencionada anteriormente es, por ejemplo, una molécula que incluye la región mencionada anteriormente (X), la región mencionada anteriormente (Xc), y la región conectora mencionada anteriormente (Lx).

25 La primera molécula de ssPN mencionada anteriormente puede incluir la región mencionada anteriormente (Xc), la región conectora mencionada anteriormente (Lx), y la región mencionada anteriormente (X) en este orden desde, por ejemplo, el extremo en la posición 5' al extremo en la posición 3', o puede incluir la región mencionada anteriormente (Xc), la región conectora mencionada anteriormente (Lx), y la región mencionada anteriormente (X) en este orden desde el extremo en la posición 3' al extremo en la posición 5'.

- En la primera molécula de ssPN mencionada anteriormente, la región mencionada anteriormente (Xc) es complementaria a la región mencionada anteriormente (X). Solamente es necesario que la región mencionada anteriormente (Xc) tenga una secuencia complementaria a toda la región o parte de la región mencionada anteriormente (X). Preferiblemente, la región mencionada anteriormente (Xc) incluye o está formada por una
- 5 secuencia complementaria a toda la región o parte de la región (X). La región mencionada anteriormente (Xc) puede ser, por ejemplo, perfectamente complementaria a toda la región o parte de la región mencionada anteriormente (X), o una o unas pocas bases en la región (Xc) pueden no ser complementarias a la misma. Preferiblemente, la región (Xc) es perfectamente complementaria a la misma. La expresión "una o unas pocas bases" mencionada anteriormente se refiere a, por ejemplo, de 1 a 3 bases, preferiblemente 1 base o 2 bases.
- 10 En la primera molécula de ssPN mencionada anteriormente, la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente está incluida en al menos una de las regiones mencionadas anteriormente (Xc) y (X), como se ha descrito anteriormente. La primera molécula de ssPN mencionada anteriormente puede incluir, por ejemplo, una secuencia inhibidora de la expresión o dos o más secuencias inhibidoras de la expresión mencionadas anteriormente.
- 15 En el último caso, la primera molécula de ssPN mencionada anteriormente puede incluir, por ejemplo: dos o más secuencias inhibidoras de la expresión idénticas para el mismo gen diana; dos o más secuencias inhibidoras de la expresión diferentes para el mismo gen diana; o dos o más secuencias inhibidoras de la expresión diferentes para diferentes genes diana. Cuando la primera molécula de ssPN mencionada anteriormente incluye dos o más
- 20 secuencias inhibidoras de la expresión mencionadas anteriormente, las posiciones de las respectivas secuencias inhibidoras de la expresión no están limitadas en particular, y pueden estar en una región con diferentes regiones seleccionadas de las regiones mencionadas anteriormente (X) y (Xc). Cuando la primera molécula de ssPN mencionada anteriormente incluye dos o más secuencias inhibidoras de la expresión mencionadas anteriormente para diferentes genes diana, por ejemplo, en la puede inhibir las expresiones de dos o más tipos de diferentes genes diana.
- 25 La FIG. 1 muestra vistas esquemáticas que ilustran un ejemplo de la primera molécula de ssPN mencionada anteriormente. La FIG. 1A es una vista esquemática que muestra un ejemplo del orden de las respectivas regiones en la molécula de ssPN mencionada anteriormente. La FIG. 1B es una vista esquemática que muestra el estado en el que una doble hebra se forma en la molécula de ssPN mencionada anteriormente. Como se muestra en la FIG. 1B, en la molécula de ssPN mencionada anteriormente, una doble hebra se forma entre las regiones mencionadas
- 30 anteriormente (Xc) y (X), y la región Lx mencionada anteriormente tiene una estructura de bucle dependiendo de su longitud. Las vistas esquemáticas mostradas en la FIG. 1 simplemente ilustran el orden en el que las respectivas regiones mencionadas anteriormente están unidas entre sí y la relación posicional de las respectivas regiones que forman la doble hebra, y no limitan, por ejemplo, las longitudes de las respectivas regiones, la forma de la región conectora mencionada anteriormente (Lx), y similares.
- 35 En la primera molécula de ssPN mencionada anteriormente, el número de bases en cada una de las regiones mencionadas anteriormente (Xc) y (X) no está limitado en particular. A continuación se proporcionan ejemplos de las longitudes de las respectivas regiones. Sin embargo, se debe indicar que la presente invención no está limitada a los mismos en modo alguno. En la presente invención, "el número de bases" se refiere a la "longitud", por ejemplo, y también puede hacer referencia a la "longitud de la base". En la presente invención, por ejemplo, el intervalo
- 40 numérico con respecto al número de bases describe todos los números enteros positivos que entran dentro de ese intervalo. Por ejemplo, la descripción "de 1 a 4 bases" describe todas "1, 2, 3, y 4 bases" (lo mismo se aplica en lo sucesivo en la presente memoria).
- La región mencionada anteriormente (Xc) puede ser, por ejemplo, perfectamente complementaria a toda la región de la región mencionada anteriormente (X). En este caso, esto significa que, por ejemplo, la región mencionada
- 45 anteriormente (Xc) está formada por una secuencia de bases complementarias a toda la región que se extiende desde el extremo en la posición 5' al extremo en la posición 3' de la región mencionada anteriormente (X). En otras palabras, esto significa que la región mencionada anteriormente (Xc) tenga la misma longitud de las bases que la región mencionada anteriormente (X), y todas las bases en la región mencionada anteriormente (Xc) son complementarias a todas las bases en la región mencionada anteriormente (X).
- 50 Además, la región mencionada anteriormente (Xc) puede ser, por ejemplo, perfectamente complementaria a parte de la región mencionada anteriormente (X). En este caso, esto significa que, por ejemplo, la región mencionada anteriormente (Xc) está formada por una secuencia de bases complementarias a la parte de la región mencionada anteriormente (X). En otras palabras, esto significa que la región mencionada anteriormente (Xc) está formada por una secuencia de bases cuya longitud de las bases es más corta que la longitud de las bases de la región
- 55 mencionada anteriormente (X) por una o más bases, y todas las bases en la región mencionada anteriormente (Xc) son complementarias a todas las bases en la parte de la región mencionada anteriormente (X). La parte mencionada anteriormente de la región (X) es preferiblemente una región que tiene una secuencia de bases formada, por ejemplo, por bases sucesivas partiendo de la base al final (la 1ª base) en la región mencionada anteriormente (Xc) lateral en la región mencionada anteriormente (X).
- 60 En la primera molécula de ssPN mencionada anteriormente, la relación del número de bases (X) en la región

mencionada anteriormente (X) y el número de bases (Xc) en la región mencionada anteriormente (Xc) satisface, por ejemplo, la siguiente condición (3) o (5). Por ejemplo, en el caso anterior, de forma específica, se satisface la siguiente condición (11):

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

$$5 \quad X - Xc = 1 \text{ a } 10, \text{ preferiblemente } 1, 2 \text{ o } 3,$$

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

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

10 Cuando la región mencionada anteriormente (X) y/o la región mencionada anteriormente (Xc) incluye o incluyen la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente, la región mencionada anteriormente puede ser, por ejemplo, una región formada por la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente solamente o una región que incluye la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente. El número de bases en la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente es, por ejemplo, de 19 a 30, preferiblemente 19, 20, o 21. En la región o regiones que incluyen la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente, por ejemplo, la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente puede tener adicionalmente una
15 secuencia adicional en su extremo en la posición 5' y/o su extremo en la posición 3'. El número de bases en la secuencia adicional mencionada anteriormente es, por ejemplo, de 1 a 31, preferiblemente de 1 a 21, y más preferiblemente de 1 a 11.

20 El número de bases en la región mencionada anteriormente (X) no está limitado en particular. Cuando la región mencionada anteriormente (X) incluye la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente, el límite inferior del número de bases en la región mencionada anteriormente (X) es, por ejemplo, 19, y el límite superior del mismo es, por ejemplo, 50, preferiblemente 30, y más preferiblemente 25. De forma específica, el número de bases en la región mencionada anteriormente (X) es, por ejemplo, de 19 a 50, preferiblemente de 19 a 30, y más preferiblemente de 19 a 25.

25 El número de bases en la región mencionada anteriormente (Xc) no está limitado en particular. El límite inferior del número de bases en la región mencionada anteriormente (Xc) es, por ejemplo, 19, preferiblemente 20, y más preferiblemente 21, y el límite superior del mismo es, por ejemplo, 50, más preferiblemente 40, y aún más preferiblemente 30.

30 En la molécula de ssPN mencionada anteriormente, la longitud de la región conectora mencionada anteriormente (Lx) no está limitada en particular. La longitud de la región conectora mencionada anteriormente (Lx) es preferiblemente de un modo tal que, por ejemplo, las regiones mencionadas anteriormente (X) y (Xc) pueden formar una doble hebra. Cuando la región conectora mencionada anteriormente (Lx) incluye el resto(s) de nucleótido mencionado anteriormente además del resto(s) no nucleotídico mencionado anteriormente, el límite inferior del número de bases en la región conectora mencionada anteriormente (Lx) es, por ejemplo, 1, preferiblemente 2, y más preferiblemente 3, y el límite superior del mismo es, por ejemplo, 100, preferiblemente 80, y más preferiblemente 50.

35 La longitud completa de la primera molécula de ssPN mencionada anteriormente no está limitada en particular. En la primera molécula de ssPN mencionada anteriormente, el límite inferior del número total de bases (el número de bases en la molécula de ssPN de longitud completa), es, por ejemplo, 38, preferiblemente 42, más preferiblemente 50, aún más preferiblemente 51, y de forma particularmente preferible 52, y el límite superior del mismo es, por ejemplo, 300, preferiblemente 200, más preferiblemente 150, aún más preferiblemente 100, y de forma particularmente preferible 80. En la primera molécula de ssPN mencionada anteriormente, el límite inferior del número total de bases excluyendo ese en la región conectora mencionada anteriormente (Lx) es, por ejemplo, 38, preferiblemente 42, más preferiblemente 50, aún más preferiblemente 51, y de forma particularmente preferible 52, y el límite superior del mismo es, por ejemplo, 300, preferiblemente 200, más preferiblemente 150, aún más preferiblemente 100, y de forma particularmente preferible 80.

45 (2) Segunda molécula de ssPN

La segunda molécula de ssPN mencionada anteriormente es una molécula que incluye adicionalmente una región (Y) y una región (Yc) que es complementaria a la región mencionada anteriormente (Y), además de, por ejemplo, la región mencionada anteriormente (X), la región conectora mencionada anteriormente (Lx), y la región mencionada anteriormente (Xc). En la segunda molécula de ssPN mencionada anteriormente, una región interna (Z) está formada por la región mencionada anteriormente (X) y la región mencionada anteriormente (Y) que están unidas entre sí. La descripción con respecto a la primera molécula de ssPN mencionada anteriormente también se aplica a la segunda molécula de ssPN mencionada anteriormente, a menos que se indique de otro modo.

55 La segunda molécula de ssPN mencionada anteriormente puede incluir, por ejemplo, la región mencionada anteriormente (Xc), la región conectora mencionada anteriormente (Lx), la región mencionada anteriormente (X), la región mencionada anteriormente (Y), y la región mencionada anteriormente (Yc) en este orden desde el extremo en la posición 5' al extremo en la posición 3'. En este caso, la región mencionada anteriormente (Xc) también se

denomina "región en la posición 5' (Xc)"; la región mencionada anteriormente (X) en la región interna mencionada anteriormente (Z) también se denomina "región interna en la posición 5' (X)"; la región mencionada anteriormente (Y) en la región interna mencionada anteriormente (Z) también se denomina "región interna en la posición 3' (Y)"; y la región mencionada anteriormente (Yc) también se denomina "región en la posición 3' (Yc)". Como alternativa, la segunda molécula de ssPN mencionada anteriormente puede incluir, por ejemplo, la región mencionada anteriormente (Xc), la región conectora mencionada anteriormente (Lx), la región mencionada anteriormente (X), la región mencionada anteriormente (Y), y la región mencionada anteriormente (Yc) en este orden desde el extremo en la posición 3' al extremo en la posición 5'. En este caso, la región mencionada anteriormente (Xc) también se denomina "región en la posición 3' (Xc)"; la región mencionada anteriormente (X) en la región interna mencionada anteriormente (Z) también se denomina "región interna en la posición 3' (X)"; la región mencionada anteriormente (Y) en la región interna mencionada anteriormente (Z) también se denomina "región interna en la posición 5' (Y)"; y la región mencionada anteriormente (Yc) también se denomina "región en la posición 5' (Yc)".

Como se ha descrito anteriormente, la región interna mencionada anteriormente (Z) está formada, por ejemplo, por las regiones mencionadas anteriormente (X) e (Y) que están unidas entre sí. Por ejemplo, las regiones mencionadas anteriormente (X) e (Y) están unidas directamente entre sí sin ninguna secuencia de intervención entre las mismas. La región interna mencionada anteriormente (Z) se define como "formada por las regiones mencionadas anteriormente (X) e (Y) que están unidas entre sí" simplemente para indicar el contexto de la secuencia entre las regiones mencionadas anteriormente (Xc) e (Yc). Esta definición no pretende limitar que, en el uso de la molécula de ssPN mencionada anteriormente, las regiones mencionadas anteriormente (X) e (Y) en la región interna mencionada anteriormente (Z) son regiones independientes separadas. Es decir, por ejemplo, cuando la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente está incluida en la región interna mencionada anteriormente (Z), la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente se puede convocar para que se prolongue a través de las regiones mencionadas anteriormente (X) e (Y) en la región interna mencionada anteriormente (Z).

En la segunda molécula de ssPN mencionada anteriormente, la región mencionada anteriormente (Xc) es complementaria a la región mencionada anteriormente (X). Solamente es necesario que la región mencionada anteriormente (Xc) tenga una secuencia complementaria a toda la región o parte de la región mencionada anteriormente (X). Preferiblemente, la región mencionada anteriormente (Xc) incluye o está formada por una secuencia complementaria a toda la región o parte de la región mencionada anteriormente (X). La región mencionada anteriormente (Xc) puede ser, por ejemplo, perfectamente complementaria a toda la región o parte de la región mencionada anteriormente (X), o una o unas pocas bases en la región mencionada anteriormente (Xc) pueden no ser complementarias a la misma. Preferiblemente, la región mencionada anteriormente (Xc) es perfectamente complementaria a la misma. La expresión mencionada anteriormente "una o unas pocas bases" se refiere a, por ejemplo, de 1 a 3 bases, preferiblemente 1 base o 2 bases.

En la segunda molécula de ssPN mencionada anteriormente, la región mencionada anteriormente (Yc) es complementaria a la región mencionada anteriormente (Y). Solamente es necesario que la región mencionada anteriormente (Yc) tenga una secuencia complementaria a toda la región o parte de la región mencionada anteriormente (Y). Preferiblemente, la región mencionada anteriormente (Yc) incluye o está formada por una secuencia complementaria a toda la región o parte de la región mencionada anteriormente (Y). La región mencionada anteriormente (Yc) puede ser, por ejemplo, perfectamente complementaria a toda la región o parte de la región mencionada anteriormente (Y), o una o unas pocas bases en la región mencionada anteriormente (Yc) pueden no ser complementarias a la misma. Preferiblemente, la región mencionada anteriormente (Yc) es perfectamente complementaria a la misma. La expresión "una o unas pocas bases" mencionada anteriormente se refiere a, por ejemplo, de 1 a 3 bases, preferiblemente 1 base o 2 bases.

En la segunda molécula de ssPN mencionada anteriormente, al menos una de la región interna mencionada anteriormente (Z), que está formada por las regiones mencionadas anteriormente (X) e (Y), y la región mencionada anteriormente (Xc) incluye, por ejemplo, la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente. Además, la región mencionada anteriormente (Yc) también puede incluir la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente. Cuando la región interna mencionada anteriormente (Z) incluye la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente, por ejemplo, cualquiera de las regiones mencionadas anteriormente (X) e (Y) puede incluir la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente, o la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente se puede incluir para que se extienda a través de las regiones mencionadas anteriormente (X) e (Y). La segunda molécula de ssPN mencionada anteriormente puede incluir, por ejemplo, una secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente o dos o más secuencias inhibidoras de la expresión mencionadas anteriormente.

Cuando la segunda molécula de ssPN mencionada anteriormente incluye dos o más secuencias inhibidoras de la expresión mencionadas anteriormente, las posiciones de las respectivas secuencias inhibidoras de la expresión no están limitadas en particular. Pueden estar en una cualquiera de la región interna mencionada anteriormente (Z) y la región mencionada anteriormente (Xc), o pueden estar en una cualquiera de la región interna mencionada anteriormente (Z) y la región mencionada anteriormente (Xc), y cualquier región distinta a estas regiones.

En la segunda molécula de ssPN mencionada anteriormente, por ejemplo, las regiones mencionadas anteriormente (Yc) e (Y) pueden estar unidas entre sí ya sea directa o indirectamente. En el caso anterior, por ejemplo, las

regiones mencionadas anteriormente (Yc) e (Y) pueden estar unidas directamente mediante enlace fosfodiéster o similar. En la presente invención, la segunda molécula de ssPN mencionada anteriormente se configura de modo que tenga una región conectora (Ly) entre las regiones mencionadas anteriormente (Yc) e (Y) y las regiones mencionadas anteriormente (Yc) e (Y) se unen a través de la región conectora mencionada anteriormente (Ly).

- 5 La segunda molécula de ssPN mencionada anteriormente tiene la región conectora mencionada anteriormente (Ly), y por ejemplo, la región conectora mencionada anteriormente (Ly) puede ser un conector formado por el resto(s) de nucleótido mencionado anteriormente, o un conector que tiene una estructura no nucleotídica que contiene al menos uno de una estructura principal de pirrolidina y una estructura principal de piperidina tal como se ha descrito anteriormente. En el último caso, la región conectora (Ly) descrita en la presente memoria se puede representar con la fórmula mencionada anteriormente (I), por ejemplo, y todas las descripciones con respecto a la fórmula mencionada anteriormente (I) mencionadas anteriormente en relación con la región conectora mencionada anteriormente (Lx) también se aplican a la región conectora mencionada anteriormente (Ly). Cuando la región conectora mencionada anteriormente (Lx) y la región conectora mencionada anteriormente (Ly) están ambas representadas con la fórmula mencionada anteriormente (I), A, X¹, X², Y¹, Y², L¹, L², R¹ y R² en la región conectora mencionada anteriormente (Lx) y la región conectora mencionada anteriormente (Ly) pueden ser respectivamente los mismos o diferentes.

Cada una de las regiones mencionadas anteriormente (Yc) e (Y) están, por ejemplo, unidas a la región conectora mencionada anteriormente (Ly) a través de -OR¹- o -OR²-. En la región conectora mencionada anteriormente (Ly), R¹ y R² pueden estar o no estar presentes, al igual que en la región conectora descrita anteriormente (Lx).

- 20 La combinación de las regiones mencionadas anteriormente (Xc) y (X) con -OR¹- y -OR²- mencionados anteriormente, y la combinación de las regiones mencionadas anteriormente (Yc) e (Y) con -OR¹- y -OR²- mencionados anteriormente no está limitada en particular, y puede ser, por ejemplo, cualquiera de las siguientes condiciones:

Condición (1):

- 25 las regiones mencionadas anteriormente (Xc) y (X) se unen a la estructura de la fórmula mencionada anteriormente (I) a través de -OR²- y -OR¹-, respectivamente; y

las regiones mencionadas anteriormente (Yc) e (Y) se unen a la estructura de la fórmula mencionada anteriormente (I) a través de -OR¹- y -OR²-, respectivamente.

Condición (2):

- 30 las regiones mencionadas anteriormente (Xc) y (X) se unen a la estructura de la fórmula mencionada anteriormente (I) a través de -OR²- y -OR¹-, respectivamente; y

las regiones mencionadas anteriormente (Yc) e (Y) se unen a la estructura de la fórmula mencionada anteriormente (I) a través de -OR²- y -OR¹-, respectivamente.

Condición (3):

- 35 las regiones mencionadas anteriormente (Xc) y (X) se unen a la estructura de la fórmula mencionada anteriormente (I) a través de -OR¹- y -OR²-, respectivamente; y

las regiones mencionadas anteriormente (Yc) e (Y) se unen a la estructura de la fórmula mencionada anteriormente (I) a través de -OR¹- y -OR²-, respectivamente.

Condición (4):

- 40 las regiones mencionadas anteriormente (Xc) y (X) se unen a la estructura de la fórmula mencionada anteriormente (I) a través de -OR¹- y -OR²-, respectivamente; y

las regiones mencionadas anteriormente (Yc) e (Y) se unen a la estructura de la fórmula mencionada anteriormente (I) a través de -OR²- y -OR¹-, respectivamente.

- 45 La FIG. 2 muestra vistas esquemáticas que ilustran un ejemplo de la segunda molécula de ssPN mencionada anteriormente que tiene la región conectora mencionada anteriormente (Ly). La FIG. 2A es una vista esquemática que muestra el orden de las respectivas regiones desde el extremo en la posición 5' al extremo en la posición 3' en la molécula de ssPN mencionada anteriormente, como un ejemplo ilustrativo. La FIG. 2B es una vista esquemática que muestra el estado en el que las dobles hebras se forman en la molécula de ssPN mencionada anteriormente. Como se muestra en la FIG. 2B, en la molécula de ssPN mencionada anteriormente, se forman dobles hebras entre las regiones mencionadas anteriormente (Xc) y (X) y entre las regiones mencionadas anteriormente (Y) e (Yc), y cada una de la región Lx mencionada anteriormente y la región Ly mencionada anteriormente tienen una estructura de bucle dependiendo de sus longitudes. Las vistas esquemáticas mostradas en la FIG. 2 simplemente ilustran el orden en el que se unen las respectivas regiones y la relación posicional de las respectivas regiones que forman la

doble hebra, y no limitan, por ejemplo, las longitudes de las respectivas regiones, la forma de la región conectora, y similares. Además, aunque la región mencionada anteriormente (Xc) en el extremo en la posición 5' en la FIG. 2, la posición de la región mencionada anteriormente (Xc) no se limita a esto, y la región mencionada anteriormente (Xc) puede estar en el extremo en la posición 3'.

- 5 En la segunda molécula de ssPN mencionada anteriormente, el número de bases en cada una de las regiones mencionadas anteriormente (Xc), (X), (Y), e (Yc) no está limitado en particular. A continuación se proporcionan ejemplos de las longitudes de las respectivas regiones. Sin embargo, se debe indicar que la presente invención no está limitada a los mismos en modo alguno.

10 Como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, la región mencionada anteriormente (Xc) puede ser complementaria a toda la región de la región mencionada anteriormente (X). En este caso, es preferible que, por ejemplo, la región mencionada anteriormente (Xc) tenga la misma longitud de las bases que la región mencionada anteriormente (X), y esté formada por una secuencia de bases complementarias a toda la región de la región mencionada anteriormente (X). Es más preferible que la región mencionada anteriormente (Xc) tenga la misma longitud de las bases que la región mencionada anteriormente (X) y todas las bases en la región mencionada anteriormente (Xc) son complementarias a todas las bases en la región mencionada anteriormente (X), es decir, por ejemplo, la región (Xc) es perfectamente complementaria a la región (X). Sin embargo, se debe indicar que la configuración de la región (Xc) no se limita a esto, y una o unas pocas bases en la región (Xc) pueden no ser complementarias a las bases correspondientes en la región (X), por ejemplo, como se ha descrito anteriormente.

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

30 Como se ha descrito anteriormente, la región mencionada anteriormente (Yc) puede ser complementaria a, por ejemplo, toda la región de la región mencionada anteriormente (Y). En este caso, es preferible que, por ejemplo, la región mencionada anteriormente (Yc) tenga la misma longitud de las bases que la región mencionada anteriormente (Y), y esté formada por una secuencia de bases complementarias a toda la región de la región mencionada anteriormente (Y). Es más preferible que la región mencionada anteriormente (Yc) tenga la misma longitud de las bases que la región mencionada anteriormente (Y) y todas las bases en la región mencionada anteriormente (Yc) se han complementarias a todas las bases en la región mencionada anteriormente (Y), es decir, por ejemplo, la región (Yc) es perfectamente complementaria a la región (Y). Sin embargo, se debe indicar que la configuración de la región (Yc) no se limita a esto, y una o unas pocas bases en la región (Yc) pueden no ser complementarias a las bases correspondientes en la región (Y), por ejemplo, como se ha descrito anteriormente.

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

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

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

$$Z \geq X_c + Y_c \dots (2)$$

En la segunda molécula de ssPN mencionada anteriormente, la relación del número de bases (X) en la región mencionada anteriormente (X) y el número de bases (Y) en la región mencionada anteriormente (Y) no está limitado en particular, y satisfacen, por ejemplo, cualquiera de las condiciones de las siguientes expresiones:

5 $X = Y \dots (19)$

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

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

10 En la segunda molécula de ssPN, la relación del número de bases (X) en la región mencionada anteriormente (X) y el número de bases (X_c) en la región mencionada anteriormente (X_c), y la relación del número de bases (Y) en la región mencionada anteriormente (Y) y el número de bases (Y_c) en la región mencionada anteriormente (Y_c) satisfacen, por ejemplo, cualquiera de las siguientes condiciones (a) a (d):

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

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

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

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

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

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

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

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

20 $Y > Y_c \dots (8)$

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

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

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

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

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

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

30 más preferiblemente 1, 2 o 3

$$\dots (11)$$

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

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

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

35 $Y - Y_c = 1 \text{ a } 10, \text{ preferiblemente } 1, 2, 3 \text{ o } 4,$

más preferiblemente 1, 2 o 3 $\dots (14)$

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

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

más preferiblemente 1 o 2 $\dots (15)$

40 $Y - Y_c = 1 \text{ a } 10, \text{ preferiblemente, } 1, 2 \text{ o } 3,$

más preferiblemente 1 o 2 ... (16)

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

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

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

5 Con respecto a las segundas moléculas de ssPN que satisfacen las condiciones (a) a (d) mencionadas anteriormente, se muestran ejemplos de sus estructuras respectivamente en las vistas esquemáticas de la FIG. 3. La FIG. 3 muestra las moléculas de ssPN incluyendo las regiones conectoras mencionadas anteriormente (Lx) y (Ly). La FIG. 3A muestra un ejemplo de la molécula de ssPN que satisface la condición (a) mencionada anteriormente; la FIG. 3B muestra un ejemplo de la molécula de ssPN que satisface la condición (b) mencionada anteriormente; la FIG. 10 3C muestra un ejemplo de la molécula de ssPN que satisface la condición (c) mencionada anteriormente; y la FIG. 3D muestra un ejemplo de la molécula de ssPN que satisface la condición (d) mencionada anteriormente. En la FIG. 3, las líneas discontinuas indican un estado en el que se forman dobles hebras mediante autohibridación. Todas las moléculas de ssPN mostradas en la FIG. 3 se dirigen a ejemplos en los que la relación del número de bases (X) en la región mencionada anteriormente (X) y el número de bases (Y) en la región mencionada anteriormente (Y) satisfacen " $X < Y$ " de la expresión mencionada anteriormente (20). Sin embargo, se debe indicar que la relación no se limita a esto, y " $X = Y$ " de la expresión mencionada anteriormente (19) o " $X > Y$ " de la expresión mencionada anteriormente (21) se pueden satisfacer como se ha descrito anteriormente. Las vistas esquemáticas mostradas en la FIG. 3 simplemente ilustran la relación entre las regiones mencionadas anteriormente (X) y (Xc) y la relación entre las regiones mencionadas anteriormente (Y) e (Yc), y no limitan, por ejemplo, la longitud y forma de cada región, la presencia o ausencia de la región conectora (Ly), y similares.

Las moléculas de ssPN de (a) a (c) mencionados anteriormente son configuraciones que tienen una base que no está alineada con ambas de las regiones mencionadas anteriormente (Xc) e (Yc) en la región interna mencionada anteriormente (Z) dato que, por ejemplo, cada una de las regiones mencionadas anteriormente (Xc) y (X), y las regiones (Yc) e (Y) forman una doble hebra. También se puede decir que son configuraciones que tienen una base que no forma una doble hebra. En la región interna mencionada anteriormente (Z), en lo sucesivo en la presente memoria la base mencionada anteriormente que no está alineada (también denominada base que no forma una doble hebra) se va a denominar "base no emparejada". En la FIG. 3, la región de la base no emparejada mencionada anteriormente se muestra como "F". El número de bases en la región mencionada anteriormente (F) no está limitado en particular. El número de bases (F) en la región mencionada anteriormente (F) es, por ejemplo, el número de bases de " $X - X_c$ " para la molécula de ssPN de (a) mencionado anteriormente; el número de bases de " $Y - Y_c$ " para la molécula de ssPN de (b) mencionado anteriormente; y el total del número de bases de " $X - X_c$ " y el número de bases de " $Y - Y_c$ " para la molécula de ssPN de (c) mencionado anteriormente.

Por otro lado, la molécula de ssPN que satisface la condición (d) mencionada anteriormente se configura de modo que, por ejemplo, toda la región de la región interna mencionada anteriormente (Z) esté alineada con las regiones mencionadas anteriormente (Xc) e (Yc), en otras palabras, toda la región de la región interna mencionada anteriormente (Z) forma una doble hebra. En la molécula de ssPN que satisface la condición (d) mencionada anteriormente, el extremo en la posición 5' de la región mencionada anteriormente (Xc) y el extremo en la posición 3' de la región mencionada anteriormente (Yc) no están unidos entre sí.

El número total de las bases en la región mencionada anteriormente (Xc), las bases en la región mencionada anteriormente (Yc), y las bases no emparejadas (F) mencionadas anteriormente en la región interna mencionada anteriormente (Z) es igual al número de bases en la región interna mencionada anteriormente (Z). Por lo tanto, la longitud de la región mencionada anteriormente (Xc) y la longitud de la región mencionada anteriormente (Yc) se pueden determinar según sea apropiado dependiendo de, por ejemplo, la longitud de la región interna mencionada anteriormente (Z), el número de las bases no emparejadas mencionadas anteriormente, y las posiciones de las bases no emparejadas.

El número de bases en la región interna mencionada anteriormente (Z) es, por ejemplo, 19 o más. El límite inferior del número de bases es, por ejemplo, 19, preferiblemente 20, y más preferiblemente 21. El límite superior del número de las bases mencionadas anteriormente es, por ejemplo, 50, preferiblemente 40, y más preferiblemente 30. Un ejemplo específico del número de bases en la región interna mencionada anteriormente (Z) es 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30. Cuando la región interna mencionada anteriormente (Z) incluye la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente, por ejemplo, tales condiciones son preferibles.

Cuando la región interna mencionada anteriormente (Z) incluye la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente, la región interna mencionada anteriormente (Z) puede ser, por ejemplo, una región formada por la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente solamente o una región que incluye la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente. El número de bases de la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente es, por ejemplo, de 19 a 30, preferiblemente 19, 20, o 21. Cuando la región interna mencionada anteriormente (Z) incluye la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente, la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente puede tener adicionalmente una secuencia adicional

en su extremo en la posición 5' y/o extremo en la posición 3'. El número de bases en la secuencia adicional mencionada anteriormente es, por ejemplo, de 1 a 31, preferiblemente de 1 a 21, más preferiblemente de 1 a 11, y aún más preferiblemente de 1 a 7.

5 El número de bases en la región mencionada anteriormente (Xc) es, por ejemplo, de 1 a 29, preferiblemente de 1 a 11, más preferiblemente de 1 a 7, aún más preferiblemente de 1 a 4, y de forma particularmente preferible 1, 2 o 3. Cuando la región interna mencionada anteriormente (Z) o la región mencionada anteriormente (Yc) incluye la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente, por ejemplo, es preferible que el número de bases como se ha descrito anteriormente. Un ejemplo específico es el que sigue a continuación: cuando el número de bases en la región interna mencionada anteriormente (Z) es de 19 a 30 (p. ej., 19), el número de bases en la región
10 mencionada anteriormente (Xc) es, por ejemplo, de 1 a 11, preferiblemente de 1 a 7, más preferiblemente de 1 a 4, y aún más preferiblemente 1, 2 o 3.

15 Cuando la región mencionada anteriormente (Xc) incluye la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente, la región mencionada anteriormente (Xc) puede ser, por ejemplo, una región formada por la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente solamente o una región que incluye la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente. Por ejemplo, la longitud de la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente es como se ha descrito anteriormente. Cuando la región mencionada anteriormente (Xc) incluye la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente, la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente puede tener adicionalmente una secuencia adicional en su extremo en la posición 5' y/o extremo en la posición 3'. El número de bases en la secuencia adicional mencionada
20 anteriormente es, por ejemplo, de 1 a 11, preferiblemente de 1 a 7.

25 El número de bases en la región mencionada anteriormente (Yc) es, por ejemplo, de 1 a 29, preferiblemente de 1 a 11, más preferiblemente de 1 a 7, aún más preferiblemente de 1 a 4, y de forma particularmente preferible 1, 2 o 3. Cuando la región interna mencionada anteriormente (Z) o la región mencionada anteriormente (Xc) incluye la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente, por ejemplo, es preferible que el número de bases como se ha descrito anteriormente. Un ejemplo específico es el que sigue a continuación: cuando el número de bases en la región interna mencionada anteriormente (Z) es de 19 a 30 (p. ej., 19), el número de bases en la región mencionada anteriormente (Yc) es, por ejemplo, de 1 a 11, preferiblemente de 1 a 7, más preferiblemente 1, 2, 3 o 4,
y aún más preferiblemente 1, 2 o 3.

30 Cuando la región mencionada anteriormente (Yc) incluye la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente, la región mencionada anteriormente (Yc) puede ser, por ejemplo, una región formada por la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente solamente o una región que incluye la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente. La longitud de la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente es, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Cuando la región mencionada anteriormente (Yc) incluye la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente, la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente puede tener adicionalmente una secuencia adicional en su extremo en la posición 5' y/o extremo en la posición 3'. El número de bases en la secuencia adicional mencionada
35 anteriormente es, por ejemplo, de 1 a 11, preferiblemente de 1 a 7.

40 Como se ha descrito anteriormente, la relación entre el número de bases en la región interna mencionada anteriormente (Z), el número de bases en la región mencionada anteriormente (Xc), y el número de bases en la región mencionada anteriormente (Yc) se puede expresar, por ejemplo, con la expresión mencionada anteriormente (2): " $Z \geq Xc + Yc$ ". De forma específica, el número de bases representado con " $Xc + Yc$ " es, por ejemplo, igual al número de bases en la región interna mencionada anteriormente (Z), o menor que el número de bases en la región interna mencionada anteriormente (Z). En el último caso, " $Z - (Xc + Yc)$ " es, por ejemplo, de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 4, y más preferiblemente 1, 2 o 3. La fórmula mencionada anteriormente " $Z - (Xc + Yc)$ " corresponde, por
45 ejemplo, al número de bases (F) en la región de bases no emparejadas (F) en la región interna mencionada anteriormente (Z).

50 En la segunda molécula de ssPN mencionada anteriormente, las longitudes de las regiones conectoras mencionadas anteriormente (Lx) y (Ly) no están limitadas en particular. La región conectora mencionada anteriormente (Lx) es como se ha descrito anteriormente. Cuando la unidad constitucional de la región conectora mencionada anteriormente (Ly) incluye una base(s), el límite inferior del número de bases en la región conectora mencionada anteriormente (Ly) es, por ejemplo, 1, preferiblemente 2, y más preferiblemente 3, y el límite superior del mismo es, por ejemplo, 100, preferiblemente 80, y más preferiblemente 50. El número de bases en cada una de las regiones conectoras mencionadas anteriormente es específicamente de 1 a 50, de 1 a 30, de 1 a 20, de 1 a 10, de 1 a 7, o de 1 a 4, por ejemplo, pero no se limita a estos ejemplos.

55 La región conectora mencionada anteriormente (Ly) puede ser, por ejemplo, la misma o diferente a la región conectora mencionada anteriormente (Lx).

La longitud completa de la segunda molécula de ssPN mencionada anteriormente no está limitada en particular. En la segunda molécula de ssPN mencionada anteriormente, el límite inferior del número total de bases (el número de bases en la molécula de ssPN de longitud completa), es, por ejemplo, 38, preferiblemente 42, más preferiblemente

50, aún más preferiblemente 51, y de forma particularmente preferible 52, y el límite superior del mismo es, por ejemplo, 300, preferiblemente 200, más preferiblemente 150, aún más preferiblemente 100, y de forma particularmente preferible 80. En la segunda molécula de ssPN mencionada anteriormente, el límite inferior del número total de bases destruyendo las que se encuentran en las regiones conectoras mencionadas anteriormente (Lx) y (Ly) es, por ejemplo, 38, preferiblemente 42, más preferiblemente 50, aún más preferiblemente 51, y de forma particularmente preferible 52, y el límite superior del mismo es, por ejemplo, 300, preferiblemente 200, más preferiblemente 150, aún más preferiblemente 100, y de forma particularmente preferible 80.

En la molécula de ssPN descrita, solo es necesario que la región conectora mencionada anteriormente (Lx) tenga la estructura no nucleotídica mencionada anteriormente, como se ha descrito anteriormente, las otras unidades constitucionales no están limitadas en particular. Los ejemplos de las unidades constitucionales mencionadas anteriormente incluyen restos de nucleótidos. Los ejemplos de los restos de nucleótido mencionados anteriormente incluyen un resto de ribonucleótido y un resto de desoxirribonucleótido. El resto de nucleótido mencionado anteriormente puede ser, por ejemplo, es que no está modificado (resto de nucleótido no modificado) o el que se ha modificado (resto de nucleótido modificado). Mediante la configuración de la molécula de ssPN de la presente invención para que incluya el resto de nucleótido mencionado anteriormente, por ejemplo, la resistencia de la molécula de ssPN a nucleasas se puede mejorar, permitiendo de ese modo mejorar la estabilidad de la molécula de ssPN. Además, la molécula de ssPN de la presente invención puede incluir adicionalmente, por ejemplo, un resto no nucleotídico además del resto de nucleótido mencionado anteriormente.

El resto de nucleótido mencionado anteriormente es preferible, la unidad constitucional de cada una de la región mencionada anteriormente (Xc), la región mencionada anteriormente (X), la región mencionada anteriormente (Y) y la región mencionada anteriormente (Yc). Cada una de las regiones mencionadas anteriormente está formada, por ejemplo, por cualquiera de los siguientes restos (1) a (3):

(1) un resto(s) de nucleótido sin modificar

(2) un resto(s) de nucleótido modificado

(3) un resto(s) de nucleótido sin modificar y un resto(s) de nucleótido modificado.

La región conectora mencionada anteriormente (Lx) puede estar formada, por ejemplo, por el resto(s) no nucleotídico mencionado anteriormente solamente, o puede estar formada por el resto(s) no nucleotídico mencionado anteriormente y el resto(s) de nucleótido mencionado anteriormente. La región conectora mencionada anteriormente (Lx) está formada, por ejemplo, por cualquiera de los siguientes restos (4) a (7):

(4) un resto no nucleotídico(s)

(5) un resto no nucleotídico(s) y un resto(s) de nucleótido sin modificar

(6) un resto no nucleotídico(s) y un resto(s) de nucleótido modificado

(7) un resto no nucleotídico(s), un resto(s) de nucleótido sin modificar, y un resto(s) de nucleótido modificado.

Las unidades constitucionales de la región conectora mencionada anteriormente (Ly) no están limitadas en particular, y algunos ejemplos de las mismas incluyen los restos de nucleótido mencionados anteriormente y los restos no nucleotídicos mencionados anteriormente, como se ha descrito anteriormente. Cada de las regiones conectoras mencionadas anteriormente puede estar formada, por ejemplo, por el resto(s) de nucleótido mencionado anteriormente solamente, el resto(s) no nucleotídico mencionado anteriormente solamente, o tanto el resto(s) de nucleótido mencionado anteriormente como el resto(s) no nucleotídico mencionado anteriormente. Cada de las regiones conectoras mencionadas anteriormente está formada por ejemplo, por cualquiera de los siguientes restos (1) a (7):

(1) un resto(s) de nucleótido sin modificar

(2) un resto(s) de nucleótido modificado

(3) un resto(s) de nucleótido sin modificar y un resto(s) de nucleótido modificado

(4) un resto no nucleotídico(s)

(5) un resto no nucleotídico(s) y un resto(s) de nucleótido sin modificar

(6) un resto no nucleotídico(s) y un resto(s) de nucleótido modificado

(7) un resto no nucleotídico(s), un resto(s) de nucleótido sin modificar, y un resto(s) de nucleótido modificado.

Los ejemplos de la molécula de ssPN, excluyendo la región conectora mencionada anteriormente (Lx), de la presente descripción incluyen moléculas formadas por los restos de nucleótido mencionados anteriormente

solamente; y moléculas que incluyen el resto(s) no nucleotídico mencionado anteriormente además de los restos de nucleótido mencionados anteriormente. En la molécula de ssPN de la presente invención, por ejemplo, los restos de nucleótido mencionados anteriormente pueden ser los restos de nucleótido sin modificar mencionados anteriormente solamente; los restos de nucleótido mencionados anteriormente solamente; o tanto el resto(s) de nucleótido sin modificar mencionado anteriormente como el resto de nucleótido(s) mencionado anteriormente, como se ha descrito anteriormente. Cuando la molécula de ssPN mencionada anteriormente incluye tanto el resto(s) de nucleótido sin modificar mencionado anteriormente como el resto(s) de nucleótido mencionado anteriormente, el número del resto(s) de nucleótido mencionado anteriormente no está limitado en particular, y es, por ejemplo, "de uno a varios", de forma específica, por ejemplo, de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 4, más preferiblemente de 1 a 3, y que lo más preferiblemente 1 o 2. Cuando la molécula de ssPN de la presente invención incluyen el resto(s) no nucleotídico mencionado anteriormente, el número de el resto(s) no nucleotídico mencionado anteriormente no está limitado en particular, y es, por ejemplo, "de uno a varios", de forma específica, por ejemplo, 1 o 2.

En la molécula de ssPN descrita, por ejemplo, el resto de nucleótido mencionado anteriormente es preferiblemente un resto de ribonucleótido. En este caso, por ejemplo, la molécula de ssPN de la presente descripción también se denomina "molécula de ARNss" o "molécula de P-ARNss". Los ejemplos de la molécula de ARNss mencionada anteriormente, excluyendo la región conectora mencionada anteriormente (Lx), incluyen moléculas formadas por los restos de ribonucleótido solamente; y una molécula que incluye el resto(s) no nucleotídico mencionado anteriormente además de los restos de ribonucleótido mencionados anteriormente. Como se ha descrito anteriormente, como los restos de ribonucleótido mencionados anteriormente, por ejemplo, la molécula de ARNss mencionada anteriormente puede incluir: los restos de ribonucleótido sin modificar mencionados anteriormente solamente; los restos de ribonucleótido modificados mencionados anteriormente solamente; o tanto el resto(s) de ribonucleótido sin modificar mencionado anteriormente como el resto(s) de ribonucleótido modificado mencionado anteriormente.

Cuando la molécula de ARNss mencionada anteriormente incluye, por ejemplo, el resto(s) de ribonucleótido modificado mencionado anteriormente además de los restos de ribonucleótido sin modificar mencionados anteriormente, el número del resto(s) de ribonucleótido modificado mencionado anteriormente no está limitado en particular, y es, por ejemplo, "de uno a varios", de forma específica, por ejemplo, de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 4, más preferiblemente de 1 a 3, y lo más preferiblemente 1 o 2. El resto de ribonucleótido modificado mencionado anteriormente en contraste con el resto de ribonucleótido sin modificar mencionado anteriormente puede ser, por ejemplo, en el resto de desoxirribonucleótido mencionado anteriormente obtenido por sustitución de un resto de ribosa por un resto desoxirribosa. Cuando la molécula de ARNss mencionada anteriormente incluye, por ejemplo, en el resto(s) de desoxirribonucleótido mencionado anteriormente además del resto(s) de ribonucleótido sin modificar mencionado anteriormente, el número del resto(s) de desoxirribonucleótido mencionado anteriormente no está limitado en particular, y es, por ejemplo, "de uno a varios", de forma específica, por ejemplo, de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 4, más preferiblemente de 1 a 3, y lo más preferiblemente 1 o 2.

La molécula de ssPN de la presente invención puede incluir, por ejemplo, una sustancia de etiquetado, y se puede etiquetar con la sustancia de etiquetado mencionada anteriormente. La sustancia de etiquetado mencionada anteriormente no está limitada en particular, y puede ser, por ejemplo, una sustancia fluorescente, un colorante, un isótopo, o similares. Los ejemplos de la sustancia de etiquetado mencionada anteriormente incluyen: fluoróforos tales como pireno, TAMRA, fluoresceína, un colorante Cy3, y un colorante Cy5. Los ejemplos del colorante mencionado anteriormente incluyen colorantes de tipo Alexa tales como Alexa 488. Los ejemplos del isótopo mencionado anteriormente incluyen isótopos y radioisótopos estables. Entre los mismos son preferibles los isótopos estables. Por ejemplo, los isótopos estables mencionados anteriormente presentan un bajo riesgo de exposición a la radiación y no requieren instalaciones especiales. Por lo tanto, los isótopos estables presentan una manipulación excelente y pueden contribuir a la reducción de costes. Además, por ejemplo, el isótopo estable mencionado anteriormente no cambia las propiedades físicas de un compuesto etiquetado con el mismo y por lo tanto tiene una propiedad excelente como indicador. El isótopo estable mencionado anteriormente no está limitado en particular, y los ejemplos del mismo incluyen ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{33}S , ^{34}S , y ^{36}S .

En la molécula de ssPN de la presente invención, como se ha descrito anteriormente, es preferible introducir, por ejemplo, la sustancia de etiquetado mencionada anteriormente en la estructura no nucleotídica mencionada anteriormente, preferiblemente al resto(s) no nucleotídico mencionado anteriormente en la región conectora mencionada anteriormente (Lx). Por ejemplo, la introducción de la sustancia de etiquetado al resto(s) no nucleotídico mencionado anteriormente se puede realizar fácilmente y con bajo coste.

Como se ha descrito anteriormente, la molécula de ssPN de la presente invención puede inhibir la expresión mencionada anteriormente de un gen diana. Por lo tanto, la molécula de ssPN de la presente invención se puede usar, por ejemplo, como un agente terapéutico para tratar una enfermedad causada por un gen. Cuando la molécula de ssPN mencionada anteriormente incluye, como secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente, una secuencia que inhibe la expresión de un gen que causa la enfermedad mencionada anteriormente, por ejemplo, es posible tratar la enfermedad mencionada anteriormente mediante la inhibición de la expresión del gen diana mencionado anteriormente. En la presente invención, el término "tratamiento" incluye: prevención de las enfermedades mencionadas anteriormente; mejora de las enfermedades; y mejora de los pronósticos, por ejemplo, y puede hacer referencia a cualquiera de ellos.

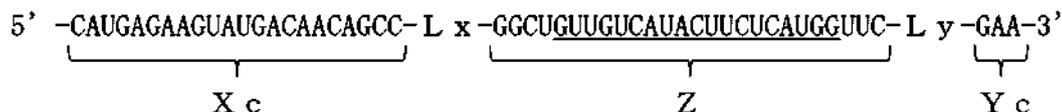
El método de uso de la molécula de ssPN descrito no está limitado en particular. Por ejemplo, la molécula de ssPN mencionada anteriormente se puede administrar a un sujeto que tenga el gen diana mencionado anteriormente.

Los ejemplos del sujeto mencionado anteriormente al que se le administra la molécula de ssPN de la presente invención incluyen células, tejidos, órganos y similares. Los ejemplos del sujeto mencionado anteriormente también incluyen seres humanos, animales o humanos y similares tales como mamíferos no humanos, es decir, mamíferos excluyendo los seres humanos. La administración mencionada anteriormente se puede realizar, por ejemplo, *in vivo* o *in vitro*. Las células mencionadas anteriormente no están limitadas en particular, y los ejemplos de las mismas incluyen: diversas células cultivadas tales como células HeLa, células 293, células NIH3T3, y células COS; células madre tales como células ES y células madre hematopoyéticas; y células aisladas de organismos vivos, tales como células cultivadas primarias.

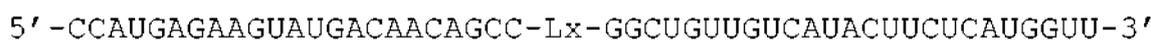
En la presente invención, el gen diana mencionado anteriormente cuya expresión se va a inhibir no está limitado en particular y se puede establecer cualquier gen deseado para el gen diana. La secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente se puede diseñar según sea apropiado dependiendo del gen mencionado anteriormente.

Los ejemplos específicos de la molécula de ssPN de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los que siguen a continuación. La secuencia de bases de la molécula de ssPN mencionada anteriormente cuando el gen diana mencionado anteriormente es el gen GAPDH es, por ejemplo, la secuencia de bases conocida por la SEQ ID NO: 4 o 18, que pueden incluir de una o varias deleciones, sustituciones y/o adiciones, y cuando el gen diana mencionado anteriormente es TGF-β1, la molécula de ssPN se ejemplifica mediante la secuencia de bases mostradas por las SEQ ID NOs: 19 - 23, que pueden incluir de una o varias deleciones, sustituciones y/o adiciones. En las secuencias de las siguientes SEQ ID NOs: 4 y 18, la parte subrayada de GUUGUCAUACUUCUCAUGG (SEQ ID NO: 5) es la región que hace referencia a la inhibición de la expresión genética de GAPDH. En las siguientes SEQ ID NOs: 19 - 23, "*" muestra una base no emparejada. En las siguientes SEQ ID NOs: 4 y 18 - 23, las estructuras de Lx y Ly no están limitadas en particular y puede ser, por ejemplo, la estructura (Lg) que se muestra en los Ejemplos que se mencionan a continuación.

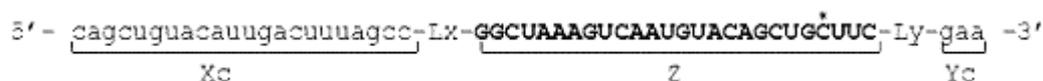
Ej : PK - 0 0 5 4 (SEQ ID NO: 4)



(SEQ ID NO: 18)

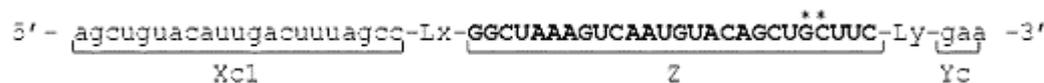


(SEQ ID NO: 19)

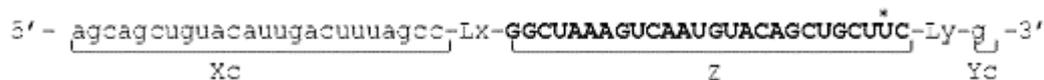


30

(SEQ ID NO: 20)

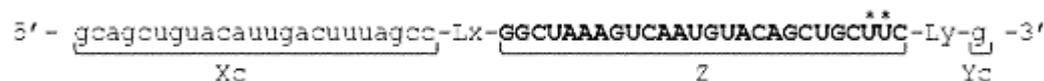


(SEQ ID NO: 21)



35

(SEQ ID NO: 22)



mencionado anteriormente incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, grupos hidrocarburo cíclico unidos por puente, y grupos de espiro hidrocarburo. Entre ellos, son preferibles los grupos ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, grupos hidrocarburo cíclico unidos por puente, y similares.

5 En la presente invención, los ejemplos de los "grupos hidrocarburo cíclico unidos por puente" incluyen biciclo[2.1.0]pentilo, biciclo[2.2.1]heptilo, biciclo[2.2.2]octilo, y biciclo[3.2.1]octilo, triciclo[2.2.1.0]heptilo, biciclo[3.3.1]nonano, 1-adamantilo y 2-adamantilo.

En la presente invención, los ejemplos de los "grupos espiro hidrocarburo" incluyen espiro[3,4]octilo.

10 En la presente invención, el término "cicloalqueno" incluye, por ejemplo, grupos hidrocarburo alifático cíclico insaturado y el número de átomos de carbono en el cicloalqueno es, por ejemplo, de 3 a 7. Los ejemplos del grupo mencionado anteriormente incluyen ciclopropeno, ciclobuteno, ciclopenteno, ciclohexeno, y ciclohepteno. Entre ellos, son preferibles ciclopropeno, ciclobuteno, ciclopenteno, ciclohexeno, y similares. El término "cicloalqueno" mencionado anteriormente también incluye, por ejemplo, grupos hidrocarburo cíclico unidos por puente y grupos espiro hidrocarburo que tienen un enlace insaturado en sus anillos.

15 En la presente invención, los ejemplos del "arilalquilo" incluyen bencilo, 2-fenilo, y naftalenilmetilo. Los ejemplos del "cicloalquilalquilo" y "ciclilalquilo" incluyen ciclohexilmetilo y adamantilmetilo. Los ejemplos del "hidroxialquilo" incluyen hidroximetilo y 2-hidroxietilo.

20 En la presente invención, el "alcoxi" incluye, por ejemplo, grupos formados por cualquiera de los alquilos mencionados anteriormente y oxígeno (alquil-O-grupos) y los ejemplos de los mismos incluyen metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, y n-butoxi. Los ejemplos del "alcoxialquilo" incluyen metoximetilo. Los ejemplos del "aminoalquilo" incluyen 2-aminoetilo.

25 En la presente invención, los ejemplos del "heterociclilo" incluyen 1-pirrolinilo, 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, 1-pirrolidinilo, 2-pirrolidinilo, 3-pirrolidinilo, pirrolidinona, 1-imidazolinilo, 2-imidazolinilo, 4-imidazolinilo, 1-imidazolidinilo, 2-imidazolidinilo, 4-imidazolidinilo, imidazolidinona, 1-pirazolinilo, 3-pirazolinilo, 4-pirazolinilo, 1-pirazolidinilo, 3-pirazolidinilo, 4-pirazolidinilo, piperidinona, piperidino, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-piperidinilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo, piperazinona, 2-morfolinilo, 3-morfolinilo, morfolino, tetrahidropirano, y tetrahidrofurano.

En la presente invención, los ejemplos del "heterociclilalquilo" incluyen piperidinilmetilo y piperazinilmetilo. Los ejemplos del "heterociclilalqueno" incluyen 2-piperidiniletano. Los ejemplos del "heteroarilalquilo" incluyen piridilmetilo y quinolin-3-ilmetilo.

30 En la presente invención, el término "sililo" incluyen grupos representados con la fórmula R_3Si- , en la que R independientemente se puede seleccionar de los alquilos, arilos, y cicloalquilos, mencionados anteriormente. Los ejemplos del sililo incluyen un grupo trimetilsililo y un grupo terc-butildimetilsililo. Los ejemplos del "sililoxi" incluyen un grupo trimetilsililoxi. Los ejemplos del "sililoxialquilo" incluyen trimetilsililoximetilo.

En la presente invención, los ejemplos del "alqueno" incluyen metileno, etileno, y propileno.

35 En la presente invención, los diversos grupos descritos anteriormente pueden estar sustituidos. Los ejemplos del sustituyente mencionado anteriormente incluyen hidroxilo, carboxilo, sulfato, halógeno, haluro de alquilo (haloalquilo, p. ej., CF_3 , CH_2CF_3 , CH_2CCl_3), nitro, nitroso, ciano, alquilo (p. ej., metilo, etilo, isopropilo, terc-butilo), alqueno (p. ej., vinilo), alquino (p. ej., etinilo), cicloalquilo (p. ej., ciclopropilo, adamantilo), cicloalquilalquilo (p. ej., ciclohexilmetilo, adamantilmetilo), cicloalqueno (p. ej., ciclopropeno), ciclilalquilo, hidroxialquilo (p. ej., hidroximetilo, hidroxietilo), alcoxialquilo (p. ej., metoximetilo, etoximetilo, etoxietilo), arilo (p. ej., fenilo, naftilo), arilalquilo (p. ej., bencilo, fenilo), alquilarilo (p. ej., p-metilfenilo), heteroarilo (p. ej., piridilo, furilo), heteroarilalquilo (p. ej., piridilmetilo), heterociclilo (p. ej., piperidilo), heterociclilalqueno, heterociclilalquilo (p. ej., morfolilmetilo), alcoxi (p. ej., metoxi, etoxi, propoxi, butoxi), alcoxi halogenado (p. ej., OCF_3), alquenoiloxi (p. ej., viniloxi, aliloxi), ariloxi (p. ej., feniloxi), alquiloxicarbonilo (p. ej., metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, terc-butoxicarbonilo), arilalquiloiloxi (p. ej., benciloxi), amino [alquilamino (p. ej., metilamino, etilamino, dimetilamino), acilamino (p. ej., acetilamino, benzoilamino), arilalquilamino (p. ej., bencilamino, tritilamino), hidroxiamino], aminoalquilo (p. ej., aminometilo), alquilaminoalquilo (p. ej., dietilaminometilo), carbamoilo, sulfamoilo, oxo, sililo, sililoxialquilo y similares.

2. Resto de nucleótido

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

55 El resto de nucleótido mencionado anteriormente puede ser, por ejemplo, un resto de nucleótido sin modificar o un resto de nucleótido modificado. Los componentes mencionados anteriormente del resto de nucleótido sin modificar

mencionado anteriormente son los mismos o sustancialmente los mismos que, por ejemplo, los componentes de un resto de nucleótido de origen natural. Preferiblemente, los componentes son los mismos o sustancialmente los mismos que los componentes de un resto de nucleótido que se produce de forma natural en un cuerpo humano.

5 El resto de nucleótido modificado mencionado anteriormente es, por ejemplo, un resto de nucleótido obtenido por modificación del resto de nucleótido sin modificar mencionado anteriormente. Por ejemplo, el resto de nucleótido mencionado anteriormente puede ser de un modo tal que se modifica cualquiera de los componentes del resto de nucleótido sin modificar mencionado anteriormente. En la presente invención, "modificación" se refiere a, por ejemplo, sustitución, adición, y/o deleción de cualquiera de los componentes mencionados anteriormente; y
10 sustitución, adición, y/o deleción de un átomo(s) y/o un grupo(s) funcional en el componente(s) mencionado anteriormente. También se puede denominar "alteración". Los ejemplos del resto de nucleótido mencionado anteriormente incluyen restos de nucleótido de origen natural y restos de nucleótido modificados de forma artificial. Con respecto a los restos de nucleótido modificados obtenidos de forma natural mencionados anteriormente, por ejemplo, se puede hacer referencia a Limbach *et al.* (Limbach *et al.*, 1994, Summary: the modified nucleosides of RNA, Nucleic Acids Res. 22: pp. 2183 a 2196). El resto de nucleótido modificado mencionado anteriormente puede ser, por ejemplo, un resto de una alternativa del resto de nucleótido mencionado anteriormente.
15

Los ejemplos de la modificación del resto de nucleótido mencionado anteriormente incluyen modificación de una estructura principal de fosfato de ribosa (en lo sucesivo en la presente memoria denominada "estructura principal de ribofosfato").

20 En la estructura principal de ribofosfato mencionada anteriormente, por ejemplo, un resto de ribosa se puede modificar. En el resto de ribosa mencionado anteriormente, por ejemplo, el carbono en la posición 2' se puede modificar. De forma específica, un grupo hidroxilo unido, por ejemplo, al carbono en la posición 2' se puede sustituir con hidrógeno o flúor. Mediante la sustitución del grupo hidroxilo unido al carbono en la posición 2' mencionado anteriormente con hidrógeno, es posible sustituir el resto de ribosa con resto de desoxirribosa. El resto de ribosa mencionado anteriormente se fue sustituir con su estereoisómero, por ejemplo, y se puede sustituir, por ejemplo, con un resto de arabinosa.
25

La estructura principal de ribofosfato mencionada anteriormente se puede sustituir, por ejemplo, con una estructura principal distinta de ribofosfato que tenga un resto sin ribosa y/o un grupo sin fosfato. La estructura principal que no es ribofosfato mencionada anteriormente puede ser, por ejemplo, la estructura principal de ribofosfato mencionada anteriormente modificada para qué quede sin carga. Los ejemplos de una alternativa obtenida por sustitución de la estructura principal de ribofosfato con la estructura principal distinta de ribofosfato mencionada anteriormente en el resto de nucleótido mencionado anteriormente incluyen morfolino, ciclobutilo, y pirrolidina. Otros ejemplos de la alternativa mencionada anteriormente incluyen restos de monómeros de ácido nucleico artificiales. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen PNA (Ácido Nucleico Peptídico, LNA (Ácido Nucleico Bloqueado), y ENA (Ácidos Nucleicos unidos por puente de 2'-O,4'-C-Etileno). Entre ellos, es preferible el PNA.
30

35 En la estructura principal de ribofosfato mencionada anteriormente, por ejemplo, un grupo fosfato se puede modificar modified. En la estructura principal de ribofosfato mencionada anteriormente, un grupo fosfato en la proximidad más cercana al resto de azúcar se denomina "grupo α -fosfato". El grupo α -fosfato mencionado anteriormente presenta carga negativa, y las cargas eléctricas se distribuyen únicamente con respecto a dos átomos de oxígeno que no están unidos al resto de azúcar. Entre los cuatro átomos de oxígeno en el grupo α -fosfato mencionado anteriormente, los dos átomos de oxígeno no unidos al resto de azúcar en el enlace fosfodiéster entre los restos de nucleótido se denominan en lo sucesivo en la presente memoria "oxígenos no enlazantes". Por otro lado, dos átomos de oxígeno que se unen al resto de azúcar en el enlace fosfodiéster de los restos de nucleótido mencionados anteriormente en lo sucesivo en la presente memoria se denominan "oxígenos enlazantes". Por ejemplo, el grupo α -fosfato mencionado anteriormente se modifica preferiblemente para que no tenga carga, o para que haga que la distribución de cargas entre los átomos no enlazantes mencionados anteriormente sea asimétrica.
40
45

En el grupo fosfato mencionado anteriormente, por ejemplo, el oxígeno(s) no enlazante mencionado anteriormente puede estar sustituido. El oxígeno(s) mencionado anteriormente puede estar sustituido con, por ejemplo, cualquier átomo seleccionado de S (azufre), Se (selenio), B (boro), C (carbono), H (hidrógeno), N (nitrógeno), y OR (R es, por ejemplo, un grupo alquilo o un grupo arilo) y es preferible la sustitución con S. es preferible que ambos oxígenos no enlazantes mencionados anteriormente estén sustituidos, por ejemplo, y es más preferible que ambos oxígenos no enlazantes estén sustituidos con S. Los ejemplos del grupo fosfato modificado mencionado anteriormente incluyen fosforotioatos, fosforoditioatos, fosforoselenatos, boranofosfatos, ésteres de boranofosfato, hidrogenofosfonatos, fosforamidatos, alquilo o fosfonatos de arilo, y fosfotriésteres. En particular, es preferible que el fosforoditioato en el que ambos oxígenos no enlazantes mencionados anteriormente están sustituidos con S.
50

55 En el grupo fosfato mencionado anteriormente, por ejemplo, el oxígeno(s) enlazante mencionado anteriormente puede estar sustituido. El oxígeno(s) mencionado anteriormente puede estar sustituido con, por ejemplo, cualquier átomo seleccionado de S (azufre), C (carbono), y N (nitrógeno). Los ejemplos del grupo fosfato modificado mencionado anteriormente incluyen: fosforoamidatos unidos por puente que resultan de la sustitución con N; fosforotioatos unidos por puente que resultan de la sustitución con S; y metilfosfonatos unidos por puente que resultan de la sustitución con C. Preferiblemente, la sustitución del oxígeno(s) enlazantes mencionado anteriormente
60

se realiza, por ejemplo, en al menos uno del resto de nucleótido en extremo en la posición 5' y el resto de nucleótido en el extremo en la posición 3' de la molécula de ssPN de la presente invención. Cuando la sustitución se realiza en extremo en la posición 5', es preferible la sustitución con C. Cuando la sustitución se realiza en el extremo en la posición 3', es preferible la sustitución con N.

5 El grupo fosfato mencionado anteriormente puede estar sustituido con, por ejemplo, el conector sin fosfato mencionado anteriormente. El conector mencionado anteriormente puede contener siloxano, carbonato, carboximetilo, carbamato, amida, tioéter, conector de óxido de etileno, sulfonato, sulfonamida, tioformacetal, formacetal, oxima, metilenimino, metilendimetilhidrazo, metilendimetilhidrazo, metilenoximetilimino, o similares. Preferiblemente, el conector puede contener un grupo metilencarbonilamino y un grupo metilendimetilimino.

10 En la molécula de ssPN de la presente invención, por ejemplo, al menos uno de un resto de nucleótido en el extremo en la posición 3' y un resto de nucleótido en el extremo en la posición 5' se puede modificar. Por ejemplo, el resto de nucleótido en uno cualquiera del extremo en la posición 3' y el extremo en la posición 5' se puede modificar, o los restos de nucleótido tanto en el extremo en la posición 3' como en el extremo en la posición 5' se pueden modificar. La modificación mencionada anteriormente puede ser, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, y es preferible modificar un grupo(s) fosfato en el extremo(s). Por ejemplo, todo el grupo fosfato mencionado anteriormente se puede de modificar, o uno o más átomos en el grupo fosfato mencionado anteriormente se pueden modificar. En el caso anterior, por ejemplo, todo el grupo fosfato se puede sustituir o someter a delección.

15 La modificación del resto(s) de nucleótido mencionado anteriormente en el extremo(s) puede ser, por ejemplo, adición de cualquier otra molécula. Los ejemplos de la otra molécula mencionada anteriormente incluyen moléculas funcionales tales como sustancias de etiquetado como se ha descrito anteriormente y grupos protectores. Los ejemplos de los grupos protectores mencionados anteriormente incluyen S (azufre), Si (silicio), B (boro), y grupos que contienen éster. Las moléculas funcionales tales como las sustancias de etiquetado mencionadas anteriormente se pueden usar, por ejemplo, en la detección y similares de la molécula de ssPN de la presente invención.

20 La otra molécula mencionada anteriormente se puede añadir, por ejemplo, al grupo fosfato del resto de nucleótido mencionado anteriormente o se puede añadir al grupo fosfato mencionado anteriormente o el resto de azúcar mencionado anteriormente a través de un espaciador. Por ejemplo, el átomo terminal del espaciador mencionado anteriormente se puede añadir o sustituir para uno cualquiera de los oxígenos enlazantes mencionados anteriormente del grupo fosfato mencionado anteriormente, un O, N, S, o C del resto de azúcar. Sitio de unión en el resto de azúcar mencionado anteriormente es preferiblemente es, por ejemplo, C en el extremo en la posición 3', C en el extremo en la posición 5', o cualquier átomo unido a esto. Por ejemplo, el espaciador mencionado anteriormente también se puede añadir o sustituir para un átomo terminal de la alternativa de nucleótido mencionada anteriormente tal como PNA.

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

30 Otros ejemplos de la molécula mencionada anteriormente a añadir en el extremo incluyen colorantes, agentes de intercalado (p. ej., acridinas), agentes de reticulación (p. ej., psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, safirina), hidrocarburos aromáticos policíclicos (p. ej., fenazina, dihidrofenazina), endonucleasas artificiales (p. ej., EDTA), vehículos lipófilos (p. ej., colesterol, ácido cólico, ácido adamantano acético, ácido 1-pirenobutírico, dihidrotestosterona, 1,3-Bis-O(hexadecil)glicerol, un grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, un grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico, ácido O3-(oleoil)cólico, dimetoxitritilo, o fenoxatiino), complejos peptídicos (p. ej., péptido Antennapedia, péptido Tat), agentes de alquilación, fosfato, amino, mercapto, PEG (p. ej., PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radioetiquetados, enzimas, haptenos (p. ej., biotina), facilitadores del transporte/absorción (p. ej., aspirina, vitamina E, ácido fólico), y ribonucleasas sintéticas (p. ej., imidazol, bisimidazol, histamina, grupos de imidazol, complejos de acridina-imidazol, complejos de Eu^{3+} de tetraazamacrociclos).

35 En la molécula de ssPN de la presente invención, por ejemplo, el extremo en la posición 5' mencionado anteriormente se puede modificar con un grupo fosfato o un análogo de grupo fosfato. Los ejemplos de la fosforilación mencionada anteriormente incluyen:

5'-monofosfato $((HO)_2(O)P-O-5')$;

5'-difosfato $((HO)_2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')$;

5'-trifosfato $((HO)_2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')$;

protección de 5'-guanosina (7-metilada o no metilada, 7m-G-O-5'-

55 $(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')$;

protección de 5'-adenosina (A_{pp});

cualquier estructura de protección de nucleótido modificada o sin modificar (N-O-5'-

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

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

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

5'-fosfortiolato ((HO)₂ (O) P-S-5');

monofosfato sustituido con azufre, difosfato, y

trifosfatos (p. ej., 5'-α-tiotrifosfato, 5'-γ-

tiotrifosfato, y similares);

10 5'-fosforamidatos ((HO)₂ (O) P-NH-5', (HO) (NH₂) (O) P-O-5');

5'-alquilfosfonatos (p. ej., RP (OH) (O) -O-5', (OH)₂ (O) P-5'-CH₂,

en el que R es alquilo (p. ej., metilo, etilo, isopropilo, propilo, o similares)); y

5'-alquiléterfosfonatos (p. ej., RP(OH) (O)-O-5', en el que R es alquiléter (p. ej., metoximetilo, etoximetilo, o similares)).

15 En el resto de nucleótido mencionado anteriormente, la base mencionada anteriormente no está limitada en particular. La base mencionada anteriormente puede ser, por ejemplo, una base natural o una base no natural. La base mencionada anteriormente puede ser, por ejemplo, una base de origen natural o una base sintética. Como la base mencionada anteriormente se puede usar, por ejemplo, una base común, un análogo modificado de la misma, y similares.

20 Los ejemplos de la base mencionada anteriormente incluyen: bases de purina tales como adenina y guanina; y bases de pirimidina tales como citosina, uracilo, y timina. Otros ejemplos de la base mencionada anteriormente incluyen inosina, timina, xantina, hipoxantina, nubularina, isoguanisina, y tubercidina. Los ejemplos de la base mencionada anteriormente también incluyen: 2-aminoadenina, derivados de alquilo tales como purina 6-metilada;

25 derivados de alquilo tales como purina 2-propilada; 5-halouracilo y 5-halocitosina; 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina; 6-azouracilo, 6-azocitosina, y 6-azotimina; 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 5-halouracilo, 5-(2-aminopropil)uracilo, 5-aminoaliluracilo; purinas 8-halogenadas, aminadas, tioladas, tioalquiladas, hidroxiladas, y otras purinas 8-sustituidas; pirimidinas 5-trifluorometiladas y pirimidinas 5-sustituidas; 7-metilguanina; pirimidinas 5-sustituidas; 6-azapirimidinas; N-2, N-6, y purinas sustituidas en O-6 (incluyendo 2-aminopropiladenina); 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina; dihidrouacilo; 3-desaza-5-azacitosina; 2-aminopurina; 5-alquiluracilo; 7-

30 alquilguanina; 5-alquilcitosina; 7-desazaadenina; N₆,N₆-dimetiladenina; 2,6-diaminopurina; 5-amino-alil-uracilo; N₃-metiluracilo; 1,2,4-triazoles sustituidos; 2-piridinona; 5-nitroindol; 3-nitropirrol; 5-metoxiuracilo; ácido uracil-5-oxiacético; 5-metoxicarbonilmetiluracilo; 5-metil-2-tiouracilo; 5-metoxicarbonilmetil-2-tiouracilo; 5-metilaminometil-2-tiouracilo; 3-(3-amino-3-carboxipropil)uracilo; 3-metilcitosina; 5-metilcitosina; N⁴-acetilcitosina; 2-tiocitosina; N₆-metiladenina; N₆-isopentiladenina; 2-metil-6-isopenteniladenina; N-metilguanina; y bases O-alquiladas.

35 Los ejemplos de las purinas y pirimidinas incluyen los que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 3.687.808, "Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering", pp. 858 a 859, editado por Kroschwitz J. I, John Wiley & Sons, 1990, y Englisch *et al.*, *Angewandte Chemie*, Edición Internacional, 1991, vol. 30, p. 613.

Otros ejemplos del resto de nucleótido mencionado anteriormente incluyen los que no tienen base, es decir, los que tienen una estructura principal de ribofosfato abásico. Además, como resto de nucleótido mencionado anteriormente, por ejemplo, se pueden usar los que se describen en la Solicitud Provisional de Estados Unidos N.º 60/465.665 (fecha de presentación: 25 de abril de 2003) y en la Solicitud Internacional N.º PCT/US04/07070 (fecha de presentación: 8 de marzo de 2004).

3. Método de síntesis de la molécula de ssPN de la presente invención

45 El método para sintetizar la molécula de ssPN de la presente invención no está limitado en particular, y se puede usar un método conocido de forma convencional. Los ejemplos del método de síntesis mencionado anteriormente incluyen métodos de síntesis según procedimientos de ingeniería genética y métodos de síntesis química. Los ejemplos de procedimientos de ingeniería genética incluyen: métodos de síntesis que usando transcripción *in vitro*; métodos que usan un vector; métodos realizados usando un casete de PCR y similares. El mencionado vector anteriormente no está limitado en particular, y los ejemplos del mismo incluyen vectores no virales tales como plásmido, y vectores virales, que no se limitan a esto. Los métodos de síntesis química mencionados anteriormente no están limitados en particular, y los ejemplos de los mismos incluyen un método de fosforamidita y un método de H-fosfonato. Los métodos de síntesis química mencionados anteriormente se pueden realizar, por ejemplo, usando

un sintetizador de ácidos nucleicos automatizado disponible en el mercado. En los métodos de síntesis química mencionados anteriormente, por lo general se usa una amidita. La mencionada amidita anteriormente no está limitada en particular. Los ejemplos de amiditas disponibles en el mercado incluyen Fosforamiditas de ARN (2'-O-TBDMSi, nombre comercial, Samchully Pharm. Co., Ltd.), amidita de ACE, amidita de TOM, amidita de CEE, amidita de CEM, y amidita de TEM. En la síntesis de la molécula de ssPN de la presente invención, es preferible usar, por ejemplo, el monómero de la presente invención que se describirá a continuación para la síntesis de la región conectora(s) representada con la fórmula mencionada anteriormente (I).

4. Composición

La composición inhibidora de la expresión según la presente invención es, como se ha descrito anteriormente, una composición para inhibir la expresión de un gen diana, que contiene la molécula de ssPN de la presente invención mencionada anteriormente. La composición de la presente invención se caracteriza por que contiene la molécula de ssPN de la presente invención mencionada anteriormente, y otras configuraciones no están limitadas en modo alguno. La composición inhibidora de la expresión de la presente invención también se puede denominar, por ejemplo, reactivo inhibidor de la expresión.

Según la presente invención, por ejemplo, mediante la administración a un sujeto en el que está presente el gen diana mencionado anteriormente, es posible inhibir la expresión del gen diana mencionado anteriormente.

Además, como se ha descrito anteriormente, la composición farmacéutica según la presente invención contiene la molécula de ssPN de la presente invención mencionada anteriormente. La composición de la presente invención se caracteriza por que contiene la molécula de ssPN de la presente invención mencionada anteriormente, y otras configuraciones no están limitadas en modo alguno. La composición farmacéutica de la presente invención también se puede denominar, por ejemplo, producto farmacéutico.

Según la presente invención, por ejemplo, la administración un paciente con una enfermedad causada por un gen puede inhibir la expresión del gen mencionado anteriormente, tratando de ese modo la enfermedad mencionada anteriormente. En la presente invención, el término "tratamiento" incluye, como se ha mencionado anteriormente, prevención de las enfermedades mencionadas anteriormente; mejora de las enfermedades ases; y mejora de los pronósticos, por ejemplo, y puede hacer referencia a cualquiera de ellos.

En la presente invención, una enfermedad a tratar no está limitada en particular, y los ejemplos de la misma incluyen enfermedades causadas por la expresión de genes. Dependiendo del tipo de enfermedad mencionada anteriormente, un gen que causa la enfermedad se puede establecer como el gen diana mencionado anteriormente, y además, dependiendo del gen diana mencionado anteriormente, la secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente se puede establecer con apropiada.

Un ejemplo específico es el que sigue a continuación. Estableciendo el gen TGF- β 1 mencionado anteriormente como el gen diana mencionado anteriormente e incorporando una secuencia inhibidora de la expresión para el gen mencionado anteriormente en la molécula de ssPN mencionada anteriormente, la molécula de ssPN se puede usar para tratamiento de, por ejemplo, enfermedades inflamatorias, de forma específica, lesión pulmonar aguda y similares.

El método de uso de la composición inhibidora de la expresión y la composición farmacéutica según la presente invención (en lo sucesivo en la presente memoria, ambas composiciones se denomina simplemente "composiciones") no están limitados en particular, y los ejemplos de los mismos incluyen la administración de la molécula de ssPN mencionada anteriormente a un sujeto que tiene el gen diana mencionado anteriormente.

Los ejemplos del sujeto mencionado anteriormente al que se le administra la molécula de ssPN de la presente invención incluyen células, tejidos, órganos y similares. Los ejemplos del sujeto mencionado anteriormente también incluyen seres humanos, animales no humanos y similares tales como mamíferos no humanos, es decir, mamíferos excluyendo los seres humanos. La administración mencionada anteriormente se puede realizar, por ejemplo, *in vivo* o *in vitro*. Las células mencionadas anteriormente no están limitadas en particular, y los ejemplos de las mismas incluyen: diversas células cultivadas tales como células HeLa, células 293, células NIH3T3, y células COS; células madre tales como un células ES y células madre hematopoyéticas; y células aisladas de organismos vivos, tales como células cultivadas primarias.

El método de administración mencionado anteriormente no está limitado en particular, y se puede determinar, por ejemplo, según sea apropiado dependiendo del sujeto. Cuando el sujeto mencionado anteriormente es una célula cultivada, el método de administración puede ser, por ejemplo, un método que usa un reactivo de transfección, un método de electroporación o similares. Cuando la administración mencionada anteriormente se realiza *in vivo*, la administración puede ser, por ejemplo, cualquier administración oral o administración parenteral. Los ejemplos de la administración parenteral mencionada anteriormente incluyen inyección, administración subcutánea y administración local.

Por ejemplo, cada una de las composiciones de la presente invención puede contener solamente la molécula de ssPN de la presente invención o puede contener adicionalmente un aditivo(s) además de la molécula de ssPN. El

aditivo mencionado anteriormente no está limitado en particular, y que es preferiblemente, por ejemplo, un aditivo farmacéuticamente aceptable. El tipo de aditivo mencionado anteriormente no está limitado en particular, y se puede seleccionar según sea apropiado dependiendo, por ejemplo, del tipo de sujeto.

5 En la composición de la presente invención, por ejemplo, la molécula de ssPN mencionada anteriormente puede formar un complejo con el aditivo mencionado anteriormente. El aditivo mencionado anteriormente también se puede denominar, por ejemplo, agente formador de complejos. El mencionado complejo anteriormente permite que, por ejemplo, la molécula de ssPN mencionada anteriormente se administre de forma eficaz. El enlace entre la molécula de ssPN mencionada anteriormente y el agente formador de complejos mencionado anteriormente no está limitado en particular, y los ejemplos del mismo incluyen en las que no covalente y similares. El complejo mencionado anteriormente puede ser, por ejemplo, un complejo de inclusión y similares.

10 El agente formador de complejos mencionado anteriormente no está limitado en particular, y los ejemplos del mismo incluyen polímeros, ciclodextrinas, y adamantina. Los ejemplos de las ciclodextrinas mencionadas anteriormente incluyen copolímeros de ciclodextrina lineal y copolímeros de ciclodextrina oxidada lineal.

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

20 Por ejemplo, el vehículo mencionado anteriormente es preferiblemente un polímero, más preferiblemente un biopolímero. Preferiblemente, el vehículo mencionado anteriormente es, por ejemplo, biodegradable. Los ejemplos del vehículo mencionado anteriormente incluyen: proteínas tales como albúmina de suero humano (HSA), lipoproteína de baja densidad (LDL), y globulina; carbohidratos tales como, por ejemplo, dextrano, pululano, quitina, quitosano, inulina, ciclodextrina, y ácido hialurónico; y lípidos. Como el vehículo mencionado anteriormente, por ejemplo, también se puede usar un polímero sintético tal como un poliaminoácido sintético. Los ejemplos del poliaminoácido mencionado anteriormente incluyen polilisina (PLL), ácido poli-L-aspártico, ácido poli-L-glutámico, copolímero de estireno-anhídrido maleico, copolímero de poli(L-lactida-co-glicólido), copolímero de divinil éter-anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímero de N-isopropilacrilamida, y polifosfazina.

25 Los ejemplos de la sustancia de unión mencionada anteriormente incluyen hormona estimulante tiroidea, hormona estimulante de melanocitos, lectina, glicoproteínas, proteína A tensioactiva, carbohidrato de mucina, lactosa polivalente, galactosa polivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-gulucosamina, manosa polivalente, fucosa polivalente, poliaminoácido glicosilado, galactosa polivalente, transferrina, bisfosfonato, ácido poliglutámico, ácido poliaspártico, lípidos, colesterol, esteroides, ácidos biliares, folato, vitamina B12, biotina, Neproxin, péptido de RGD, y mimético de péptido de RGD.

30 Los ejemplos del agente fusogénico y del agente de condensación mencionados anteriormente incluyen cadenas de poliamino tales como polietilenimina (PEI). Por ejemplo, la PEI puede ser lineal o ramificada, y también puede ser sintética o de origen natural. La PEI mencionada anteriormente puede estar, por ejemplo, incluida con un alquilo o un lípido. Como agente fusogénico mencionado anteriormente, también es posible usar, por ejemplo, polihistidina, poliimidazol, polipiridina, polipropilenoimina, melitina, una sustancia poliactal (p. ej., poliactal catiónico o similares), o similares. El agente fusogénico mencionado anteriormente puede tener, por ejemplo, una estructura de hélice α . El agente fusogénico mencionado anteriormente puede ser, por ejemplo, un agente de alteración de la membrana tal como melitina.

35 Como las composiciones según la presente invención, por ejemplo, las descripciones con respecto a la formación del complejo mencionado anteriormente y similares se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.509.323, Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 2003/0008818, documento PCT/US04/07070.

40 Otros ejemplos del aditivo mencionado anteriormente incluyen moléculas anfífilas y similares. La molécula anfífila mencionada anteriormente es, por ejemplo, una molécula que tiene una región hidrófoba y una región hidrófila. La molécula mencionada anteriormente es, por ejemplo, preferiblemente un polímero. El polímero mencionado anteriormente puede tener, por ejemplo, una estructura secundaria, preferiblemente una estructura secundaria de repetición. De forma específica, por ejemplo, es preferible un polipéptido, y son más preferibles polipéptido de hélice α y similares.

45 El polímero anfífilo mencionado anteriormente puede ser, por ejemplo, un polímero que tenga dos o más subunidades anfífilas. Los ejemplos de la subunidad mencionada anteriormente incluyen subunidades con una estructura cíclica que tengan al menos un grupo hidrófilo y un grupo hidrófobo, y similares. La subunidad mencionada anteriormente puede contener, por ejemplo, esteroide tal como ácido cólico, una estructura aromática, y similares. El polímero mencionado anteriormente puede contener, por ejemplo, tanto una subunidad de estructura cíclica, tal como una subunidad aromática, como un aminoácido.

50 5. Método de inhibición de la expresión

55 El método de inhibición de la expresión *in vitro* según la presente invención es, como se ha descrito anteriormente, un método para inhibir la expresión de un gen diana, en el que se usa la molécula de ssPN de la presente invención

mencionada anteriormente. El método de inhibición de la expresión *in vitro* de la presente invención se caracteriza por que la molécula de ssPN de la presente invención mencionada anteriormente se usa en el mismo, y otras etapas y condiciones no están limitadas en modo alguno.

5 En el método de inhibición de la expresión *in vitro* de la presente invención, el mecanismo por el que se inhibe la expresión genética mencionada anteriormente no está limitado en particular, y los ejemplos del mismo incluyen inhibición de la expresión con ARN de interferencia, y similares. El método de inhibición de la expresión *in vitro* de la presente invención es, por ejemplo, un método para inducir ARN de interferencia que inhibe la expresión mencionada anteriormente de un gen diana, y también se puede denominar método para inducir la expresión que se caracteriza por que la molécula de ssPN de la presente invención mencionada anteriormente se usa en el mismo.

10 El método de inhibición de la expresión *in vitro* de la presente invención incluye, por ejemplo, la etapa de administrar la molécula de ssPN mencionada anteriormente a un sujeto en el que está presente el gen diana mencionado anteriormente. Con la etapa de administración mencionada anteriormente, por ejemplo, la molécula de ssPN mencionada anteriormente se pone en contacto con el sujeto mencionado anteriormente al que le se administra la molécula de ssPN. Los ejemplos del sujeto mencionado anteriormente al que se le administra la molécula de ssPN
15 de la presente invención incluyen células, tejidos, órganos y similares. Los ejemplos del sujeto mencionado anteriormente también incluyen seres humanos, animales no humanos y similares tales como mamíferos no humanos, es decir, mamíferos excluyendo los seres humanos. La administración mencionada anteriormente se puede realizar *in vitro*.

20 En el método de inhibición de la expresión *in vitro* de la presente invención, por ejemplo, la molécula de ssPN mencionada anteriormente se puede administrar sola, o se puede administrar la composición de la presente invención mencionada anteriormente que contiene la molécula de ssPN mencionada anteriormente. El método de administración mencionado anteriormente no está limitado en particular y, por ejemplo, se puede seleccionar según sea apropiado dependiendo del tipo de sujeto.

6. Método de tratamiento

25 Como se ha descrito anteriormente, la molécula de ácido nucleico monocatenario para su uso en un método para tratar una enfermedad según la presente invención incluye la etapa de administrar la molécula de ssPN de la presente invención mencionada anteriormente a un paciente, y la molécula de ssPN mencionada anteriormente incluye, como secuencia inhibidora de la expresión mencionada anteriormente, una secuencia que inhibe la expresión de un gen que causa la enfermedad mencionada anteriormente. El método de tratamiento de la presente
30 invención se caracteriza por que la molécula de ssPN de la presente invención mencionada anteriormente se usa en el mismo, y otras etapas y condiciones no están limitadas en modo alguno. La descripción con respecto al método de inhibición de la expresión *in vitro* de la presente invención mencionado anteriormente también se aplica por ejemplo, al método de tratamiento de la presente invención.

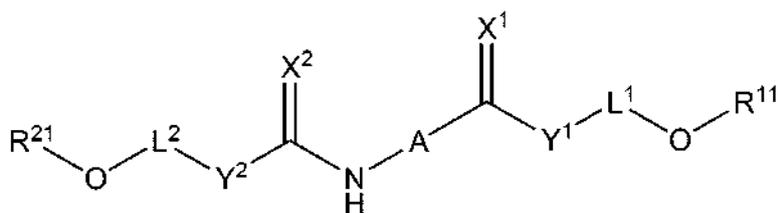
7. Uso de la molécula de ssPN

35 El uso según la presente invención es el uso de la molécula de ssPN de la presente invención mencionada anteriormente para la inhibición de la expresión de un gen diana mencionada anteriormente. Además, el uso según la presente invención es el uso de la molécula de ssPN de la presente invención mencionada anteriormente para inducir ARN de interferencia.

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

8. Monómero

45 El monómero según la presente descripción es un monómero para síntesis de ácido nucleico, que tiene la estructura de la siguiente fórmula (II). La descripción con respecto a la molécula de ssPN mencionada anteriormente también se aplica al monómero de la presente descripción, a menos que se indique de otro modo.



(I I)

Mediante el uso del monómero de la presente descripción, por ejemplo, en la síntesis de la molécula de ssPN mencionada anteriormente, las regiones conectoras (Lx) y (Ly) representadas con la fórmula mencionada anteriormente (I) se pueden sintetizar fácilmente. El monómero de la presente invención puede usar una amidita para síntesis automatizada de ácidos nucleicos, por ejemplo, y se puede aplicar a, por ejemplo, sintetizadores automatizados generales de ácidos nucleicos. Los ejemplos del método de síntesis mencionado anteriormente incluyen un método de fosforamidita y un método de H- fosfonato.

En la fórmula mencionada anteriormente,

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

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

R^{11} y R^{21} son cada uno independientemente H, un grupo protector o un grupo protector de fosfato;

L^1 es una cadena de alquileo que tiene n átomos de carbono, y un átomo de hidrógeno en un átomo de carbono de alquileo que puede estar o no sustituido con OH, OR^a , NH_2 , NHR^a , NR^aR^b , SH, o SR^a , o,

15 L^1 es una cadena de poliéter obtenida por sustitución de al menos un átomo de carbono en la cadena de alquileo mencionada anteriormente con un átomo de oxígeno,

con la condición de que: cuando Y^1 es NH, O, o S, un átomo unido a Y^1 en L^1 es carbono, un átomo unido a OR^{11} en L^1 es carbono, y los átomos de oxígeno son adyacentes entre sí;

L^2 es una cadena de alquileo que tiene m átomos de carbono, y un átomo de hidrógeno en un átomo de carbono de alquileo que puede estar o no sustituido con OH, OR^c , NH_2 , NHR^c , NR^cR^d , SH, o SR^c , o

20 L^2 es una cadena de poliéter obtenida por sustitución de al menos un átomo de carbono en la cadena de alquileo mencionada anteriormente con un átomo de oxígeno,

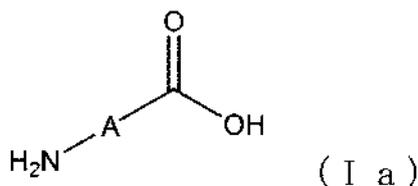
con la condición de que: cuando Y^2 es NH, O, o S, un átomo unido a Y^2 en L^2 es carbono, un átomo unido a OR^{21} en L^2 es carbono, y los átomos de oxígeno son adyacentes entre sí;

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

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

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

A es cualquier grupo atómico, la siguiente fórmula (Ia) es un aminoácido que no es un péptido.



(I a)

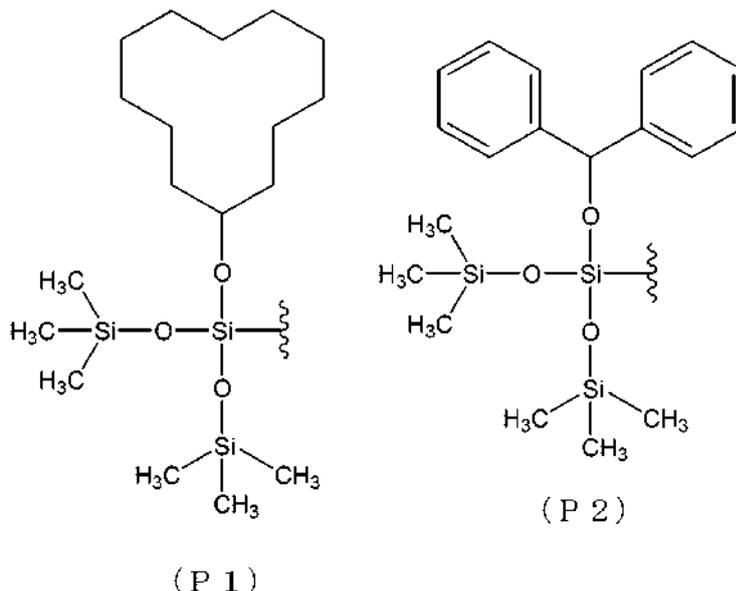
30 Al igual que las partes en común entre la fórmula mencionada anteriormente (II) y la fórmula mencionada anteriormente (I), las descripciones indicadas anteriormente con respecto a la fórmula mencionada anteriormente (I) también se aplican a la fórmula mencionada anteriormente (II).

De forma específica, en la fórmula mencionada anteriormente (II), al igual que X^1 , X^2 , Y^1 , Y^2 , L^1 , L^2 , m, n, y el anillo A, por ejemplo, se aplican todas las descripciones con respecto a los mismos indicadas anteriormente con respecto a la fórmula mencionada anteriormente (I).

En la fórmula mencionada anteriormente (II), R^{11} y R^{21} son cada uno independientemente H, un grupo protector, o un grupo protector de fosfato, como se ha descrito anteriormente.

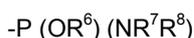
El grupo protector mencionado anteriormente es, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente con respecto a la fórmula mencionada anteriormente (I).

- 5 De forma específica, por ejemplo con el grupo protector se puede seleccionar del Grupo I. El Grupo I mencionado anteriormente incluye, por ejemplo, un grupo dimetoxitritilo (DMTr), un grupo TBDMS, un grupo ACE, un grupo TOM, un grupo CEE, un grupo CEM, un grupo TEM, y grupos que contienen sililo representados con las siguientes fórmulas (P1) o (P2). En particular, es preferible que el grupo protector sea el grupo DMTr o cualquiera de los grupos que contienen sililo mencionados anteriormente.



10

El grupo protector de fosfato mencionado anteriormente se puede representar, por ejemplo, con la siguiente fórmula:



15

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

20

R^7 y R^8 son cada uno un átomo de hidrógeno o cualquier sustituyente, y pueden ser iguales o diferentes. Los sustituyentes R^7 y R^8 son preferiblemente, por ejemplo, grupos hidrocarburo, y el grupo hidrocarburo mencionado anteriormente puede estar o no sustituido adicionalmente con cualquier sustituyente. Los ejemplos del grupo hidrocarburo mencionado anteriormente son los mismos que los enumerados en la descripción mencionada anteriormente con respecto a R^6 , y el grupo hidrocarburo es preferiblemente un grupo metilo, un grupo etilo, o un grupo isopropilo. En este caso, los ejemplos específicos de $-NR^7R^8$ incluyen un grupo diisopropilamino, un grupo dietilamino, y un grupo etilmetilamino. Como alternativa, los sustituyentes R^7 y R^8 están unidos a una forma opcionalmente, junto con el átomo(s) de nitrógeno unidos a los mismos (es decir, $-NR^7R^8$ como un conjunto), un anillo que contiene nitrógeno (p. ej., un grupo piperidilo, un grupo morfolino, o similares).

25

30

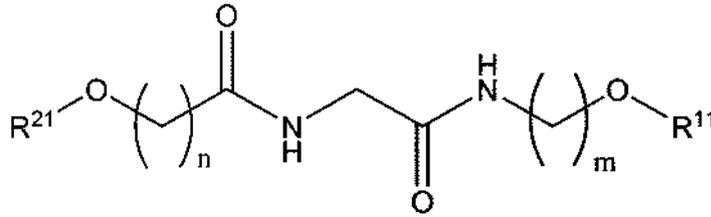
De forma específica, el grupo protector de fosfato mencionado anteriormente se puede seleccionar, por ejemplo, del Grupo II que se describe a continuación. El Grupo II incluye, por ejemplo, $-P(OCH_2CH_2CN)(N(i-Pr)_2)$ y $-P(OCH_3)(N(i-Pr)_2)$. En las fórmulas mencionadas anteriormente, i-Pr indica isopropilo.

35

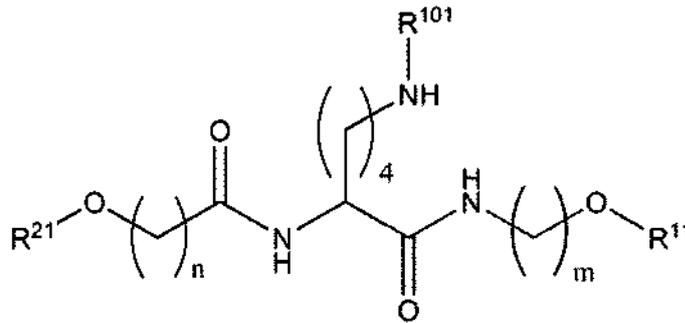
En la fórmula mencionada anteriormente (II), por ejemplo, uno de R^1 y R^2 es H o un grupo protector, y el otro es H o un grupo protector de fosfato. Por ejemplo, es preferible que, cuando R^1 es el grupo protector mencionado anteriormente, R^2 sea H o el grupo protector de fosfato mencionado anteriormente. De forma específica, es preferible que, cuando R^1 se selecciona del Grupo I mencionado anteriormente, R^2 es H o se selecciona del Grupo II mencionado anteriormente. Además, es preferible que, por ejemplo, cuando R^1 es el grupo protector de fosfato

mencionado anteriormente, R^2 sea H o el grupo protector mencionado anteriormente. De forma específica, es preferible que, cuando R^1 se selecciona del Grupo II mencionado anteriormente, R^2 sea H o se selecciona del Grupo I mencionado anteriormente.

5 Un monómero para síntesis de molécula de ácido nucleico de la presente invención, tiene la estructura de la siguiente fórmula (II-1) o (II-4) :



(I I - 1)



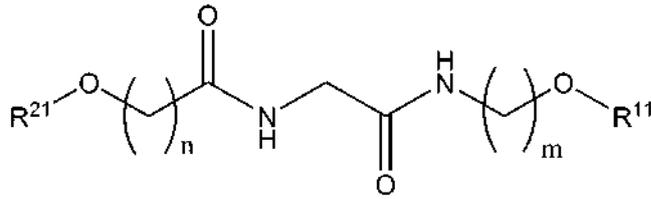
(I I - 4)

en donde R^{11} y R^{21} son cada uno independientemente H, un grupo protector o un grupo protector de fosfato y en la fórmula (II-4), R^{101} es, independientemente de R^{11} y R^{21} , H, un grupo protector o un grupo protector de fosfato,

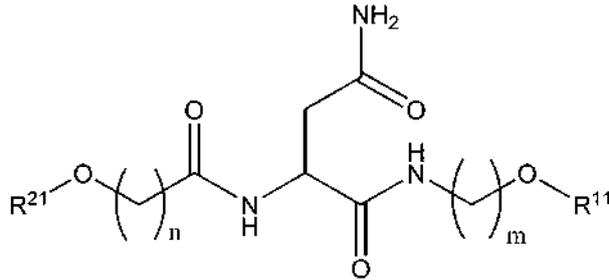
en donde:

- 10 (a) en la fórmula (II-1), $n = 11$ y $m = 12$;
 (b) en la fórmula (II-1), $n = 5$ y $m = 4$; o
 (c) en la fórmula (II-4), $n = 5$ y $m = 4$.

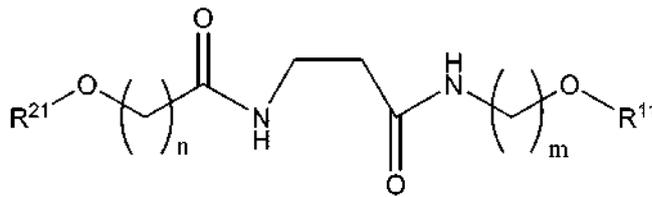
15 En la presente memoria también se describen ejemplos de la estructura de la fórmula mencionada anteriormente (II) que incluyen las siguientes fórmulas (II-1) a (II-4). En las siguientes fórmulas, n y m son los mismos que en la fórmula mencionada anteriormente (II).



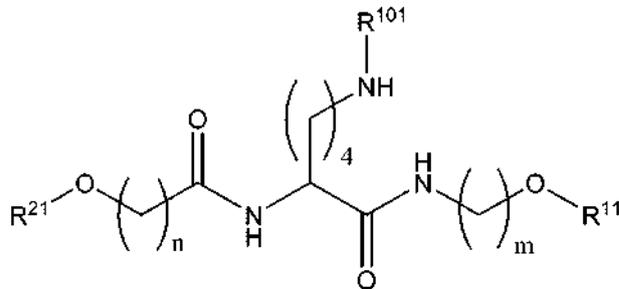
(II-1)



(II-2)



(II-3)



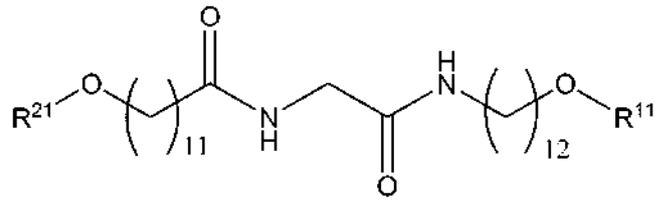
(II-4)

En la fórmula mencionada anteriormente (II-4), R^{101} es, independientemente de R^{11} y R^{21} , H, un grupo protector o un grupo protector de fosfato. El grupo protector mencionado anteriormente y el grupo protector de fosfato mencionado anteriormente para R^{101} no están limitados en particular y pueden ser los mismos, por ejemplo, R^{11} y R^{21} , un grupo perfluoroalcanoilo tal como Tfa (grupo trifluoroacetilo) y similares, Fmoc (grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo) y similares.

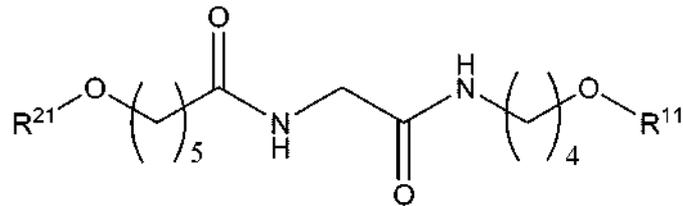
5

10

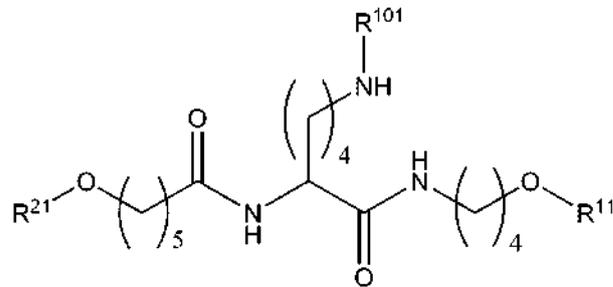
En las fórmulas mencionadas anteriormente (II-1) - (II-4), n y m no están limitados en particular y son como se han descrito anteriormente. Un ejemplo específico de las mismas es la fórmula mencionada anteriormente (II-1) en donde $n = 11$ y $m = 12$, y la estructura de la misma se muestra con la siguiente fórmula (II-1a). Otro ejemplo específico es la fórmula mencionada anteriormente (II-1) en donde $n = 5$ y $m = 4$, y la estructura de la misma se muestra con la siguiente fórmula (II-1b). Además otro ejemplo específico es la fórmula mencionada anteriormente (II-4) en donde $n = 5$ y $m = 4$, y la estructura de la misma se muestra con la siguiente fórmula (II-4a).



(II-1a)

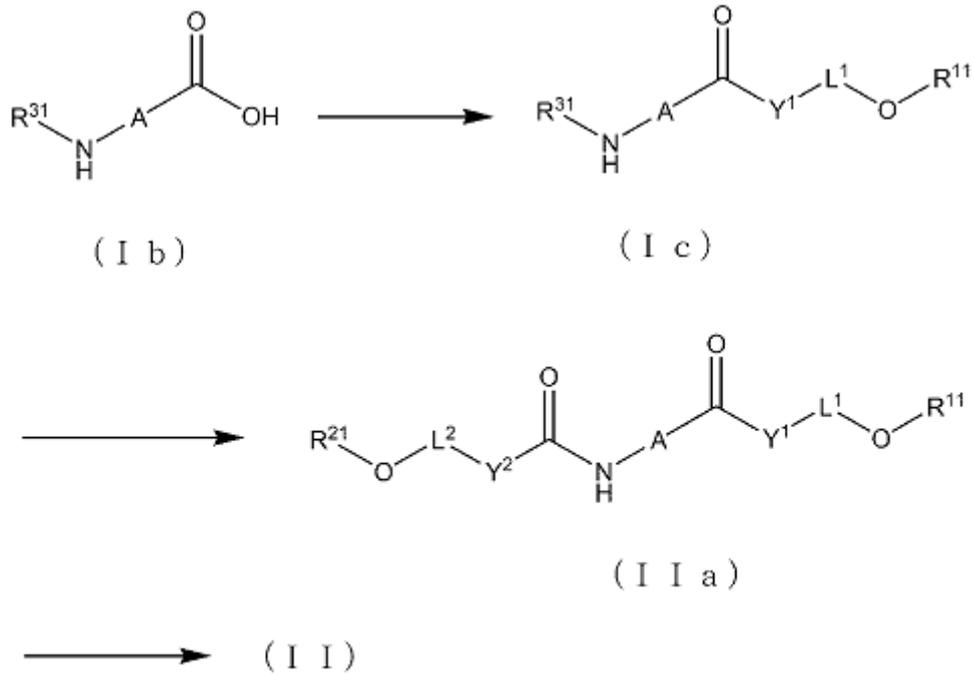


(II-1b)



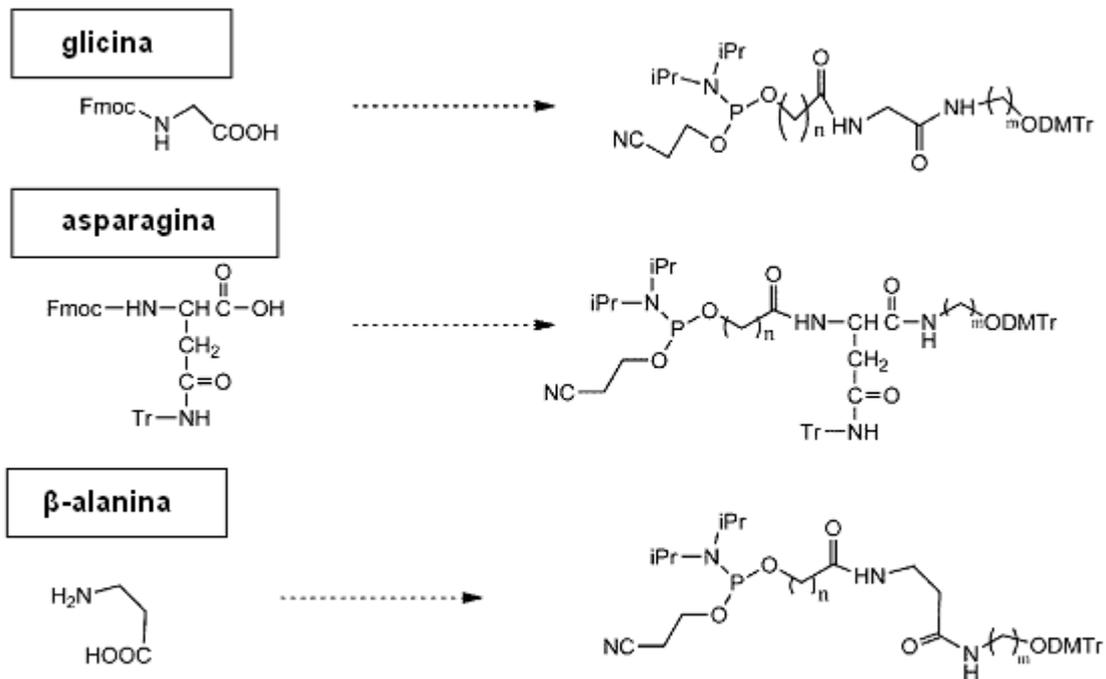
(II-4a)

Aunque el método de producción de un monómero en la presente descripción no está limitado en particular, por ejemplo, como se muestra en el siguiente esquema 1, el siguiente compuesto (Ic) se puede producir a partir del compuesto (Ib), en donde el grupo amino del aminoácido mencionado anteriormente (Ia) está protegido con un grupo protector R^{31} , mediante una reacción de condensación, (IIa) se produce a partir de (Ic), e (IIa) se convierte en (II). El siguiente esquema 1 es un ejemplo y la presente descripción no se limita al mismo. En las siguientes fórmulas químicas (Ib) e (Ic), el grupo protector R^{31} es, por ejemplo, Fmoc (grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo), Z (benciloxicarbonilo), BOC (t-butoxicarbonilo) y similares. En las siguientes fórmulas químicas (Ib), (Ic) e (IIa), Y^1 , Y^2 , L^1 , L^2 , R^{11} y R^{21} son como se han definido para la fórmula mencionada anteriormente (II). El siguiente compuesto (IIa) es un compuesto de la fórmula mencionada anteriormente (II) en donde X^1 es O y X^2 es O. el oxígeno del carbonilo en la siguiente fórmula (II) se puede convertir de manera apropiada en X^1 y X^2 en la fórmula mencionada anteriormente (II). Cuando la conversión no es necesaria, el siguiente compuesto (IIa) se puede usar directamente como el compuesto (II).



esquema 1

5 El monómero y el método de producción del mismo en la presente invención se emplean a modo de ejemplo de manera específica adicionalmente en el siguiente esquema 2. Sin embargo, el siguiente esquema 2 es un ejemplo, y la presente invención no se limita al mismo. En el siguiente esquema 2, "Fmoc" es un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, "iPr" es un grupo isopropilo, "Tr" es un grupo tritilo o grupo trifenilmetilo, y "ODMTr" es un grupo 4,4'-dimetoxitritiloxi. En lo sucesivo en la presente memoria son los mismos.

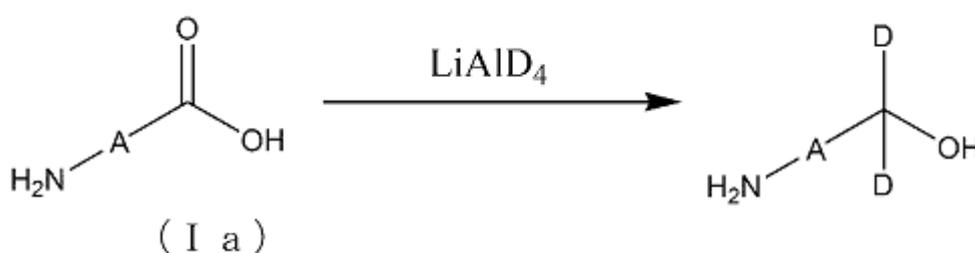


esquema 2

El monómero de la presente invención incluye preferiblemente, por ejemplo, la sustancia de etiquetado mencionada anteriormente. Es particularmente preferible que el monómero de la presente invención incluya el isótopo estable mencionado anteriormente. La sustancia de etiquetado mencionada anteriormente es como se ha descrito anteriormente.

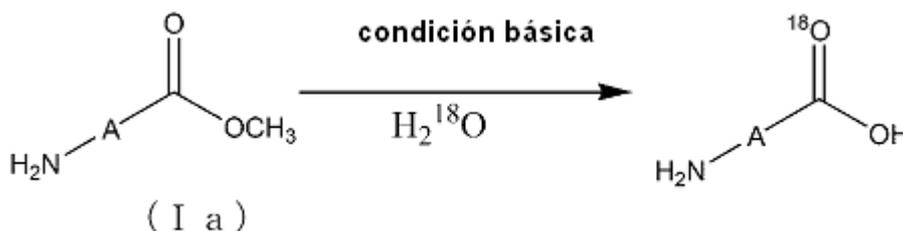
- 5 Cuando el monómero de la presente invención incluye un isótopo tal como el isótopo estable mencionado anteriormente, el isótopo mencionado anteriormente se puede introducir fácilmente en la molécula de ssPN de la presente invención mencionada anteriormente. Los monómeros que incluyen un isótopo descrito en la presente memoria se pueden sintetizar por ejemplo, a partir de un material de partida de aminoácido (Ia) en el que se introduce el isótopo mencionado anteriormente. En la presente descripción, un método para obtener el aminoácido (Ia) en el que se introduce un isótopo no está limitado en particular. Por ejemplo, se puede producir mediante un
10 método apropiado, o se pueden usar un producto disponible en el mercado.

Como aminoácido en el que se introduce un isótopo estable, por ejemplo, se puede producir un aminoácido en el que se introduce un hidrógeno pesado (D) por tratamiento del aminoácido (Ia) con LiAlD_4 , como se muestra en el siguiente esquema 3, y oxidando adicionalmente el grupo OH resultante.



esquema 3

- 15 Como aminoácido en el que se introduce otro isótopo estable, por ejemplo, se puede producir un oxígeno en el que se introduce un hidrógeno pesado (^{18}O) por reacción de éster de metilo de aminoácido (Ia) con H_2^{18}O en una condición básica, como se muestra en la siguiente fórmula.



esquema 4

- 20 Además, el método de producción de aminoácido (Ia) que incluye la producción de nitrógeno pesado (^{15}N) o carbono pesado (^{13}C) y similares no está limitado en particular, y se puede producir con un método apropiado.

Un monómero que tiene un isótopo estable introducido en el mismo se puede sintetizar de la manera que se ha descrito anteriormente. Usando el monómero mencionado anteriormente como amidita para síntesis, se puede sintetizar una molécula de ácido nucleico en la que se introduce un isótopo estable en la región conectora mencionada anteriormente.

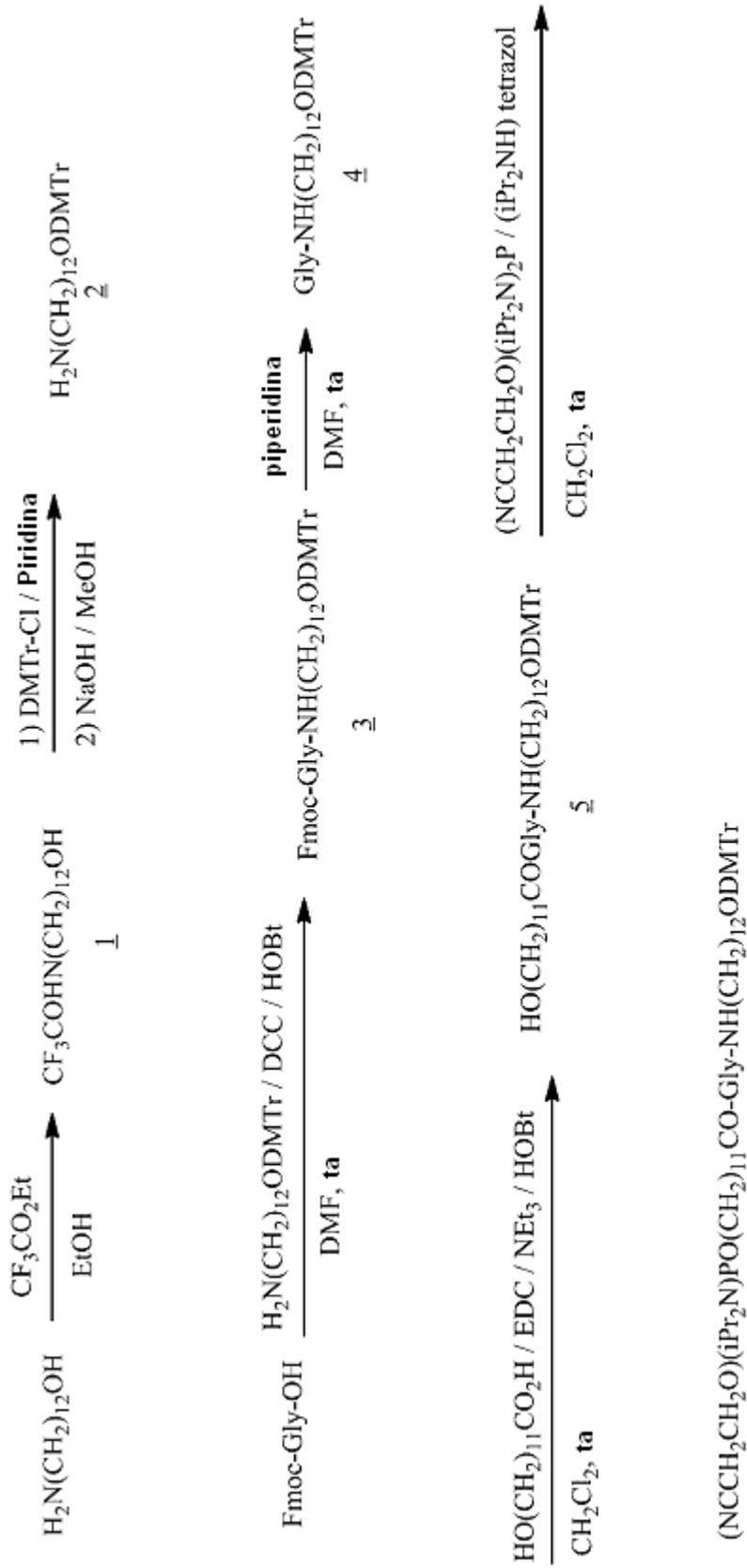
- 25 En lo sucesivo, la presente invención se describirá con detalle por referencia a ejemplos y similares.

Ejemplos

(Ejemplo A1)

- 30 Según el siguiente esquema 5, se sintetizó fosforamidita de dodecanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamido (6). El compuesto (6) es una realización del monómero de la presente invención mencionado anteriormente. "Gly" en el siguiente esquema 5 es una estructura representada con la siguiente fórmula, es decir, un grupo atómico que tiene una estructura en donde un átomo de hidrógeno del grupo amino y OH del grupo carboxi se retiraron de la glicina. En lo sucesivo, a menos que se indique de otro modo, "Gly" muestra una estructura de la siguiente fórmula. En el siguiente esquema 5, la cadena lateral de NH de Gly se une a Fmoc o carbono del carbonilo, y la cadena lateral de carbono del carbonilo (CO) de Gly se une a OH o átomo de N.

- 35 (Gly)
-HN-CH₂-CO-



6

esquema 5

(1) 12-Trifluoroacetamidododecanol (compuesto 1)

Una solución (100 ml) de 12-aminododecanol (4,81 g, 23,9 mmol) y trifluoroacetato de etilo (6,79 g, 47,8 mmol) en etanol se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar 12-trifluoroacetamidododecanol (1) (6,98 g, c.) en forma de un jarabe incoloro.

5 (2) 12-(4,4'-Dimetoxitritiloxi)dodecanamina (compuesto 2)

El compuesto 1 (3,00 g, 10,08 mmol) se secó de forma azeotrópica tres veces con piridina anhidra. Al residuo se añadieron cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (4,32 g, 12,1 mmol) y piridina anhidra (50 ml) mediante azeotropía, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. A la mezcla de reacción obtenida se añadió metanol (10 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, y el disolvente se evaporó a aproximadamente 30 ml a presión reducida a temperatura ambiente. A partir de ese momento, se añadió diclorometano (200 ml), y la mezcla se lavó tres veces con bicarbonato sódico acuoso saturado, y se lavó adicionalmente con solución salina saturada. Después de secar sobre sulfato sódico, el disolvente se evaporó a presión reducida. A una solución (100 ml) del residuo sin purificar obtenido de este modo en metanol se añadió hidróxido sódico (2,02 g, 50,40 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se concentró a aproximadamente 30 ml a presión reducida, se añadieron agua (100 ml) y diclorometano (200 ml), y la fase orgánica se separó. La fase orgánica separada se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato sódico. A partir de ese momento, el agente desecante (sulfato sódico) se separó por filtración y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano-metanol (95:5) + piridina al 0,05 %) para dar 12-(4,4'-dimetoxitritiloxi)dodecanamina (2) (5,19 g, c.). Los valores analíticos instrumentales de 12-(4,4'-dimetoxitritiloxi)dodecanamina (2) se muestran a continuación.

12-(4,4'-Dimetoxitritiloxi)dodecanamina (2);

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 7,45-7,43 (2H, m), 7,34-7,25 (6H, m), 7,21-7,20 (1H, m), 6,83-6,79 (4H, m), 3,78 (6H, s), 3,04-3,01 (2H, t, J = 6,3 Hz), 2,70-2,67 (2H, t, J = 6,8 Hz), 1,61-1,54 (6H, m), 1,33-1,24 (14H, m).

(3) Fmoc-glicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamida (compuesto 3)

25 A una solución (70 ml) de Fmoc-glicina (Fmoc-Gly-OH, adquirida en Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (2,00 g, 6,73 mmol), dicitlohexilcarbodiimida (1,66 g, 8,07 mmol) y monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol (2,31 g, 16,14 mmol) en N,N-dimetilformamida anhidra se añadió una solución (30 ml) del compuesto 2 (4,07 g, 8,07 mmol) en N,N-dimetilformamida anhidra a temperatura ambiente en una atmósfera de argón, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche en una atmósfera de argón. El precipitado resultante se separó por filtración, y el filtrado se concentró a presión reducida a 35 °C. Al residuo obtenido se le añadió diclorometano (200 ml), y la mezcla se lavó tres veces con bicarbonato sódico acuoso saturado. La fase orgánica se fraccionó y se secó sobre sulfato sódico, y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo obtenido se sometió a cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano-metanol (95:5) + piridina al 0,05 %) para dar Fmoc-glicilglicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamida (3) (5,88 g, c.) en forma de un jarabe incoloro.

35 (4) Glicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamida (compuesto 4)

Al compuesto 3 (5,88 g, 6,73 mmol) se le añadieron N,N-dimetilformamida (10 ml) y piperidina (4,8 ml) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El disolvente en la mezcla de reacción se evaporó a presión reducida, y el residuo obtenido se sometió a cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano-metanol (9:1) + piridina al 0,05 %) para dar glicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamida (4) (3,44 g, 91 %). Los valores analíticos instrumentales de glicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamida (4) se muestran a continuación.

Glicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamida (4);

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 7,47-7,44 (2H, m), 7,33-7,26 (6H, m), 7,21-7,20 (1H, m), 6,83-6,80 (4H, m), 3,79 (6H, s), 3,34 (2H, s), 3,30-3,25 (2H, t, J = 6,6 Hz), 3,06-3,02 (2H, t, J = 6,3 Hz), 1,64-1,50 (6H, m), 1,38-1,25 (14H, m).

45 (5) Hidroxidodecanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamida (compuesto 5)

El compuesto 4 (3,15 g, 5,62 mmol) se secó de forma azeotrópica tres veces con piridina anhidra, se añadieron ácido 12-hidroxidodecanoico (3,41 g, 6,74 mmol), hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (1,29 g, 6,74 mmol), monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol (2,06 g, 13,48 mmol), y diclorometano anhidro (50 ml) a temperatura ambiente en una atmósfera de argón, y la mezcla se agitó durante 10 min. A la mezcla obtenida de este modo se añadió trietilamina (2,05 g, 20,22 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche en una atmósfera de argón. A la mezcla de reacción obtenida de este modo se añadió diclorometano (200 ml), y la mezcla se lavó tres veces con bicarbonato sódico acuoso saturado, y se lavó adicionalmente una vez con solución salina saturada. La fase orgánica se separó y se secó sobre sulfato sódico, y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo obtenido se sometió a cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano-metanol (95:5) + piridina al 0,05 %) para dar hidroxidodecanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamida (5)

(2,97 g, 70 %) en forma de un jarabe incoloro. Los valores analíticos instrumentales de hidroxidodecanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamida (5) se muestran a continuación.

Hidroxidodecanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamida (5);

5 RMN ¹H (CDCl₃): δ = 7,42-7,40 (2H, m), 7,33-7,26 (6H, m), 7,22-7,21 (1H, m), 6,83-6,80 (4H, m), 3,84 (2H, s), 3,79 (6H, s), 3,64-3,61 (2H, t, J = 6,3 Hz), 3,26-3,24 (2H, t, J = 6,1 Hz), 3,08-3,06 (2H, t, J = 5,6 Hz), 2,28-2,24 (2H, t, J = 6,8 Hz), 1,69-1,52 (12H, m), 1,44-1,39 (2 6H, m).

(6) Fosforamidita de dodecanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamida (compuesto 6)

10 El compuesto 5 (2,78 g, 3,76 mmol) se secó de forma azeotrópica tres veces con piridina anhidra. A continuación, se añadió tetrazolida de diisopropilamonio (772 mg, 4,51 mmol), la mezcla se desaireó a presión reducida se cargó con gas argón, y se añadió acetonitrilo anhidro (3 ml). Además, se añadió una solución (3 ml) de fosfordiamidita de 2-
15 cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropilo (1,36 g, 4,51 mmol) en acetonitrilo anhidro-diclorometano, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h en una atmósfera de argón. A la mezcla de reacción obtenida se le añadió diclorometano (150 ml), y la mezcla se lavó dos veces con bicarbonato sódico acuoso saturado, y se lavó
adicionalmente una vez con solución salina saturada. La fase orgánica se separó y se secó sobre sulfato sódico, y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía en columna usando amino sílice (eluyente: n-hexano-acetona (7:3) + piridina al 0,05 %) para dar fosforamidita de dodecanamidoglicina-4,4'-
dimetoxitritiloxidodecanamida (6) (2,72 g, 77 %, HPLC 98,5 %). Los valores analíticos instrumentales de fosforamidita de dodecanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamido (6) se muestran a continuación.

Fosforamidita de dodecanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamido (6);

20 RMN ¹H (CDCl₃): δ = 7,41-7,49 (m, 2H), 7,26-7,30 (m, 6H), 7,17-7,19 (m, 1H), 6,80-6,83 (m, 4H), 6,46-6,62 (m, 2H), 4,07-4,29 (m, 2H), 3,89 (d, J = 5,4 Hz, 2H), 3,75-3,87 (m, 4H), 3,67 (s, 6H), 3,47-3,70 (m, 4H), 3,20-3,26 (m, 2H), 3,02 (t, J = 6,4 Hz, 2H, CH₂), 2,63 (t, 6,4 Hz, 2H, CH₃), 1,56-1,63 (m, 6H), 1,47-1,51 (m, 2H), 1,24-1,33 (m, 26H), 1,13-1,20 (m, 12H):

RMN ³¹P (CDCl₃): δ = 146,62.

25 (Ejemplo B1) Síntesis de ARN en fase sólida

El ARN que tiene el conector de la presente invención (molécula de ácido nucleico monocatenario de la presente invención) se sintetizó. El ARN se sintetizó desde el extremo en la posición 3' hacia el extremo en la posición 5' con un sintetizador de ácidos nucleicos (nombre comercial: Sistema de Síntesis de Ácidos Nucleicos 8909 ABI Expedite (marca comercial registrada), Applied Biosystems) basado en el método de fosforamidita. Para las síntesis
30 mencionadas anteriormente, como amidita de ARN se usaron Fosforamiditas de ARN (2'-O-TBDMSi, nombre comercial, Samchully Pharm. Co., Ltd.) (en lo sucesivo en la presente memoria lo mismo). La amidita mencionada anteriormente se desprotegió con un método convencional, y el ARN sintetizado se purificó por HPLC. En los siguientes ejemplos, el ARN se sintetizó de la misma manera, a menos que se indique de otro modo.

35 Para ser específicos, un ARN monocatenario (ARNss), en donde cada una de las estructuras de las regiones conectoras (Lx) y (Ly) se representan con la siguiente fórmula química Lg, se sintetizó como el ARN (Ej) del presente Ejemplo, usando el compuesto (6) mencionado anteriormente del esquema 5 mencionado anteriormente, el monómero de la presente invención.

(Lg [estructura de Lx o Ly])

-O (CH₂)₁₁CO-Gly-NH (CH₂)₁₂O-

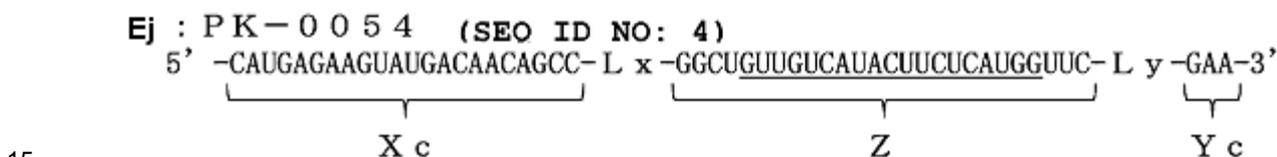
40 En primer lugar, se sintetizó el ARN que la secuencia mostrada por la SEQ ID NO: 1 que sigue a continuación. A continuación, el compuesto 6 mencionado anteriormente se unió al extremo en la posición 5' del ARN mencionado anteriormente. A continuación, el ARN que tiene la secuencia mostrada por la SEQ ID NO: 2 que sigue a continuación se unió a través del compuesto 6 mencionado anteriormente al extremo en la posición 5' del ARN
45 mencionado anteriormente mostrado en la SEQ ID NO: 1. Además, el compuesto 6 mencionado anteriormente se unió al extremo en la posición 5' del ARN mencionado anteriormente mostrado en la SEQ ID NO: 2. Además, el ARNss del Ejemplo se sintetizó uniendo el ARN con la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3 que sigue a continuación con el extremo en la posición 5' del ARN mencionado anteriormente mostrado en la SEQ ID NO: 2, via el compuesto 6 mencionado anteriormente.

5'-GAA-3' (SEQ ID NO: 1)

5'-GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC-3' (SEQ ID NO: 2)

5'-CAUGAGAAGUAUGACAACAGCC-3' (SEQ ID NO: 3)

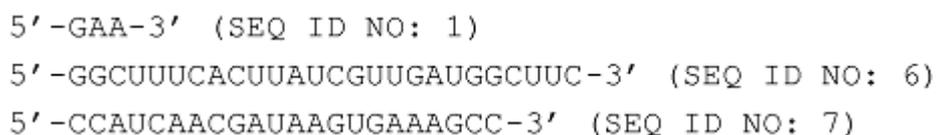
5 El ARNss del Ejemplo sintetizado como se ha mencionado anteriormente se denomina PK-0054 en lo sucesivo en la presente memoria. El mencionado anteriormente PK-0054 tiene una estructura en donde, como se muestra en la SEQ ID NO: 4 que sigue a continuación, el ARN mencionado anteriormente de SEQ ID NO: 3, el ARN mencionado anteriormente de SEQ ID NO: 2, y el ARN mencionado anteriormente de SEQ ID NO: 1 están alineados en este orden desde el extremo en la posición 5', el ARN mencionado anteriormente de SEQ ID NO: 3 (que corresponde a Xc) y el ARN mencionado anteriormente de SEQ ID NO: 2 (que corresponde a la región interna Z) están unidos a través del conector Lx (la estructura Lg mencionada anteriormente), y el ARN mencionado anteriormente de SEQ ID NO: 2 (que corresponde a la región interna Z) y el ARN mencionado anteriormente de SEQ ID NO: 1 (que corresponde a Yc) están unidos a través del conector Ly (la estructura Lg mencionada anteriormente). Además, como se muestra en la siguiente secuencia, la secuencia de ARN mencionada anteriormente de SEQ ID NO: 2 es complementaria a la secuencia de ARN mencionada anteriormente de SEQ ID NOs: 1 y 3. Por lo tanto, el PK-0054 mencionado anteriormente funciona con autohibridación para tener una estructura de tallo, como se muestra en la fórmula que sigue a continuación. En la siguiente secuencia, la parte subrayada "GUUGUCAUACUUCUCAUGG" (SEQ ID NO: 5) es una región implicada en la inhibición de la expresión genética de GAPDH.



Expresión de la región inhibidora de PK-0054 (SEQ ID NO: 5)

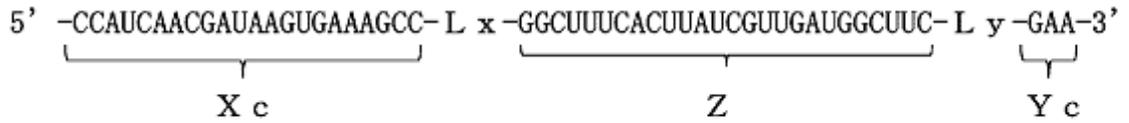


20 De la misma manera que con PK-0054 excepto por que se usó el ARN de la siguiente SEQ ID NO: 6 en lugar del ARN mencionado anteriormente mostrado en la SEQ ID NO: 2, y el ARN de la siguiente SEQ ID NO: 7 se usó en lugar del ARN mencionado anteriormente mostrado en la SEQ ID NO: 3, se sintetizó otro ARNss a modo de Ejemplo. En lo sucesivo en la presente memoria éste se denomina PK-0055.



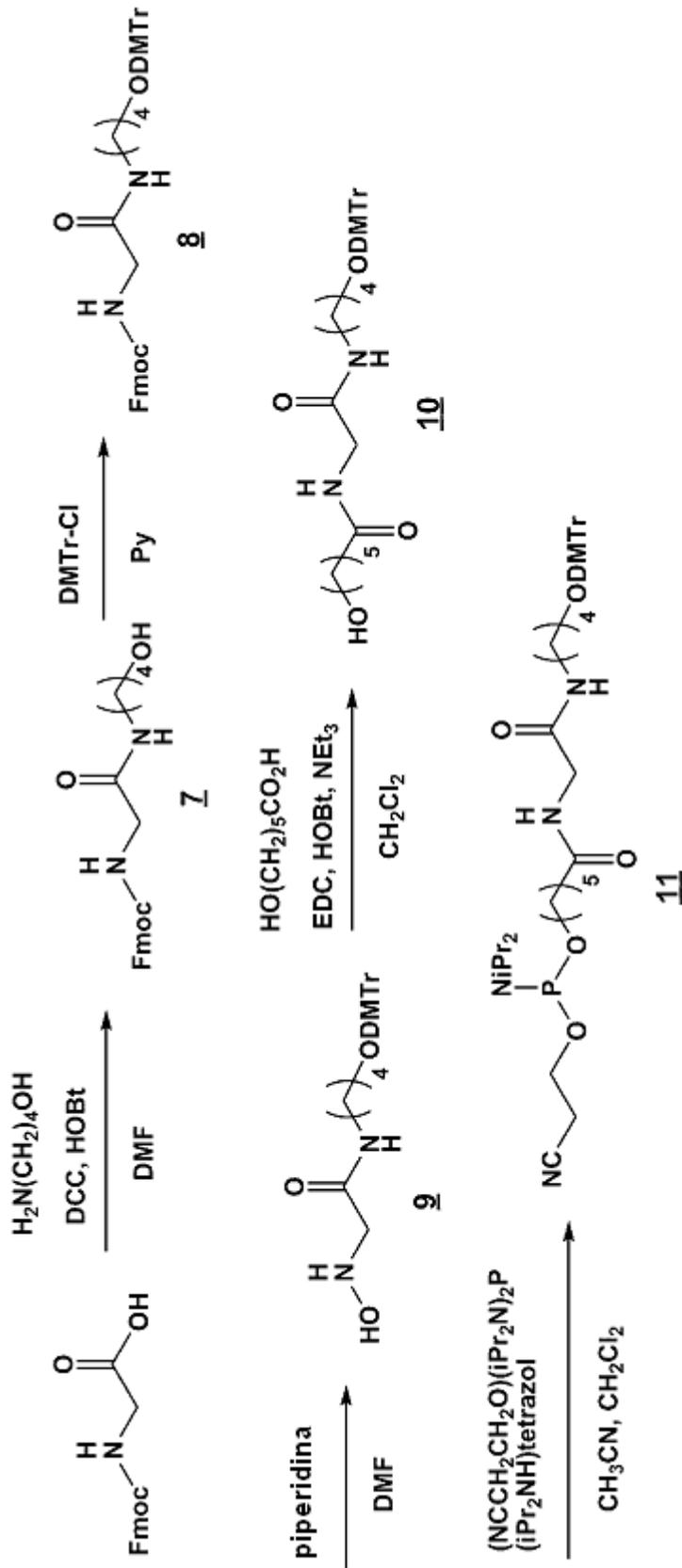
25 El PK-0055 mencionado anteriormente tiene una estructura en donde, como se muestra en la SEQ ID NO: 8 que sigue a continuación, el ARN mencionado anteriormente mostrado en la SEQ ID NO: 7, el ARN mencionado anteriormente mostrado en la SEQ ID NO: 6, y el ARN mencionado anteriormente mostrado en la SEQ ID NO: 1 están alineados en este orden desde el extremo en la posición 5', el ARN mencionado anteriormente mostrado en la SEQ ID NO: 7 (que corresponde a Xc) y el ARN mencionado anteriormente mostrado en la SEQ ID NO: 6 (que corresponde a la región interna Z) están unidos a través del conector Lx (la estructura Lg mencionada anteriormente), y el ARN mencionado anteriormente mostrado en la SEQ ID NO: 6 (que corresponde a la región interna Z) y el ARN mencionado anteriormente mostrado en la SEQ ID NO: 1 (que corresponde a Yc) están unidos a través del conector Ly (la estructura Lg mencionada anteriormente). Además, como se muestra en las secuencias que siguen a continuación, la secuencia de ARN mencionada anteriormente mostrada en la SEQ ID NO: 6 es complementaria a las secuencias de ARN mencionadas anteriormente mostradas en las SEQ ID NOs: 1 y 7. Por lo tanto, el PK-0055 mencionado anteriormente funciona con autohibridación para tener una estructura de tallo, como se muestra en la fórmula que sigue a continuación.

Ej : PK-0055 (SEO ID NO: 8)



(Ejemplo A2)

5 De acuerdo con el siguiente esquema 6, se sintetizó fosforamidita de butanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutanamido (11). El compuesto (11) es una realización del monómero de la presente invención mencionado anteriormente. Además, el compuesto (11) corresponde a un compuesto (6) (esquema 5, Ejemplo A1) en donde la cadena de metileno unida directamente a ambos extremos de -CO-Gly-NH- tiene un índice de carbono diferente.



esquema 6

(1) Fmoc-glicina-butanamida (compuesto 7)

A una solución (100 ml) de Fmoc-glicina (4,00 g, 13,45 mmol), dicitclohexilcarbodiimida (3,33 g, 16,15 mmol) y monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol (4,94 g, 32,29 mmol) en N,N-dimetilformamida anhidra se añadió una solución (30 ml) de 4-aminobutanol (1,44 g, 16,15 mmol) en N,N-dimetilformamida anhidra, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche en una atmósfera de argón. El precipitado resultante se separó por filtración, y el filtrado se concentró a presión reducida. Se añadió diclorometano (200 ml) al residuo obtenido, y la mezcla se lavó tres veces con bicarbonato sódico acuoso saturado, y se lavó adicionalmente con solución salina saturada. Después de secar sobre sulfato sódico, el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo obtenido se sometió a cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano-metanol (95:5)) para dar Fmoc-glicina-butanamida (7) (4,30 g, 87 %). Los valores analíticos instrumentales de Fmoc-glicina-butanamida (7) se muestran a continuación.

Fmoc-glicina-butanamida (7);

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 7,78-7,76 (2H, d, J = 7,3 Hz), 7,65-7,63 (2H, d, J = 7,3 Hz), 7,42-7,41 (2H, t, J = 7,6 Hz), 7,34-7,30 (2H, td, J = 7,6, 1,1 Hz), 4,42-4,40 (2H, d, J = 7,3 Hz), 4,25-4,22 (1H, t, J = 6,8 Hz), 3,83 (2H, s), 3,60-3,55 (2H, m), 3,30-3,25 (2H, m), 1,61-1,55 (4H, m).

(2) Fmoc-glicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutanamida (compuesto 8)

El compuesto 7 (4,20 g, 11,40 mmol) se secó de forma azeotrópica tres veces con piridina anhidra. Se añadieron cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (5,80 g, 17,10 mmol) y piridina anhidra (80 ml) al residuo mediante azeotropía, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Se añadió metanol (20 ml) a la mezcla de reacción obtenida y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, y el disolvente se evaporó a presión reducida. A partir de ese momento, se añadió diclorometano (200 ml), y la mezcla se lavó tres veces con bicarbonato sódico acuoso saturado, y se lavó adicionalmente con solución salina saturada. Después de secar sobre sulfato sódico, el disolvente se evaporó a presión reducida para dar Fmoc-glicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutanamida no purificada (8) (11,40 g).

(3) Glicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutanamida (compuesto 9)

Al compuesto no purificado 8 (11,40 g, 16,99 mmol) se añadieron N,N-dimetilformamida (45 ml) y piperidina (11,7 ml) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El disolvente en la mezcla de reacción se evaporó a presión reducida, y el residuo obtenido se sometió a cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano-metanol (9:1) + piridina al 0,05 %) para dar glicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutanamida (9) (4,90 g, 96 %, 2 etapas). Los valores analíticos instrumentales de glicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutanamida (9) se muestran a continuación.

Glicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutanamida (9);

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 7,44-7,42 (2H, m), 7,33-7,26 (6H, m), 7,21-7,20 (1H, m), 6,83-6,80 (4H, m), 3,79 (6H, s), 3,49 (2H, s), 3,30-3,28 (2H, t, J = 6,3 Hz), 3,09-3,06 (2H, t, J = 5,9 Hz), 1,61-1,55 (4H, m).

(4) Hidroxihexanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutanamida (compuesto 10)

El compuesto 9 (4,80 g, 10,70 mmol) se secó de forma azeotrópica tres veces con piridina anhidra, se añadieron ácido 6-hidroxihexanoico (1,70 g, 12,84 mmol), hidroccloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (2,46 g, 12,84 mmol), monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol (3,93 g, 25,69 mmol), y diclorometano anhidro (60 ml) a temperatura ambiente en una atmósfera de argón, y la mezcla se agitó durante 10 min. Se añadió trietilamina (3,90 g, 38,53 mmol) a la mezcla obtenida de este modo, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche en una atmósfera de argón.

Se añadió diclorometano (200 ml) a la mezcla de reacción obtenida, y la mezcla se lavó tres veces con bicarbonato sódico acuoso saturado, y se lavó adicionalmente una vez con solución salina saturada. La fase orgánica se separó y se secó sobre sulfato sódico, y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo obtenido se sometió a cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano-metanol (95:5) + piridina al 0,05 %) para dar hidroxihexanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutanamida (10) (4,80 g, 80 %). Los valores analíticos instrumentales de hidroxihexanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutanamida (10) se muestran a continuación.

Hidroxihexanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutanamida (10);

RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 7,43-7,40 (2H, m), 7,33-7,26 (6H, m), 7,22-7,20 (1H, m), 6,83-6,80 (4H, m), 3,85 (2H, s), 3,78 (6H, s), 3,63-3,60 (2H, t, J = 6,3 Hz), 3,26-3,23 (2H, t, J = 6,1 Hz), 3,07-3,05 (2H, t, J = 5,6 Hz), 2,26-2,22 (2H, t, J = 7,3 Hz), 1,68-1,52 (8H, m), 1,41-1,36 (2H, m).

(5) Fosforamidita de hidroxihexanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutanamido (compuesto 11)

El compuesto 10 (4,70 g, 8,35 mmol) se secó de forma azeotrópica tres veces con piridina anhidra. A continuación,

se añadió tetrazolida de diisopropilamonio (1,72 g, 10,02 mmol), la mezcla se desaireó a presión reducida y se cargó con gas argón, y se añadió acetonitrilo anhidro (5 ml). Además, se añadió una solución (4 ml) de fosfordiamidita de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropilo (3,02 g, 10,02 mmol) en una mezcla de acetonitrilo anhidro-diclorometano a 1:1, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h en una atmósfera de argón. A la mezcla de reacción obtenida se le añadió diclorometano (150 ml), y la mezcla se lavó dos veces con bicarbonato sódico acuoso saturado, y se lavó adicionalmente una vez con solución salina saturada. La fase orgánica se separó y se secó sobre sulfato sódico, y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía en columna usando amino sílice (eluyente: n-hexano-acetona (3:2) + 0,1 % trietilamina) para dar fosforamidita de hidroxihexanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutanamido (11) (4,50 g, 71 %, HPLC 98,2 %). Los valores analíticos instrumentales de fosforamidita de hidroxihexanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutanamido (11) se muestran a continuación.

Fosforamidita de hidroxihexanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutanamido (11);

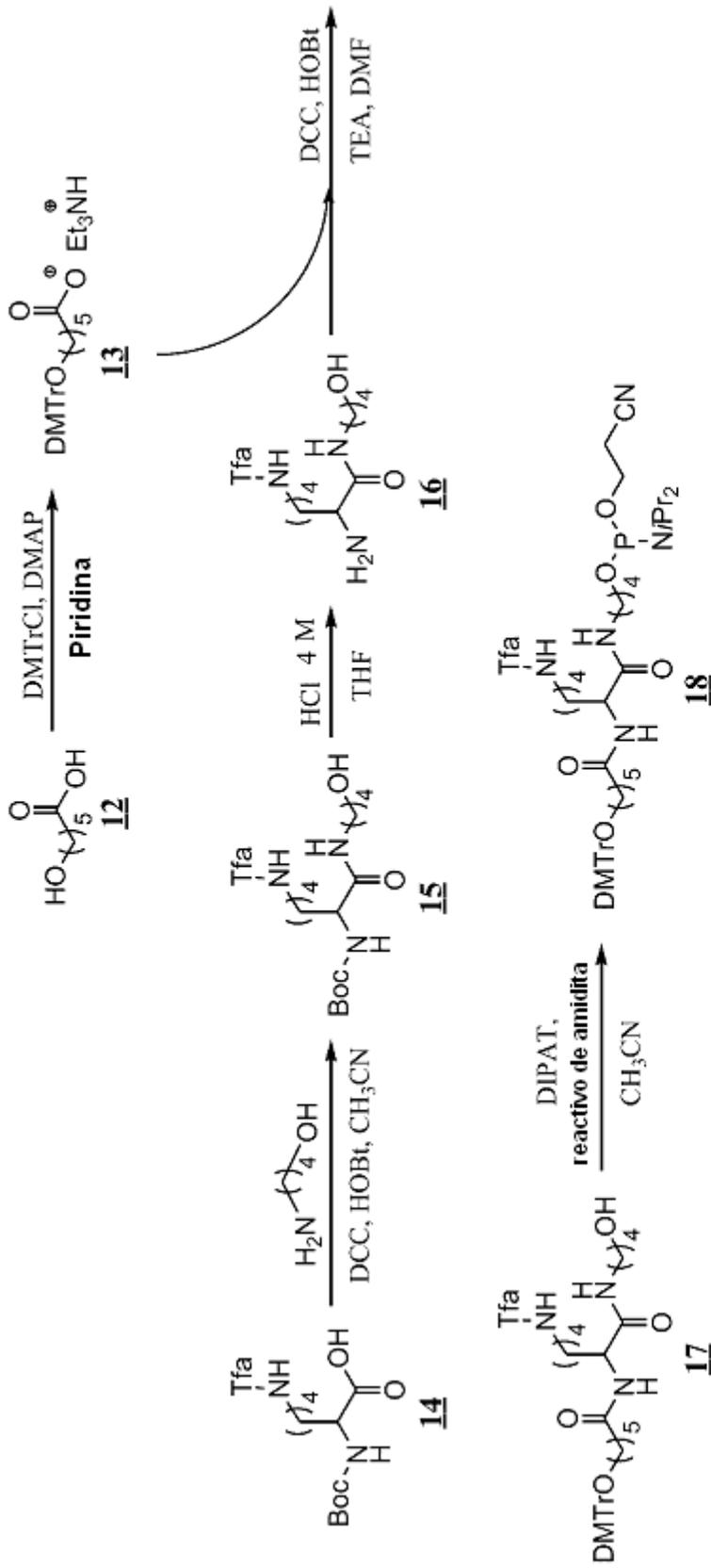
RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 7,43-7,40 (2H, m), 7,33-7,26 (6H, m), 7,22-7,20 (1H, m), 6,83-6,80 (4H, m), 3,85-3,81 (4H, s), 3,78 (6H, s), 3,63-3,61 (2H, t, J = 6,3 Hz), 3,26-3,23 (2H, t, J = 6,1 Hz), 3,05-2,97 (4H, m), 2,64-2,62 (2H, t, J = 6,4 Hz), 2,25-2,23 (2H, t, J = 7,3 Hz), 1,68-1,52 (8H, m), 1,40-1,38 (2H, m), 1,13-1,20 (12H, m).

RMN ^{31}P (CDCl_3) : δ = 146,57.

(Ejemplo A3)

De acuerdo con el siguiente esquema 7, se sintetizó el monómero (11) que es un derivado de lisina. En el siguiente esquema 7, "Tfa" es un grupo trifluoroacetilo.

20



esquema 7

(1) Síntesis del compuesto (13)

A una solución (124 ml) de ácido 6-hidroxihexanoico (compuesto 12) (6 g, 15,1 mmol) en piridina se añadieron cloruro de 4,4'-dimetoxitriilo (20 g, 1,3 equiv.) y dimetilaminopiridina (0,5 g, 0,1 equiv.), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. Después de la finalización de la reacción, se añadió metanol (10 ml), la mezcla se agitó durante 10 min, y el disolvente se evaporó. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo, se lavó tres veces con tampón TEAA (pH 8-9), y se lavó una vez con solución salina saturada. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico, y el disolvente se evaporó a presión reducida para dar el compuesto 13 (31 g, que contiene piridina) en forma de una sustancia oleosa de color amarillo pálido.

(2) Síntesis del compuesto (15)

A una solución (45 ml) del compuesto 14 (2,7 g, 7,9 mmol), dicitclohexilcarbodiimida (1,9 g, 1,2 equiv.), y monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol (2,6 g, 2,4 equiv.) en acetonitrilo se añadió una solución (5 ml) de 4-amino-1-butanol (0,86 g, 1,2 equiv.) en acetonitrilo, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Después de la finalización de la reacción, el precipitado se recogió por filtración, y el disolvente en el filtrado se evaporó con un evaporador. Se añadió diclorometano al residuo obtenido, y la mezcla se lavó tres veces con tampón de acetato (pH 4) y tres veces con bicarbonato sódico acuoso saturado. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico, y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto en bruto obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano/metanol = 10/1) para dar el compuesto (15) (2,8 g, rendimiento de un 85 %) en forma de un sólido de color blanco. Los valores analíticos instrumentales del compuesto (15) se muestran a continuación.

Compuesto (15);

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,07 (a, 1H), 6,72 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,03 (m, 1H), 3,66 (d, J = 4,9 Hz, 2H), 3,37 (dd, J = 12,9, 6,3 Hz, 2H), 3,29 (dd, J = 12,4, 6,3 Hz, 2H), 1,83 (s, 2H), 1,66-1,60 (m, 6H), 1,44 (s, 9H), 1,41-1,37 (m, 2H)

(3) Síntesis del compuesto (16)

El compuesto 15 (2,5 g, 6,1 mmol) se agitó en una solución de ácido clorhídrico/tetrahidrofurano (4 M, 45 ml) a temperatura ambiente durante 2 h. Después de la finalización de la reacción, el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en etanol, y se sometió a azeotropía con tolueno. El disolvente se evaporó para dar el compuesto (16) (1,9 g) en forma de un sólido de color blanco. Los valores analíticos instrumentales del compuesto (16) se muestran a continuación.

Compuesto (16);

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ: 3,85-3,81 (m, 1H), 3,59-3,56 (m, 2H), 3,32-3,20 (m, 2H), 1,94-1,80 (m, 2H), 1,66-1,58 (m, 6H), 1,46-1,40 (m, 2H)

(4) Síntesis del compuesto (17)

A una solución (150 ml) del compuesto 13 (que contiene piridina, 24 g, 35,5 mmol), dicitclohexilcarbodiimida (8,8 g, 1,2 equiv.), y monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol (7,2 g, 1,5 equiv.) se añadió trietilamina (4,5 ml, 0,9 equiv.), se añadió adicionalmente una solución (30 ml) del compuesto 16 (10 g, 0,9 equiv.) en N,N-dimetilformamida, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. Después de la finalización de la reacción, el precipitado se recogió por filtración, y el disolvente en el filtrado se evaporó con un evaporador. Se añadió diclorometano al residuo obtenido, y la mezcla se lavó tres veces con bicarbonato sódico acuoso saturado. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico, y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto en bruto obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano/metanol = 20/1 + piridina al 0,05 %) para dar el compuesto (17) (16 g, rendimiento de un 70 %) en forma de un sólido de color amarillo pálido. Los valores analíticos instrumentales del compuesto (17) se muestran a continuación.

Compuesto (17);

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,43-7,40 (m, 2H), 7,32-7,26 (m, 6H), 7,21-7,17 (m, 1H), 6,81 (d, J = 8,8 Hz, 4H), 4,39-4,37 (m, 1H), 3,78 (s, 6H), 3,64-3,61 (m, 2H), 3,33-3,22 (m, 4H), 3,03 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 2,19 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 1,79-1,54 (m, 12H), 1,40-1,34 (m, 4H)

(5) Síntesis del compuesto (18)

A una solución (3,5 ml) del compuesto (17) (1,26 g, 1,73 mmol), que se secó de forma azeotrópica con acetonitrilo, en acetonitrilo anhidro se añadieron tetrazolida de diisopropilamonio (394 mg, 1,3 equiv.) y fosfordiamidita de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropilo (700 mg, 1,3 equiv.), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 h. Se añadió diclorometano, la mezcla se lavó con bicarbonato sódico acuoso saturado y solución salina saturada y se secó sobre sulfato sódico, y el disolvente se evaporó. El producto en bruto obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (amino sílice, eluyente: n-hexano/acetato de etilo = 2/3) para dar el compuesto (18) (1,3 g, rendimiento de un 78 %) en forma de un sólido de color blanco. Los valores analíticos instrumentales del compuesto (18) se muestran a continuación.

Compuesto (18);

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,43-7,41 (m, 2H), 7,32-7,17 (m, 7H), 6,81 (dt, J = 9,3, 2,9 Hz, 4H), 4,42-4,37 (m, 1H), 3,78 (s, 6H), 3,88-3,54 (m, 6H), 3,32-3,20 (m, 4H), 3,03 (t, J = 6,3 Hz, 2H), 2,19 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 1,83-1,53 (m, 12H), 1,42-1,31 (m, 4H), 1,28-1,24 (m, 2H), 1,18-1,16 (m, 12H)

5 RMN ³¹P (162 MHz, CDCl₃) δ: 146,9.

(Ejemplo B3) síntesis de ARN en fase sólida

De la misma manera que en el Ejemplo B1 mencionado anteriormente excepto por que se usó el compuesto (18) mencionado anteriormente en el esquema 7 mencionado anteriormente como monómero de la presente invención en lugar del compuesto (6) mencionado anteriormente en el esquema 5 mencionado anteriormente, se usó guanosina en lugar del ARN mencionado anteriormente mostrado en la SEQ ID NO: 1, el ARN mostrado por la siguiente SEQ ID NO: 63 se usó en lugar del ARN mencionado anteriormente mostrado en la SEQ ID NO: 2 y el ARN mostrado por la siguiente SEQ ID NO: 64 se usó en lugar del ARN mencionado anteriormente mostrado en la SEQ ID NO: 3, el ARN del Ejemplo se sintetizó en fase sólida. El ARN del Ejemplo sintetizado de este modo es un ARN monocatenario (ARNss) en donde cada una de las regiones conectoras (Lx) y (Ly) tienen una estructura representada por la siguiente fórmula química L1. La región conectora (Lx) (representada por la siguiente fórmula química L1) en el ARN en este Ejemplo se denomina "Lx'" en lo sucesivo para distinguirla de la región conectora (Lx) (representada por la fórmula química mencionada anteriormente Lg) en el Ejemplo B1 mencionado anteriormente. De forma análoga, la región conectora (Ly) (representada por la siguiente fórmula química L1) en el ARN en este Ejemplo se denomina "Ly'" en lo sucesivo para distinguirla de la región conectora (Ly) (representada por la fórmula química Lg mencionada anteriormente) en el Ejemplo B1 mencionado anteriormente.

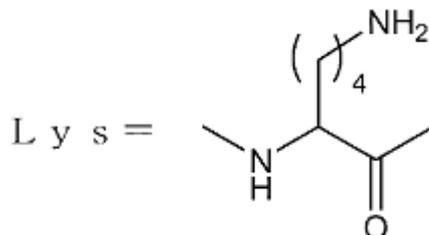
5' -GGAAUCGAAGUACUCAGCGUAAGUUC-3' (SEQ ID NO: 63)

5' -ACUUACGCUGAGUACUUCGAUCC-3' (SEQ ID NO: 64)

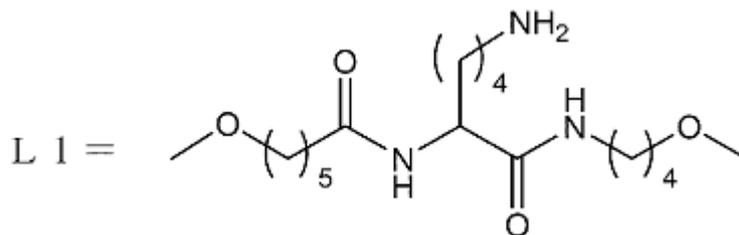
(L1 [estructura de Lx' o Ly'])

- O (CH₂)₅CO-Lys-NH (CH₂)₄O-

En la estructura L1 del conector mencionado anteriormente, "Lys" es una estructura representada por la siguiente fórmula química.

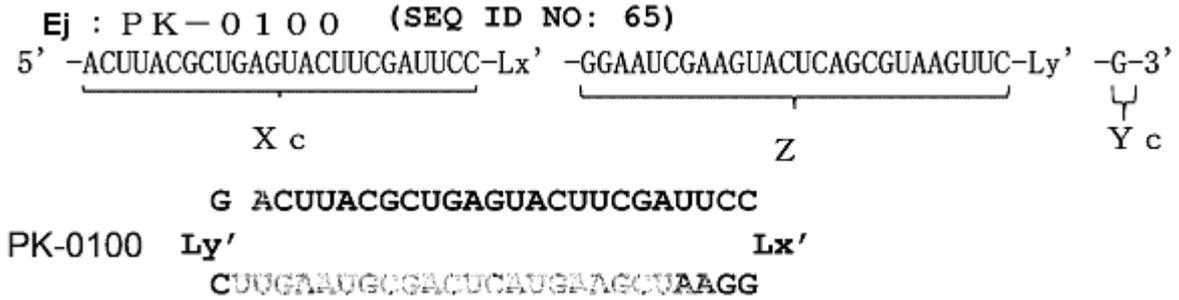


Por lo tanto, la estructura L1 del conector mencionado anteriormente está representada por la siguiente fórmula química.



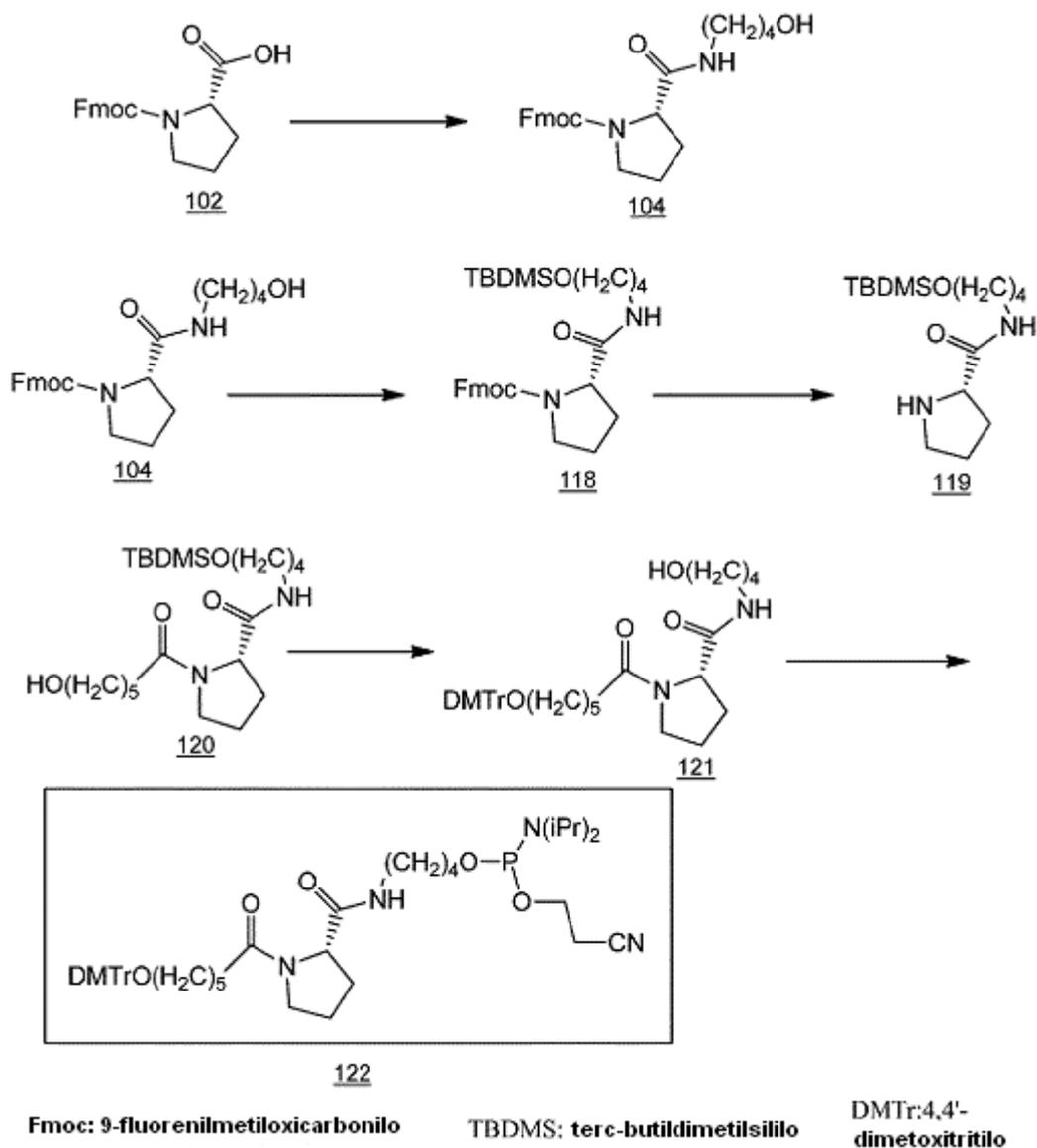
El ARNss de este Ejemplo sintetizado como se ha mencionado anteriormente se denominará PK-0100 en lo sucesivo en la presente memoria. El PK-0100 mencionado anteriormente tiene una estructura en donde, como se muestra en la SEQ ID NO: 65 que sigue a continuación, el ARN mencionado anteriormente mostrado en la SEQ ID NO: 64, el ARN mencionado anteriormente mostrado en la SEQ ID NO: 63, y guanosina están alineados en este orden desde el extremo en la posición 5', el ARN mencionado anteriormente mostrado en la SEQ ID NO: 64 (que corresponde a Xc) y el ARN mencionado anteriormente mostrado en la SEQ ID NO: 63 (que corresponde a la región interna Z) están unidos a través del conector Lx' (la estructura L1 mencionada anteriormente), y el ARN mencionado anteriormente mostrado en la SEQ ID NO: 63 (que corresponde a la región interna Z) y guanosina (que corresponde

5 a Yc) están unidos a través del conector Ly' (la estructura L1 mencionada anteriormente). Además, como se muestra en las secuencias que siguen a continuación, la secuencia de ARN mencionada anteriormente mostrada en la SEQ ID NO: 63 es complementaria a la guanosina y la secuencia de ARN mencionada anteriormente mostrada en la SEQ ID NO: 64. Por lo tanto, el PK-0100 mencionado anteriormente funciona con autohibridación para tener una estructura de tallo, como se muestra en la fórmula que sigue a continuación.



(Ejemplo de Referencia A1)

Un monómero de material de síntesis del ácido nucleico monocatenario que contiene una estructura principal de prolina se produjo según el siguiente esquema 8.



esquema 8

(1) Fmoc-hidroxiamido-L-prolina (compuesto 104)

El compuesto 102 (Fmoc-L-prolina), que es el material de partida del Esquema 8 mencionado anteriormente se adquirió en Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. Este compuesto 102 (10,00 g, 29,64 mmol), 4-amino-1-butanol (3,18 g, 35,56 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol (10,90 g, 70,72 mmol) se mezclaron en conjunto. La mezcla mencionada anteriormente se desaireó a presión reducida y se cargó con gas argón. Se añadió acetonitrilo anhidro (140 ml) a la mezcla mencionada anteriormente a temperatura ambiente, y una solución (70 ml) de dicitclohexilcarbodiimida (7,34 g, 35,56 mmol) en acetonitrilo anhidro se añadió adicionalmente a esto. A partir de ese momento, esto se agitó durante 15 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Después de la finalización de la reacción, el precipitado generado se retiró por filtración, y el disolvente en el filtrador recogido se evaporó a presión reducida. Se añadió diclorometano (200 ml) al residuo obtenido, y la mezcla se lavó con bicarbonato sódico acuoso saturado (200 ml). A continuación, una fase orgánica se recogió y se secó sobre sulfato de magnesio. A partir de ese momento, la fase orgánica mencionada anteriormente se filtró, y el disolvente en el filtrado obtenido se evaporó a presión reducida. Se añadió dietil éter (200 ml) al residuo, convirtiéndose de ese modo el residuo en polvo. El polvo obtenido de este modo se recogió por filtración. Por lo tanto, se obtuvo el compuesto 104 en forma de un polvo incoloro (10,34 g, rendimiento de un 84 %). El resultado del análisis instrumental con respecto al compuesto 104 mencionado anteriormente se muestra a continuación.

Fmoc-hidroxiamido-L-prolina (104);

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

MS (FAB+) : m/z 409 (M+H⁺).

5 (2) Fmoc-t-butil-dimetilsiloxiamido-L-prolina (compuesto 118)

Fmoc-hidroxiamido-L-prolina (compuesto 104) (2,00 g, 30 mmol), cloruro de t-butil-dimetilsililo (1,11 g, 35 mmol) y imidazol (10,90 g, 71 mmol) se mezclaron juntos. La mezcla mencionada anteriormente se desaireó a presión reducida y se cargó con gas argón. Se añadió acetonitrilo anhidro (20 ml) a la mezcla mencionada anteriormente a temperatura ambiente, y esto se agitó durante una noche a temperatura ambiente en una atmósfera de argón.

10 Después de la finalización de la reacción, se añadió diclorometano (150 ml) a la mezcla mencionada anteriormente. La mezcla resultante se lavó con agua tres veces y a continuación con solución salina saturada. Una fase orgánica se recogió y se secó sobre sulfato de magnesio. A partir de ese momento, la fase orgánica mencionada anteriormente se filtró. El disolvente en el filtrado obtenido se evaporó a presión reducida, y el residuo se aplicó a cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂:CH₃OH = 95:5). Por lo tanto, el compuesto 118 se obtuvo en forma de jarabe incoloro (2,35 g, rendimiento de un 92 %). El resultado del análisis instrumental con respecto al compuesto mencionado anteriormente 118 se muestra a continuación.

Fmoc-t-butil-dimetilsiloxiamido-L-prolina (118);

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

MS (FAB+): m/z 523 (M+H⁺).

(3) t-Butil-dimetilsiloxiamido-L-prolina (compuesto 119)

25 A la Fmoc-t-butil-dimetilsiloxiamido-L-prolina mencionada anteriormente (compuesto 118) (1,18 g, 2,5 mmol) obtenida anteriormente, se añadieron acetonitrilo anhidro (5 ml) y piperidina (2,4 ml), y esto se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la finalización de la reacción, se añadió acetonitrilo (50 ml) a la mezcla mencionada anteriormente, y los materiales insolubles se retiraron por filtración. El disolvente en el filtrado obtenido se evaporó a presión reducida. El residuo obtenido se aplicó a cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂:CH₃OH = 9:1). Por lo tanto, el compuesto 119 se obtuvo en forma de jarabe incoloro (0,61 g, rendimiento de un 90 %). El resultado del análisis instrumental con respecto al compuesto mencionado anteriormente 119 se muestra a continuación.

t-Butil-dimetilsiloxiamido-L-prolina (119);

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

MS (FAB+); m/z 301 (M+H⁺).

(4) t-Butil-dimetilsiloxiamidohidroxiamido-L-prolina (compuesto 120)

40 La t-butil-dimetilsiloxiamido-L-prolina mencionada anteriormente (compuesto 119) (550 mg, 1,8 mmol) obtenida anteriormente, ácido 6-hidroxihexanoico (300 mg, 2,3 mmol), EDC (434 mg, 2,3 mmol) y una solución (20 ml) de 1-hidroxibenzotriazol (695 mg, 4,5 mmol) en diclorometano anhidro se mezclaron. Se añadió trietilamina (689 mg, 6,8 mmol) a la mezcla mencionada anteriormente a temperatura ambiente en una atmósfera de argón, y a continuación, esto se agitó durante una noche a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. La mezcla mencionada anteriormente se lavó con solución salina saturada. Una fase orgánica se recogió, y la fase orgánica mencionada anteriormente se secó sobre sulfato sódico. A partir de ese momento, la fase orgánica mencionada anteriormente se filtró. El disolvente en el filtrado obtenido se evaporó a presión reducida. El residuo obtenido se aplicó a cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂:CH₃OH = 9:1). Por lo tanto, el compuesto 120 se obtuvo en forma de jarabe incoloro (696 mg, rendimiento de un 92 %). El resultado del análisis instrumental con respecto al compuesto mencionado anteriormente 120 se muestra a continuación.

t-Butil-dimetilsiloxiamidohidroxiamido-L-prolina (120);

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

MS (FAB+): m/z 415 (M⁺+1).

(5) DMTr-hidroxi-diamido-L-prolina (compuesto 121)

La t-butil-dimetilsiloxiamidohidroxi-diamido-L-prolina mencionada anteriormente (compuesto 120) (640 mg, 1,54 mmol) se mezcló con piridina anhidra (1 ml), y esto se secó de forma azeotrópica a temperatura ambiente. Al residuo añadido se le añadieron cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (657 mg, 1,85 mmol), DMAP (2 mg), y piridina anhidra (5 ml), y esto se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. A partir de ese momento, se añadió metanol (1 ml) a esto, y esto se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla mencionada anteriormente se diluyó con diclorometano, y esto se lavó con bicarbonato sódico acuoso saturado. Una fase orgánica se recogió y se secó sobre sulfato sódico. A partir de ese momento, la fase orgánica mencionada anteriormente se filtró. El disolvente en el filtrado obtenido se evaporó a presión reducida. Al residuo añadido se le añadieron acetonitrilo anhidro (5 ml) y una solución de tetrahidrofurano que contenía 1 mol/l de fluoruro de tetrabutilamonio (1,42 ml, fluoruro de tetrabutilamonio 1,42 mmol), y esto se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Después de la finalización de la reacción, se añadió acetato de etilo (100 ml) a la mezcla mencionada anteriormente. La mezcla resultante se lavó con agua y a continuación con solución salina saturada. Una fase orgánica se recogió y se secó sobre sulfato sódico. A partir de ese momento, la fase orgánica mencionada anteriormente se filtró. El disolvente en el filtrado obtenido se evaporó a presión reducida. El residuo obtenido se aplicó a cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂:CH₃OH = 95:5, que contenía piridina al 0,05 %). Por lo tanto, el compuesto 121 se obtuvo en forma de jarabe incoloro (680 mg, rendimiento de un 73 %). El resultado del análisis instrumental con respecto al compuesto mencionado anteriormente 121 se muestra a continuación.

DMTr-hidroxi-diamido-L-prolina (121);

RMN ¹H (CDCl₃) : δ 7,41-7,44 (m, 2H, Ar-H), 7,26-7,33 (m, 4H, Ar-H), 7,18-7,21 (m, 2H, Ar-H), 7,17-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,80 - 6,84 (m, 4H, Ar-H), 4,51-4,53 (d, 6,8 Hz, 1H, CH), 3,79 (s, 6H, OCH₃), 3,61 (dd, 2H, J = 11 Hz, 5,4 Hz, CH₂), 3,50-3,54 (m, 1H, CH), 3,36-3,43 (m, 1H, CH), 3,2 0-3,2 6 (m, 2H, CH₂), 3,05 (t, J = 6,4 Hz, 2H, CH₂), 2,38-2,45 (m, 1H, CH), 2,30 (t, J = 7,8 Hz, 2H, CH₂), 2,05-2,25 (m, 1H, CH), 1. 92-2,00 (m, 1H, CH), 1,75-1,83 (m, 1H, CH), 1,52-1,67 (m, 8H), 1,35-1,45 (m, 2H, CH₂);

MS (FAB+): m/z 602 (M⁺), 303 (DMTr⁺).

(6) Amidita de DMTr-diamido-L-prolina de tipo B (compuesto 122)

La DMTr-hidroxi-diamido-L-prolina mencionada anteriormente (compuesto 121) (637 mg, 1,06 mmol) obtenida anteriormente se mezcló con acetonitrilo anhidro, y la mezcla resultante se secó de forma azeotrópica a temperatura ambiente. Al residuo añadido se le añadieron tetrazolida de diisopropilamonio (201 mg, 1,16 mmol) se añadió, y la mezcla resultante se desaireó a presión reducida y se cargó con gas argón. Se añadió anhidro acetonitrilo (1 ml) a la mezcla mencionada anteriormente, y a esto se le añadió adicionalmente una solución de de fosfordiamidita de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropilo (350 mg, 1,16 mmol) en acetonitrilo anhidro (1 ml). Esta mezcla se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. La mezcla mencionada anteriormente se diluyó con diclorometano, y esto se lavó con bicarbonato sódico acuoso saturado y solución salina saturada. Una fase orgánica se recogió y se secó sobre sulfato sódico. A partir de ese momento, la fase orgánica mencionada anteriormente se filtró. El disolvente en el filtrado obtenido se evaporó a presión reducida. El residuo obtenido se aplicó a cromatografía en columna usando amino gel de sílice como carga (eluyente: hexano:acetona = 7:3). Por lo tanto, el compuesto 122 se obtuvo en forma de jarabe incoloro (680 mg, pureza: 95 %, rendimiento de un 76 %). El resultado del análisis instrumental con respecto al compuesto mencionado anteriormente 122 se muestra a continuación.

Amidita de DMTr-diamido-L-prolina (122);

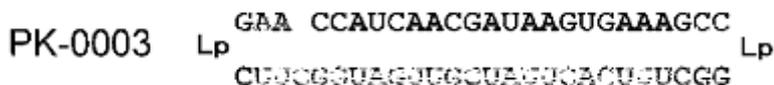
RMN ¹H (CDCl₃) : δ 7,41-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,25-7,32 (m, 4H, Ar-H), 7,17-7,22 (m, 2H, Ar-H), 6,80-6,83 (m, 4H, Ar-H), 4,53 (d, J = 7,8 Hz, 1H, CH), 3,75-3,93 (m, 3H), 3,79 (s, 6H, OCH₃), 3,46-3,68 (m, 5H), 3,34-3,41 (m, 1H, CH), 3,10-3,31 (m, 1H, CH), 3,05 (t, J = 6,3 Hz, 2H, CH₂), 2,62 (t, J = 6,3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

RMN P (CH₃CN) δ 146,90;

MS (FAB+): m/z 803 (M⁺+1), 303 (DMTr⁺).

(Ejemplo de Referencia B1) Síntesis de ARN en fase sólida

De la misma manera que en PK-0054 del Ejemplo B1 mencionado anteriormente excepto por que se usó el compuesto 122 mencionado anteriormente en lugar del compuesto 6 mencionado anteriormente (monómero en la presente invención) en el esquema 5 mencionado anteriormente, y la estructura de la parte que corresponde a las regiones conectoras (Lx) y (Ly) era la siguiente Lp en lugar de la mencionada anteriormente Lg, se sintetizó un ARN monocatenario (ARNss).



(Ejemplo de Referencia B2)

De la misma manera que con PK-0100 del Ejemplo B3 mencionado anteriormente excepto por que se usó el compuesto 22 mencionado anteriormente en lugar del compuesto 18 mencionado anteriormente (monómero en la presente invención) en el esquema 7 mencionado anteriormente, y la estructura de la parte que corresponde a las regiones conectoras (Lx) y (Ly) era la Lp mencionada anteriormente (el Ejemplo de Referencia B1 mencionado anteriormente) en lugar de la L1 mencionada anteriormente, se sintetizó un ARN monocatenario (ARNs).

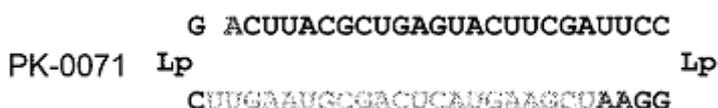
EL ARNss sintetizado como se ha mencionado anteriormente en lo sucesivo en la presente memoria se denomina PK-0071. El PK-0071 mencionado anteriormente tiene una estructura en donde, como se muestra en la SEQ ID NO: 66 que sigue a continuación, el ARN mencionado anteriormente de SEQ ID NO: 64, el ARN mencionado anteriormente de SEQ ID NO: 63, y guanosina están alineados en este orden desde el extremo en la posición 5', y cada RNA y guanosina están unidos a través de la estructura Lp mencionada anteriormente. Además, como también se explica en el Ejemplo B3 mencionado anteriormente, la secuencia de ARN mencionada anteriormente de SEQ ID NO: 63 es complementaria a guanosina y la secuencia de ARN mencionada anteriormente de SEQ ID NO: 64. Por lo tanto, el PK-0071 mencionado anteriormente funciona con autohibridación para tener una estructura de tallo, como se muestra en la fórmula que sigue a continuación.

5'-GGAAUCGAAGUACUCAGCGUAAGUUC-3' (SEQ ID NO: 63)

5'-ACUUACGCUGAGUACUUCGAUUC-3' (SEQ ID NO: 64)

Ej: PK-0071 (SEQ ID NO: 66)

5'-ACUUACGCUGAGUACUUCGAUUC-Lp-GGAAUCGAAGUACUCAGCGUAAGUUC-Lp-G-3'



(Ejemplo 1) Efecto inhibitor en la expresión genética de GAPDH en células HCT116

Usando el ARN de la presente invención, se examinó la inhibición de la expresión genética de GAPDH *in vitro*.

(1) Materiales y Método

Como ARN (Ej) del presente ejemplo, se usaron los ARNss (PK-0054 y PK-0055) del Ejemplo B1 mencionado anteriormente. Como ARN del Ejemplo de Referencia, también se usaron los ARNss (PK-0004 y PK-0003) del Ejemplo de Referencia B1 mencionado anteriormente. Se prepararon soluciones de ARN por disolución de cada uno de los ARN mencionadas anteriormente en agua destilada a la inyección (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., en lo sucesivo en la presente memoria lo mismo) para conseguir la concentración deseada (10 µl/l).

Como células se usaron células HCT116 (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.). Como medio se usó un medio de McCoy 5A que contenía FBS al 10 % (Invitrogen). Las condiciones del cultivo se establecieron en 37 °C y CO₂ al 5 %.

En primer lugar, las células HCT116 se cultivaron en el medio mencionado anteriormente, y el medio de cultivo se distribuyó a una placa de 24 pocillos de modo que cada pocillo contuviera 400 µl del medio de cultivo para conseguir una densidad de 2 x 10⁴ células/pocillo. Las células en los pocillos mencionados anteriormente se cultivaron durante otro periodo de 24 horas. A partir de ese momento, las células se transfectaron con el ARN mencionado anteriormente usando un reactivo de transfección Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según el protocolo con el reactivo de transfección mencionado anteriormente. De forma específica, la transfección se realizó colocando la composición por pocillo como sigue a continuación. La concentración final del ARN mencionado anteriormente en el pocillo mencionado anteriormente se estableció en 1 nmol/l, 5 nmol/l, o 25 nmol/l.

Tabla 1

(Composición por pocillo µl)

medio de cultivo	400
------------------	-----

(Composición por pocillo μ l)

(A) Lipofectamina 2000	1,5
(B) Opti-MEM (Invitrogen)	98
(C) Solución de ARN	0,5
<hr/>	
Total	500

5 Después de la transfección, las células de los pocillos mencionados anteriormente se cultivaron durante 48 horas, y a continuación, el ARN se recogió usando un Kit RNeasy Mini (Qiagen, Países Bajos) según el protocolo suministrado en el mismo. Posteriormente, el ADNc se sintetizó a partir de la ARN mencionado anteriormente usando una transcriptasa inversa (nombre comercial: SuperScript III, Invitrogen) según el protocolo suministrado en el mismo. A continuación, como se muestra a continuación, se realizó PCR usando el ADNc sintetizado mencionado anteriormente como molde, y se midió el nivel de expresión genética de GAPDH y el del gen de β -actina como patrón interno. El nivel de expresión genética de GAPDH mencionado anteriormente se normalizó con referencia al del gen de β -actina mencionado anteriormente.

10 La PCR mencionada anteriormente se realizó usando un LightCycler FastStart ADN Master SYBR Green I (nombre comercial, Roche) como reactivo y un Light Cycler DX400 (nombre comercial, Roche) como instrumento (en lo sucesivo en la presente memoria lo mismo). El gen GAPDH y el gen de β -actina mencionados anteriormente se amplificaron usando los siguientes conjuntos de cebadores, respectivamente.

Conjunto de cebadores de PCR para el gen GAPDH

5'-GGAGAAGGCTGGGGCTCATTTGC-3' (SEQ ID NO: 11)

15 5'-TGGCCAGGGGTGCTAAGCAGTTG-3' (SEQ ID NO: 12)

Conjunto de cebadores para el gen de β -actina

5'-GCCACGGCTGCTTCCAGCTCCTC-3' (SEQ ID NO: 13)

5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGTCAC-3' (SEQ ID NO: 14)

20 Como control 1, con respecto a las células a las que solamente se le habían añadido 100 μ l de la solución (B) mencionada anteriormente, también se midieron los niveles de expresión de los genes (-). Además, como control 2, con respecto a las células sometidas a los mismos procedimientos de transfección que en el caso anterior excepto por que la solución de ARN mencionada anteriormente no se añadió y por que se añadieron la solución (B) mencionada anteriormente y 1,5 μ l de la solución (A) mencionada anteriormente de modo que la cantidad total de (A) y (B) sería de 100 μ l, el nivel de expresión del gen también se midió (simulado).

25 Con respecto al nivel de expresión normalizado del gen GAPDH, el valor relativo en la célula introducida con cada ARN se determinó basándose en el nivel de expresión en las células del control (-) establecido como 1.

(2) Resultados

Los resultados de los mismos se muestran en la FIG. 4. La FIG. 4 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión genética de GAPDH, y el eje vertical indica el nivel relativo de expresión genética.

30 Como se muestra en la Fig. 4, PK-0004 y PK-0054 presentaban un efecto inhibitor de la expresión ya que incorporan un GAPDH humano de dirección de secuencias. Por el contrario, PK-0003 y PK-0055 que tienen diferentes secuencias presentaban un efecto inhibitor de la expresión bajo en comparación con PK-0004 y PK-0054. Es decir, estos ARN eran superiores en la especificidad de reacción para la secuencia de bases diana.

35 Además, dado que PK-0054 es un ARNss (ARN monocatenario), éste se puede producir de forma fácil y eficaz y también era superior en la manipulación en comparación con el ARNsi (ARN bicatenario).

Además, PK-0054 que es el ARNss del Ejemplo presentaba un efecto inhibitor de la expresión también equivalente al de PK-0004 que es el ARNss del Ejemplo de Referencia. El material de partida sintético es L-prolina para PK-0004 y glicina para PK-0054, y el material de partida de PK-0054 se obtiene fácilmente mucho más económicamente. Por lo tanto, es casi completamente ventajoso para la conveniencia y el coste de la producción.

40 (Ejemplo C2) Efecto inhibitor en la expresión del gen de luciferasa de luciérnaga

Usando el ARN de la presente invención, se examinó la inhibición de la expresión del gen de luciferasa de

luciérnaga *in vitro*.

(1) Materiales y Método

5 Como ARN (Ej) del presente ejemplo, se usó el ARNss (PK-0100) del Ejemplo B3 mencionado anteriormente. Como ARN del Ejemplo de Referencia, también se usó el ARNss (PK-0071) del Ejemplo de Referencia B2 mencionado anteriormente. Se prepararon soluciones de ARN disolviendo cada uno de los ARN mencionados anteriormente en agua destilada a la inyección (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., en lo sucesivo en la presente memoria lo mismo) para conseguir la concentración deseada (10 $\mu\text{mol/l}$).

10 Se usó la línea de células MCF-7 de cáncer de mama que expresan de forma estable la luciferasa de luciérnaga (pGL3 Luc), y como medio se usó RPMI 1640 (Invitrogen) + FCS al 10 %. Las condiciones del cultivo se establecieron en 37 °C y CO₂ al 5 %.

De forma más específica, la línea de células MCF-7 de cáncer de mama que expresan de forma estable la luciferasa de luciérnaga (pGL3 Luc) se cultivaron como sigue a continuación.

[1] Las células mencionadas anteriormente se cultivaron en el medio, y el medio de cultivo se distribuyó a una placa de 96 pocillos con 50 μl a 1 x 10⁴ células/pocillo.

15 [2] A continuación, las células mencionadas anteriormente en el pocillo se transfectaron con la muestra de ARN usando un reactivo de transfección Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según el protocolo adjunto. De forma específica, 50 μl /pocillo de un complejo de la muestra de ARN mencionada anteriormente y del reactivo de transfección mencionado anteriormente se añadieron a la cantidad total de 100 μl , y la concentración final de la muestra de ARN mencionada anteriormente a 0,1, 1 o 10 nmol/l. Como control 1, se prepararon las células a las que no se les añadió la muestra de ARN mencionada anteriormente y el reactivo de transfección mencionado anteriormente (-) y, como control 2, se prepararon las células a las que no se le añadió la muestra de ARN mencionada anteriormente en transfección pero se le añadió el reactivo de transfección mencionado anteriormente solo (simulado).

[3] Las células se cultivaron adicionalmente durante 24 h después de la transfección mencionada anteriormente.

25 La actividad de luciferasa se midió como sigue a continuación. La medición de la actividad de luciferasa es la medición de un efecto inhibitor en la expresión del gen de luciferasa de luciérnaga, que es conservado por la línea de células MCF-7 de cáncer de mama que expresan de forma estable la luciferasa de luciérnaga (pGL3 Luc).

[1] En primer lugar, usando el Sistema de Ensayo de Luciferasa Steady-Glo (nombre comercial) (Promega), la intensidad de la luminiscencia de luciferasa se midió con un lector de múltiples etiquetas ARVO X2 (PerkinElmer) según el protocolo adjunto.

30 [2] Los resultados de la medición de la actividad de luciferasa en el apartado [1] mencionado anteriormente se presentaron como la actividad relativa con respecto a la de la muestra de ARN y el reactivo de transfección (-) (el control 1 mencionado anteriormente, grupo de células sin adición) como 1.

(2) Resultados

35 Los resultados se muestran en la Fig. 12. La Fig. 12 es un gráfico que muestra el valor relativo de la actividad de luciferasa.

40 Como se muestra en la Fig. 12, PK-0100 (ARNss del Ejemplo) podría reducir la actividad relativa de la luciferasa de aproximadamente 0,7 - aproximadamente 0,3. Es decir, PK-0100 presentaba un efecto inhibitor de la expresión superior en el gen de luciferasa de luciérnaga conservado por la línea de células MCF-7 de cáncer de mama que expresan de forma estable la luciferasa de luciérnaga (pGL3 Luc). Además, PK-0100 también presentaba un efecto inhibitor de la expresión equivalente o superior en PK-0071, que es el ARNss del Ejemplo de Referencia.

(Ejemplo de Referencia 1)

Usando los ARNss que tienen una base no emparejada en diferentes posiciones, se examinó la inhibición de la expresión genética de GAPDH *in vitro*.

(1) Materiales y Método

45 Como ARN, se usaron los ARNss mostrados en la FIG. 5. En la FIG. 5, los números en la parte derecha indican números de identificación de secuencias. En la FIG. 5, desde el extremo en la posición 5', una región indicada con letras en minúsculas subrayada es la región mencionada anteriormente (Xc); una región indicada con letras en mayúsculas subrayada es la región interna mencionada anteriormente (Z); y una región indicada con letras en minúsculas subrayada es la región mencionada anteriormente (Yc). Una región entre las regiones Xc y Z mencionadas anteriormente es una región conectora (Lx), y una región entre las regiones Z e Yc mencionadas anteriormente es una región conectora (Ly). Además, "Xc/Yc" indica la proporción entre la longitud de las bases (Xc) de la región mencionada anteriormente (Xc) y la longitud de las bases (Yc) de la región mencionada anteriormente

(Yc). En la FIG. 5, ""*"" indica una base no emparejada.

5 En cada uno de los ARNss, la longitud de las bases de la región interna (Z) se estableció en 26, la longitud de las bases de la región conectora (Lx) se estableció en 7, y la longitud de las bases de la región conectora (Ly) se estableció en 4. En NK-0036 y NK-0040, el número total de las bases (Xc + Yc) en las regiones mencionadas anteriormente (Xc) e (Yc) se estableció en 26. En los ARNss distintos de NK-0036 y NK-0040, el número total de las bases (Xc + Yc) en las regiones mencionadas anteriormente (Xc) e (Yc) se estableció en 25. A continuación, en estas condiciones, las longitudes de las bases de las regiones mencionadas anteriormente (Xc) e (Yc) se cambiaron. Como resultado, NK-0036 y NK-0040 se convirtieron en las moléculas sin bases no emparejadas. Además, cada uno de los ARNss distintos de NK-0036 y NK-0040 se convirtieron en la molécula en la que la región interna mencionada anteriormente (Z) incluye solamente una base no emparejada que no forma una doble hebra y la posición de la base no emparejada mencionada anteriormente en la región interna mencionada anteriormente (Z) se intercambió desde el extremo en la posición 3' al extremo en la posición 5'.

10 La transfección en las células HCT116, cultivo, recogida de ARN, síntesis de ADNc, y PCR se realizaron de la misma manera que en el Ejemplo C1 mencionado anteriormente, excepto por que se usó cada uno de los ARN mencionados anteriormente, y se determinó el nivel relativo de expresión genética de GAPDH. La concentración del ARN en el momento de la transfección se estableció en 10 nmol/l.

(2) Resultados y Consideración

20 Los resultados de los mismos se muestran en la FIG. 6. La FIG. 6 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión genética de GAPDH cuando se usó cada uno de los ARN en la concentración final de 10 nmol/l. Como se puede observar a partir de la FIG. 6, se encontró que todos los ARNss con las longitudes variables de la región en la posición 5' mencionada anteriormente (Xc) y la región en la posición 3' mencionada anteriormente (Yc) inhibían la expresión genética de GAPDH.

25 En particular, se encontró que, como la diferencia entre la longitud de las bases de la región mencionada anteriormente (Xc) y la longitud de las bases de la región mencionada anteriormente (Yc) se hicieron más grandes, el nivel de expresión del gen disminuía relativamente, es decir, la actividad inhibidora de la expresión aumentaba. Es decir, se encontró que, estableciendo la posición de la base no emparejada en la región interna mencionada anteriormente (Z) para que estuviera más cerca del extremo en la posición 5' o del extremo en la posición 3' con respecto a la parte media de la región interna mencionada anteriormente, es posible mejorar la actividad inhibidora de la expresión mencionada anteriormente.

30 (Ejemplo de Referencia 2)

Usando los ARNss que tienen una base no emparejada en diferentes posiciones, se examinó la inhibición de la expresión genética de TGF- β 1 *in vitro*.

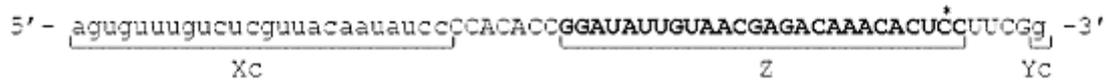
(1) Materiales y Método

35 Como ARN, se usaron los ARNss que se muestran a continuación. En las siguientes secuencias, ""*"" indica una base no emparejada.

NK-0043 (SEQ ID NO: 46)



NK-0064 (SEQ ID NO: 47)



La transfección a las células 293 cells se realizó de la misma manera que en el Ejemplo C1 mencionado anteriormente, excepto por que se usó cada uno de los ARN mencionados anteriormente, y las células mencionadas anteriormente se cultivaron durante 48 horas. La concentración del ARN en el momento de la transfección se estableció en 10 nmol/l. A continuación, la recogida de ARN, síntesis de ADNc, y PCR se realizaron de la misma manera que para el Ejemplo C1 mencionado anteriormente, excepto por que como cebador se usó el gen LAMA1 se muestra a continuación, y se midieron el nivel de expresión del gen LAMA1 y el del gen de β-actina como patrón interno. El nivel de expresión del gen LAMA1 mencionado anteriormente se normalizó con referencia al del gen de β-actina como patrón interno.

10 Conjunto de cebadores para el gen LAMA1

5'-AAAGCTGCCAATGCCCTCGACC-3' (SEQ ID NO: 48)

5'-TAGGTGGGTGGCCCTCGTCTTG-3' (SEQ ID NO: 49)

15 El nivel de expresión del control 1 (-) y del control 2 (simulado) también se midió de la misma manera que en el Ejemplo C1 mencionado anteriormente. Al igual que para el nivel de expresión normalizado del gen LAMA1, el valor relativo en la célula introducida con cada ARN se determinó basándose en el nivel de expresión en las células del (-) establecido con 1.

(2) Resultados

20 Los resultados de los mismos se muestran en la FIG. 8. La FIG. 8 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen LAMA1 en las células 293. Como se puede observar a partir de la FIG. 8, todos estos ARNss presentaban actividades inhibitoras de la expresión genética. Además, NK-0064 en el que la 2ª base desde el extremo en la posición 3' de la región interna mencionada anteriormente (Z) es la base no emparejada que presentaba una actividad inhibitora de la expresión más elevada que NK-0043 en el que la 4ª base desde el extremo en la posición 3' de la región interna mencionada anteriormente (Z) es la base no emparejada. Estos resultados están de acuerdo con los comportamientos presentados en los Ejemplos de Referencia 1 y 2 mencionados anteriormente dirigidos a los diferentes genes diana.

(Ejemplo de Referencia 4)

Usando los ARNss que tienen una base no emparejada en diferentes posiciones, se examinó la inhibición de la expresión genética de LMNA *in vitro*.

(1) Materiales y Método

30 Como ARN, se usaron los ARNss que se muestran a continuación. En las siguientes secuencias, "*" indica una base no emparejada.

5 En cada uno de los ARNss, la longitud de las bases de la región conectora (Lx) se estableció en 7, la longitud de las bases de la región conectora (Ly) se estableció en 4, la longitud de las bases de la región mencionada anteriormente (Yc) se estableció en 1, y se estableció que la 2ª base desde el extremo en la posición 3' de la región interna mencionada anteriormente (Z) era una base no emparejada. A continuación, se cambiaron la longitud de las bases de la región interna mencionada anteriormente (Z) y la longitud de las bases de la región mencionada anteriormente (Xc).

10 A menos que se especifique de otro modo, la transfección de los ARN mencionados anteriormente en células, HCT116, cultivo, recogida de ARN, síntesis de ADNc, y PCR se realizaron de la misma manera que para el Ejemplo C1 mencionado anteriormente, y se calculó el valor relativo del nivel de expresión genética de GAPDH. En las condiciones para la transfección mencionada anteriormente, la composición por pocillo mencionada anteriormente era la misma que la usada en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2

(Composición por pocillo: µl)

medio de cultivo	400
(A) Lipofectamina 2000	1,5
(B) + (C)	98,5
Total	500

(2) Resultados y Consideración

15 Los resultados de los mismos se muestran en la FIG. 11. La FIG. 11 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión genética de GAPDH cuando cada uno de los ARN se usó a la concentración final de 1 nmol/l. Como se puede observar a partir de la FIG. 11, se encontró que todos los ARNss con las longitudes variables de las regiones mencionadas anteriormente (X), (Xc), (Y), e (Yc) inhibían la expresión genética de GAPDH.

Aunque la presente invención se ha descrito anteriormente en referencia a realizaciones ilustrativas, la presente invención no se limita en modo alguno a las mismas.

20 **Aplicabilidad industrial**

La molécula de ssPN de la presente invención puede inhibir la expresión genética. Dado que no es circular, su síntesis es fácil. Dado que se trata de una sola hebra que no requiere una etapa de hibridación para una doble hebra, se puede producir de forma eficaz. Además, dado que la región conectora mencionada anteriormente contiene el resto no nucleotídico mencionado anteriormente, por ejemplo, la alteración convencional de un resto de nucleótido no es la opción limitada pero, por ejemplo, también es posible una alteración tal como la modificación de la región conectora mencionada anteriormente y similares. Por lo tanto, dado que la molécula de ssPN de la presente invención puede inhibir la expresión de un gen diana como se ha descrito anteriormente, ésta es útil como, por ejemplo, un producto farmacéutico, un agente de diagnóstico, un agente químico agrícola, y como una herramienta para realizar investigación en ciencias médicas, ciencias biológicas, y similares.

30 **Listado de secuencias**

<110> BONAC CORPORATION

<120> Molécula de ácido nucleico monocatenario que tiene una cadena principal de aminoácidos

<130> TF12064WO

<150> JP 2012-001711

35 <151> 2012-01-07

<150> JP 2012-026745

<151> 2012-02-09

<160> 66

<170> PatentIn version 3.5

40 <210> 1

<211> 3

<212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ARN sintético

 5 <400> 1
 gaa 3

 <210> 2
 <211> 26
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

 <400> 2
 ggcuguuguc auacuucua ugguuc 26

 15 <210> 3
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> molécula de ácido nucleico

 <400> 3
 caugagaagu augacaacag cc 22

 <210> 4
 <211> 51
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

 <400> 4
 30 caugagaagu augacaacag ccggcuguug ucauacuucu caugguucga a 51

 <210> 5
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> región que inhibe expresión

 <400> 5
 guugucauac uucucaugg 19

 <210> 6
 40 <211> 26
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

 <400> 6
 45 ggcuuucacu uaucguugau ggcuuc 26

 <210> 7
 <211> 22
 <212> ARN
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> molécula de ácido nucleico

 <400> 7
 ccaucaacga uaagugaaag cc 22

 5 <210> 8
 <211> 51
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 10 <223> molécula de ácido nucleico

 <400> 8
 ccaucaacga uaagugaaag ccggcuuca cuuauuguug auggcuucga a 51

 <210> 9
 <211> 51
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

 <400> 9
 20 caugagaagu augacaacag ccggcuguug ucauacuucu caugguucga a 51

 <210> 10
 <211> 51
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

 <400> 10
 ccaucaacga uaagugaaag ccggcuuca cuuauuguug auggcuucga a 51

 <210> 11
 30 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 35 <400> 11
 ggagaaggct ggggctcatt tgc 23

 <210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 12
 tggccagggg tgctaagcag ttg 23

 45 <210> 13
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> cebador

<400> 13
 gccacggctg ctccagctc ctc 23

5 <210> 14
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

10 <400> 14
 aggtctttgc ggatgtccac gtcac 25

<210> 15
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> secuencia que inhibe expresión

<400> 15
 aaagucaaug uacagcugcu u 21

20 <210> 16
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia que inhibe expresión

25 <400> 16
 auuguaacga gacaaacac 19

<210> 17
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia que inhibe expresión

<400> 17
 uugcgcuuuu uggugacgc 19

35 <210> 18
 <211> 48
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 40 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 18
 ccaugagaag uaugacaaca gccggcuguu gucauacuuc ucaugguu 48

<210> 19
 <211> 51
 45 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 19
 50 cagcuguaca uugacuuuag ccggcuaaag ucaauguaca gcugcuucga a 51

ES 2 645 996 T3

	<210> 20		
	<211> 50		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 20		
	agcuguacau ugacuuuagc cggcuaaagu caauguacag cugcuucgaa	50	
10	<210> 21		
	<211> 51		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> molécula de ácido nucleico		
15	<400> 21		
	agcagcugua cauugacuuu agccggcuaa agucaaugua cagcugcuuc g	51	
	<210> 22		
	<211> 50		
	<212> ARN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 22		
	gcagcuguac auugacuuua gccggcuaaa gucaauguac agcugcuucg	50	
25	<210> 23		
	<211> 51		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 23		
	ugucagugcu cauuuacaag ccggcuugua aaugagcacu gacacuucga a	51	
	<210> 24		
	<211> 62		
35	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 24		
	aaccaugaga aguaugacaa cagccccaca ccggcuguug ucauacuucu caugguucuu	60	
40	cg		62
	<210> 25		
	<211> 62		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 25		
	accaugagaa guaugacaac agccccacac ccggcuguugu cauacuucuc augguucuu	60	
	gg		62

ES 2 645 996 T3

	<210> 26	
	<211> 62	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 26	
	ccaugagaag uaugacaaca gccccacacc ggcuguuguc auacuucuca ugguucuucg	60
	ga	62
10	<210> 27	
	<211> 62	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
15	<400> 27	
	caugagaagu augacaacag cccacaccg gcuguuguca uacuucucau gguucuucgg	60
	aa	62
20	<210> 28	
	<211> 62	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 28	
	augagaagua ugacaacagc cccacaccgg cuguugucau acuucucaug guucuucgga	60
	ac	62
25	<210> 29	
	<211> 62	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 29	
	ugagaaguau gacaacagcc ccacaccggc uguugucaua cuucucaug uucuucgga	60
	cc	62
35	<210> 30	
	<211> 62	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 30	
	agaaguauga caacagcccc acaccggcug uugucauacu ucucaugguu cuucggaacc	60
40	au	62
45	<210> 31	
	<211> 62	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

ES 2 645 996 T3

	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 31	
	aaguaugaca acagccccac accggcguguu gucauacuuc ucaugguucu ucggaacc <u>au</u>	60
	ga	62
5	<210> 32 <211> 62 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
10	<400> 32	
	guaugacaac agccccacac cggcguguugu cauacuucuc augguucuuc ggaacca <u>ga</u>	60
	ga	62
	<210> 33 <211> 62 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 33	
	augacaacag cccacaccg gcuguuguca uacuuc <u>cau</u> gguucuucg aaccaug <u>aga</u>	60
	ag	62
20	<210> 34 <211> 62 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 34	
	acaacagccc cacaccggcu guugucauac uuc <u>cauggu</u> ucuucggaac caugaga <u>agu</u>	60
	au	62
	<210> 35 <211> 62 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 35	
	aacagcccc caccggcugu ugucauacu cucaugguuc uucggaacca ugaga <u>aguau</u>	60
35	ga	62
	<210> 36 <211> 62 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 36	

ES 2 645 996 T3

	cagccccaca ccggcuguug ucauacuucu caugguucuu cggaaccaug agaaguauga	60
	ca	62
	<210> 37	
	<211> 62	
	<212> ARN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 37	
	agccccacac ccggcuguugu cauacuucuc augguucuu ggaaccauga gaaguaugac	60
	aa	62
10	<210> 38	
	<211> 62	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 38	
	gccccacacc ggccuguuguc auacuucua ugguucuu cg gaaccaugag aaguaugaca	60
	ac	62
	<210> 39	
	<211> 62	
20	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 39	
	ccccacaccg gcuguuguca uacuucucau gguucuu cgg aaccaugaga aaguaugaca	60
25	ca	62
	<210> 40	
	<211> 62	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 40	
	cccacaccgg ccuguugucau acuucucaug guucuu cgg accaugagaa guaugacaac	60
	ag	62
	<210> 41	
35	<211> 62	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
40	<400> 41	
	ccacaccggc uguugucaua cuucucaug uucuu cggaa ccaugagaag uaugacaaca	60
	gc	62
	<210> 42	
	<211> 62	

ES 2 645 996 T3

<212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

 5 <400> 42
 cagcuguaca uugacuuuag cccacaccg gcuaaaguca auguacagcu gcuucucgg 60

 aa 62

 <210> 43
 <211> 61
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

 <400> 43
 agcuguacau ugacuuuagc cccacaccgg cuaaagucaa uguacagcug cuucucgga 60

 a 61

 15 <210> 44
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> molécula de ácido nucleico

 <400> 44
 agcagcugua cauugacuuu agccccacac cggcuaaagu caauguacag cugcuucuu 60

 gg 62

 <210> 45
 <211> 61
 <212> ARN
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

 <400> 45
 gcagcuguac auugacuuua gccccacacc ggcuaaaguc aauguacagc ugcuucucg 60

 g 61

 <210> 46
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> molécula de ácido nucleico

 <400> 46
 uguuuugucuc guuacaauau cccacaccg gauuuuguaa cgagacaaac acuccucgg 60

 ga 62

 <210> 47
 <211> 62
 <212> ARN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

ES 2 645 996 T3

	<400> 47		
	aguguuuuguc ucguuacaau auccccacac cggauuuugu aacgagacaa acacuccuuc		60
	gg		62
	<210> 48		
	<211> 23		
5	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 48		
10	aaagctgcca atgccctcg acc	23	
	<210> 49		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 49		
	taggtgggtg gccctgtct tg	22	
	<210> 50		
20	<211> 62		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 50		
25	cgucaccaaa aagcgcaauu ccccacaccg gaauugcgcu uuuuggugac gcuucuucgg		60
	aa		62
	<210> 51		
	<211> 62		
	<212> ARN		
30	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 51		
	agcgucacca aaaagcgcaa uuccccacac cggauuugcg cuuuuuggug acgcuucuuc		60
	gg		62
	<210> 52		
35	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 52		
40	ctggacatca agctggcct ggac	24	
	<210> 53		
	<211> 24		
45	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		

ES 2 645 996 T3

<223> cebador

<400> 53
caccagcttg cgcattggcca cttc 24

5 <210> 54
<211> 64
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> molécula de ácido nucleico

10 <400> 54
aaccaugaga agaugacaa cagccccaca cggcuguug ucauacuucu caugguucgu 60
ucgc 64

<210> 55
<211> 62
<212> ARN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> molécula de ácido nucleico

<400> 55
accaugagaa guaugacaac agccccacac cggcuguugu cauacuucuc augguucuc 60
gg 62

20 <210> 56
<211> 60
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 56
accaugagaa guaugacaac agccacacc gcuguuguca uacuucucau gguucucgg 60

<210> 57
<211> 58
30 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> molécula de ácido nucleico

<400> 57
35 ccaugagaag uaugacaaca gccacaccg cuguugucau acuucucaug guuuucga 58

<210> 58
<211> 58
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> molécula de ácido nucleico

<400> 58
accaugagaa guaugacaac agccacacc uguugucaua cuucucaugg uucucgg 58

<210> 59
45 <211> 56
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 645 996 T3

<223> molécula de ácido nucleico

<400> 59
ccaugagaag uaugacaaca gccacacccu guugucauac uucucauggu uuucga 56

5 <210> 60
<211> 54
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> molécula de ácido nucleico

10 <400> 60
caugagaagu augacaacag ccacaccug uugucauacu ucucaugguu ucga 54

<210> 61
<211> 54
<212> ARN

15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> molécula de ácido nucleico

<400> 61
ccaugagaag uaugacaaca ccacaccugu ugucauacuu cucaugguuu ucga 54

20 <210> 62
<211> 52
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 62
caugagaagu augacaacac cacaccuguu gucauacuuc ucaugguuuc ga 52

<210> 63
<211> 26
<212> ARN

30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> molécula de ácido nucleico

<400> 63
ggaaucgaag uacucagcgu aaguuc 26

35 <210> 64
<211> 24
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 64
acuuacgcug aguacuucga uucc 24

<210> 65
<211> 51
<212> ARN

45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> molécula de ácido nucleico

50 <400> 65

ES 2 645 996 T3

acuuacgcug aguacuucga uuccggauc gaaguacuca gcguaaguuc g 51

<210> 66

<211> 51

<212> ARN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> molécula de ácido nucleico

<400> 66

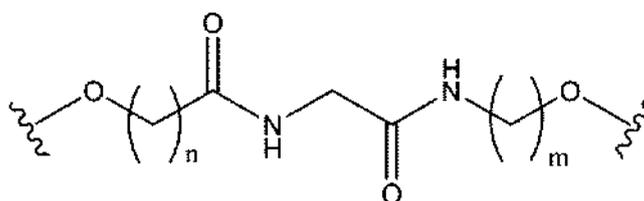
acuuacgcug aguacuucga uuccggauc gaaguacuca gcguaaguuc g 51

10

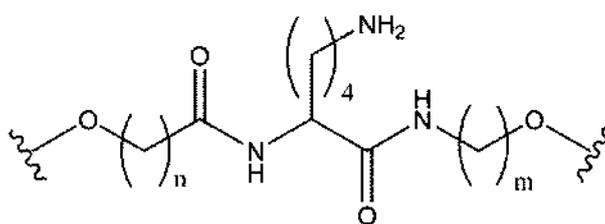
REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico monocatenario que comprende una secuencia inhibidora de la expresión que inhibe la expresión de un gen diana, y que comprende la región (X), la región (Y), la región conectora (Lx), la región conectora (Ly), la región (Xc) y la región (Yc), en donde

- 5 la región conectora (Lx) está unida entre la región (X) y la región (Xc),
 la región conectora (Ly) está unida entre la región (Y) y la región (Yc),
 la región (Xc) es complementaria a la región (X),
 la región (Yc) es complementaria a la región (Y),
 una región inteARN (Z) está formada por la región (X) y la región (Y) que están unidas entre sí,
- 10 al menos una de la región (Z), la región (Xc) y la región (Yc) contiene la secuencia inhibidora de la expresión, y
 la región conectora (Lx) y la región conectora (Ly) están representadas por la siguiente fórmula (I-1) o (I-4) en donde n es un número entero de 0 a 30 y m es un número entero de 0 a 30:



(I - 1)



(I - 4)

opcionalmente en donde,

- 15 (i) en la fórmula (I-1), n = 11 y m = 12;
 (ii) en la fórmula (I-1), n = 5 y m = 4; o
 (iii) en la fórmula (I-4), n = 5 y m = 4.

2. La molécula de ácido nucleico monocatenario según la reivindicación 1, en donde el número de bases (X) en la región (X) y el número de bases (Xc) en la región en la posición 5' (Xc) satisfacen la condición de la siguiente fórmula (3) o (5):

- 20 $X > Xc \dots (3)$
 $X = Xc \dots (5),$

opcionalmente en donde:

- 25 (a) el número de bases (X) en la región (X) y el número de bases (Xc) en la región en la posición 5' (Xc) satisfacen la condición de la siguiente fórmula (11):

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

- (b) el número de bases (Xc) en la región (Xc) es de 19 a 30.

3. La molécula de ácido nucleico monocatenario según la reivindicación 2, en donde:

(a) el número de bases (X) en la región (X), el número de bases (Y) en la región (Y), el número de bases (Xc) en la región (Xc) y el número de bases (Yc) en la región (Yc) satisfacen la condición de la siguiente fórmula (2) :

$$Z \geq Xc + Yc \dots (2); \text{ y/o}$$

5 (b) el número de bases (X) en la región (X), el número de bases (Xc) en la región (Xc), el número de bases (Y) en la región (Y), y el número de bases (Yc) en la región (Yc) satisfacen cualquiera de las siguientes condiciones (i) a (iv) :

(i)

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

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

10

(ii)

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

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

(iii)

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

15

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

(iv)

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

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

opcionalmente en donde,

20 en las condiciones (i) a (iv), la diferencia entre el número de bases (X) en la región (X) y el número de bases (Xc) en la región (Xc), y la diferencia entre el número de bases (Y) en la región (Y) y el número de bases (Yc) en la región (Yc) satisfacen las siguientes condiciones:

(i)

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

25

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

(ii)

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

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

(iii)

30

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

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

(iv)

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

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

35 4. La molécula de ácido nucleico monocatenario según la reivindicación 2 o 3, en donde:

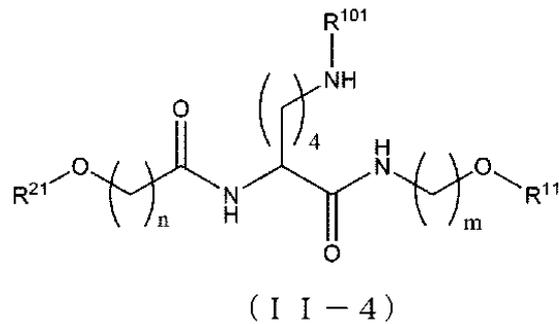
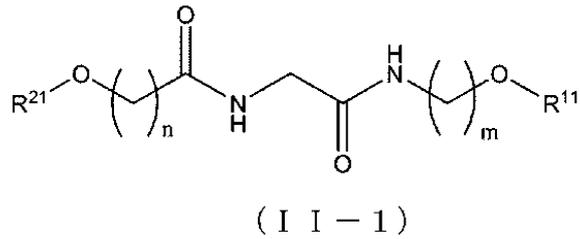
(a) el número de bases (Xc) en la región (Xc) es de 1 a 11,

opcionalmente en donde

(i) el número de bases (Xc) en la región (Xc) es de 1 a 7; o

(ii) el número de bases (Xc) en la región (Xc) es de 1 a 3; y/o

- (b) el número de bases (Yc) en la región (Yc) es de 1 a 11,
opcionalmente en donde
- (i) el número de bases (Yc) en la región (Yc) es de 1 a 7, o
- (ii) el número de bases (Yc) en la región (Yc) es de 1 a 3.
- 5 5. La molécula de ácido nucleico monocatenario según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4:
- (a) que comprende al menos un resto modificado; y/o
- (b) que comprende adicionalmente una sustancia de etiquetado; y/o
- (c) que comprende adicionalmente un isótopo estable; y/o
- (d) que es una molécula de ARN; y/o
- 10 (e) en donde el número total de bases en la molécula de ácido nucleico monocatenario es de 50 o más; y/o
- (f) en donde la expresión del gen está inhibida por ARN de interferencia.
6. Una composición para inhibir la expresión de un gen diana, composición que comprende:
la molécula de ácido nucleico monocatenario según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Una composición farmacéutica que comprende:
- 15 la molécula de ácido nucleico monocatenario según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
8. La composición farmacéutica según la reivindicación 7, para su uso en el tratamiento de inflamación.
9. Un método *in vitro* para inhibir la expresión de un gen diana, que comprende el uso de la molécula de ácido nucleico monocatenario según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, preferiblemente
- 20 (a) que comprende la etapa de administrar la molécula de ácido nucleico monocatenario a una célula, un tejido, o un órgano; y/o
- (b) en donde la expresión del gen está inhibida por ARN de interferencia.
10. Un método *in vitro* para inducir ARN de interferencia que inhibe la expresión de un gen diana, que comprende el uso de la molécula de ácido nucleico monocatenario según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 25 11. Uso de la molécula de ácido nucleico monocatenario según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 *in vitro* para:
- (a) inhibir la expresión de un gen diana; o
- (b) inducir ARN de interferencia.
12. Una molécula de ácido nucleico para uso en el tratamiento de una enfermedad, en donde
- 30 la molécula de ácido nucleico es la molécula de ácido nucleico monocatenario según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y la molécula de ácido nucleico monocatenario comprende, como secuencia inhibidora de la expresión, una secuencia que inhibe la expresión de un gen que causa la enfermedad.
13. Un monómero para síntesis de molécula de ácido nucleico, que tiene la estructura de la siguiente fórmula (II-1) o (II-4) :



en donde R^{11} y R^{21} son cada uno independientemente H, un grupo protector o un grupo protector de fosfato y

en la fórmula (II-4), R^{101} es, independientemente de R^{11} y R^{21} , H, un grupo protector o un grupo protector de fosfato, en donde:

- 5 (a) en la fórmula (II-1), $n = 11$ y $m = 12$;
 (b) en la fórmula (II-1), $n = 5$ y $m = 4$; o
 (c) en la fórmula (II-4), $n = 5$ y $m = 4$.

14. El monómero según la reivindicación 13:

(a) que comprende adicionalmente una sustancia de etiquetado; y/o

10 (b) que comprende adicionalmente un isótopo estable; y/o

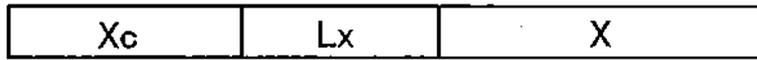
(c) para uso en síntesis automatizada de ácido nucleico.

15. Un método para producir una molécula de ácido nucleico, que comprende el uso del monómero según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, opcionalmente en donde la molécula de ácido nucleico es la molécula de ácido nucleico monocatenario según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

15

Fig. 1

(A)



(B)

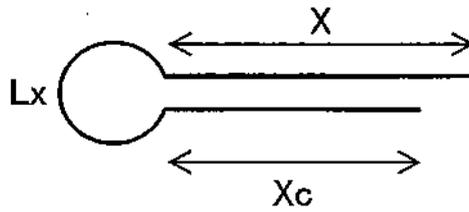
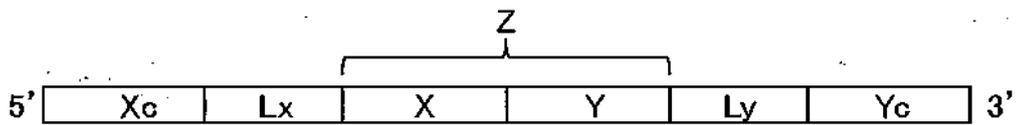


Fig. 2

(A)



(B)

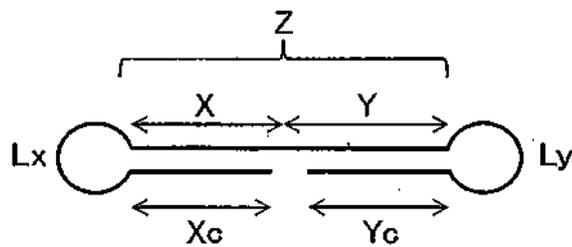


Fig. 3

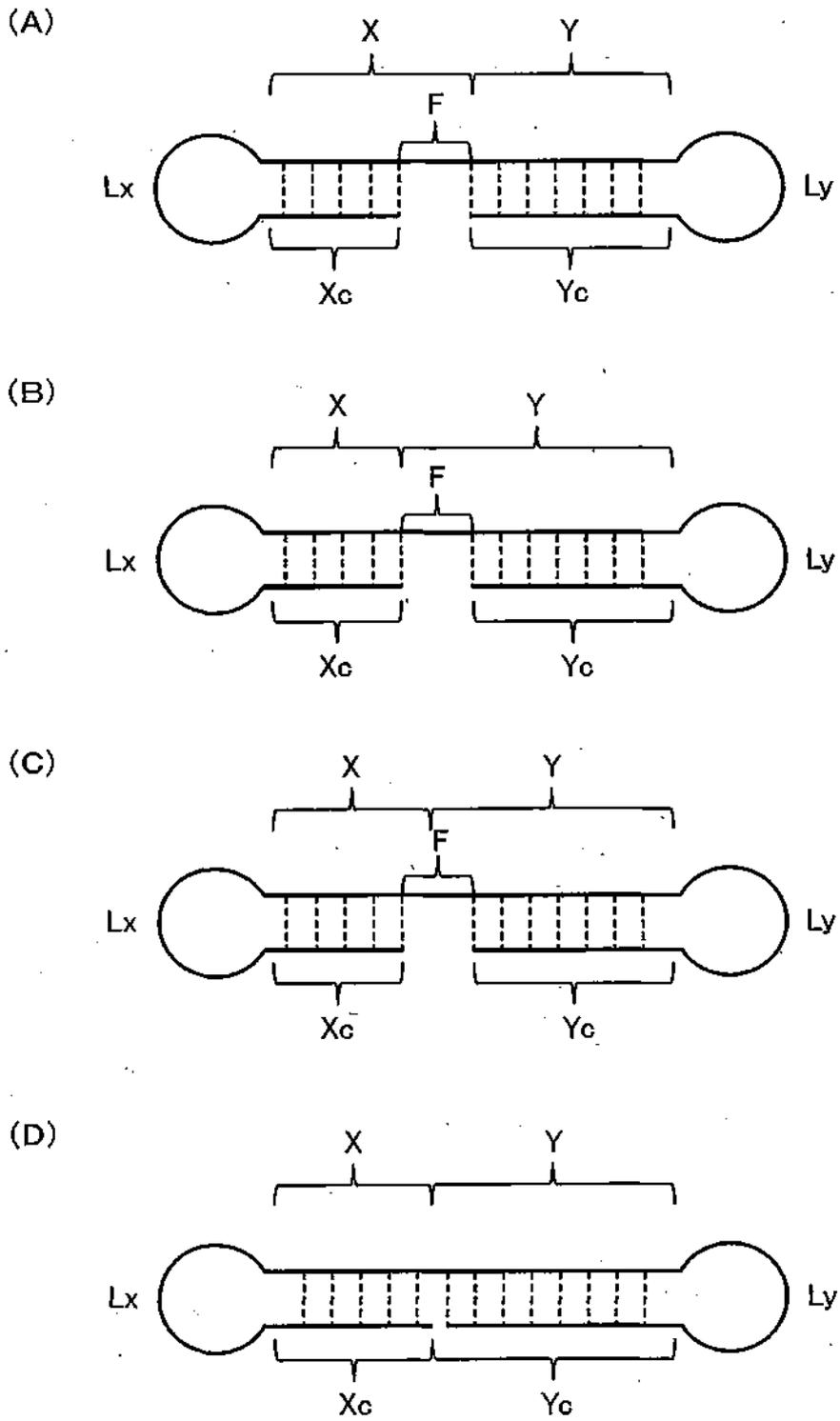


FIG. 4

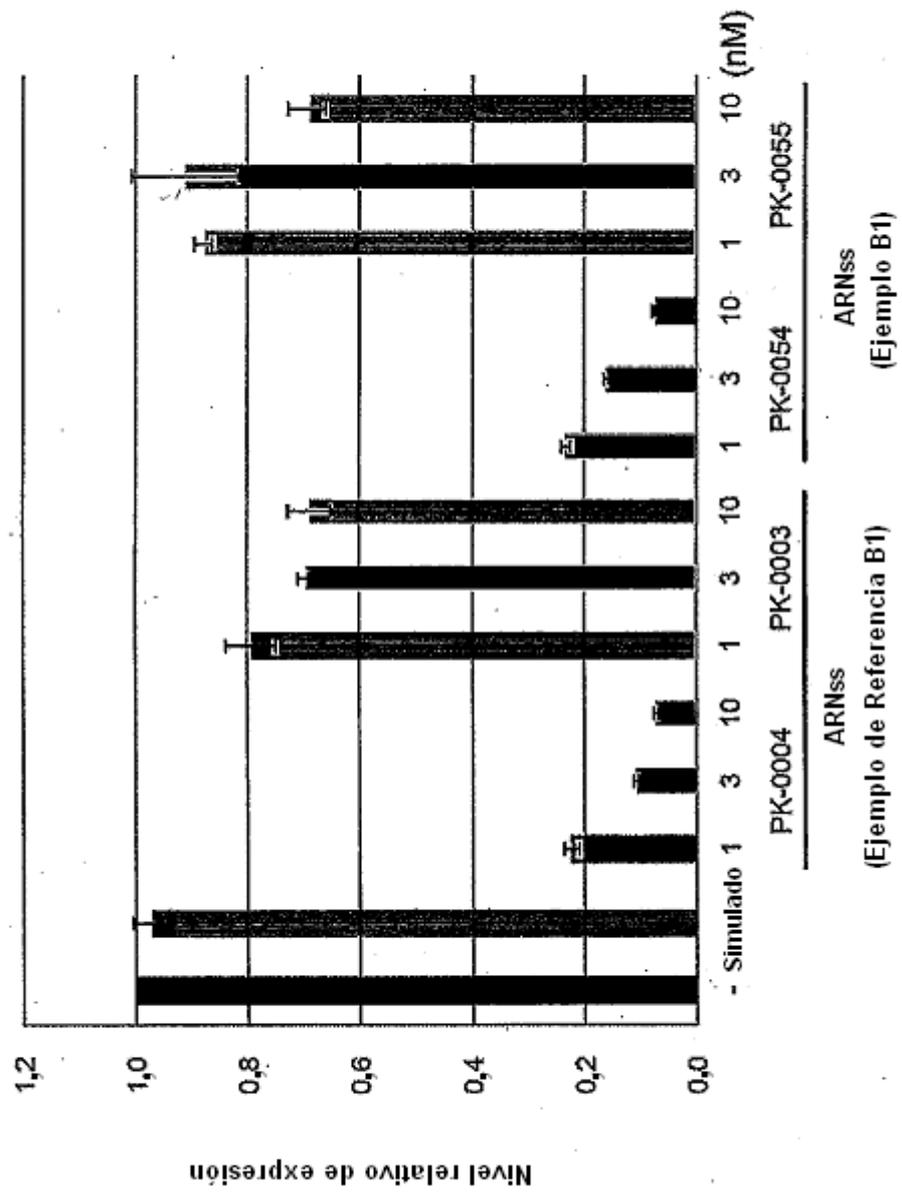


Fig. 5

	Xc/Yc		
NK-0036	25/1	5' - <u>aacc<u>a</u>gga<u>g</u>aa<u>g</u>ua<u>g</u>aca<u>a</u>ca<u>g</u>cc</u>	24
NK-0025	24/1	5' - <u>acc<u>a</u>gga<u>g</u>aa<u>g</u>ua<u>g</u>aca<u>a</u>ca<u>g</u>cc</u>	25
NK-0037	23/2	5' - <u>cca<u>u</u>gga<u>g</u>aa<u>g</u>ua<u>g</u>aca<u>a</u>ca<u>g</u>cc</u>	26
NK-0016	22/3	5' - <u>ca<u>u</u>gga<u>g</u>aa<u>g</u>ua<u>g</u>aca<u>a</u>ca<u>g</u>cc</u>	27
NK-0038	21/4	5' - <u>au<u>g</u>ga<u>g</u>aa<u>g</u>ua<u>g</u>aca<u>a</u>ca<u>g</u>cc</u>	28
NK-0026	20/5	5' - <u>u<u>g</u>ga<u>g</u>aa<u>g</u>ua<u>g</u>aca<u>a</u>ca<u>g</u>cc</u>	29
NK-0027	18/7	5' - <u>aga<u>g</u>aa<u>g</u>ua<u>g</u>aca<u>a</u>ca<u>g</u>cc</u>	30
NK-0028	16/9	5' - <u>aa<u>g</u>ua<u>g</u>aca<u>a</u>ca<u>g</u>cc</u>	31
NK-0029	14/11	5' - <u>ua<u>g</u>aca<u>a</u>ca<u>g</u>cc</u>	32
NK-0014	12/13	5' - <u>au<u>g</u>aca<u>a</u>ca<u>g</u>cc</u>	33
NK-0030	9/16	5' - <u>aca<u>a</u>ca<u>g</u>cc</u>	34
NK-0031	7/18	5' - <u>a<u>a</u>ca<u>g</u>cc</u>	35
NK-0020	5/20	5' - <u>ca<u>g</u>cc</u>	36
NK-0019	4/21	5' - <u>ag<u>cc</u></u>	37
NK-0018	3/22	5' - <u>g<u>cc</u></u>	38
NK-0039	2/23	5' - <u>cc</u>	39
NK-0032	1/24	5' - <u>c</u>	40
NK-0040	1/25	5' - <u>c</u>	41

Fig. 6

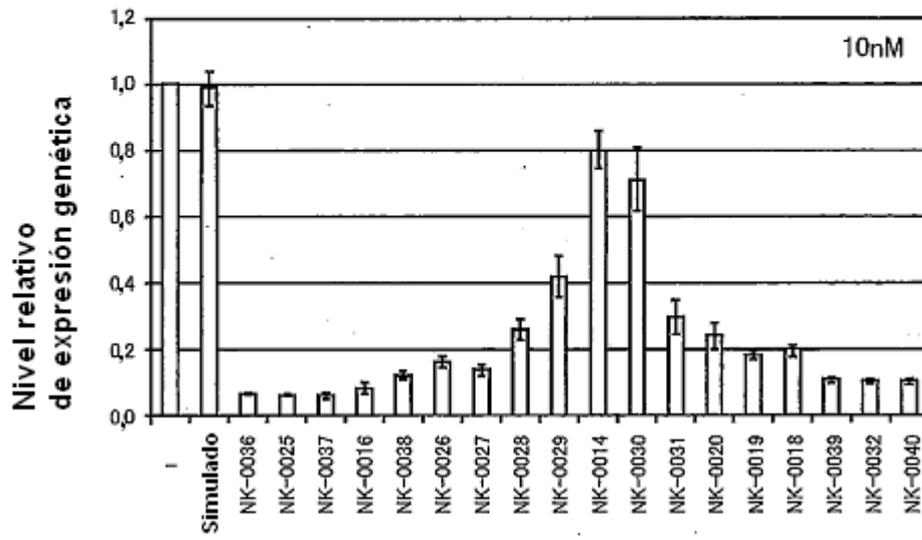


Fig. 7

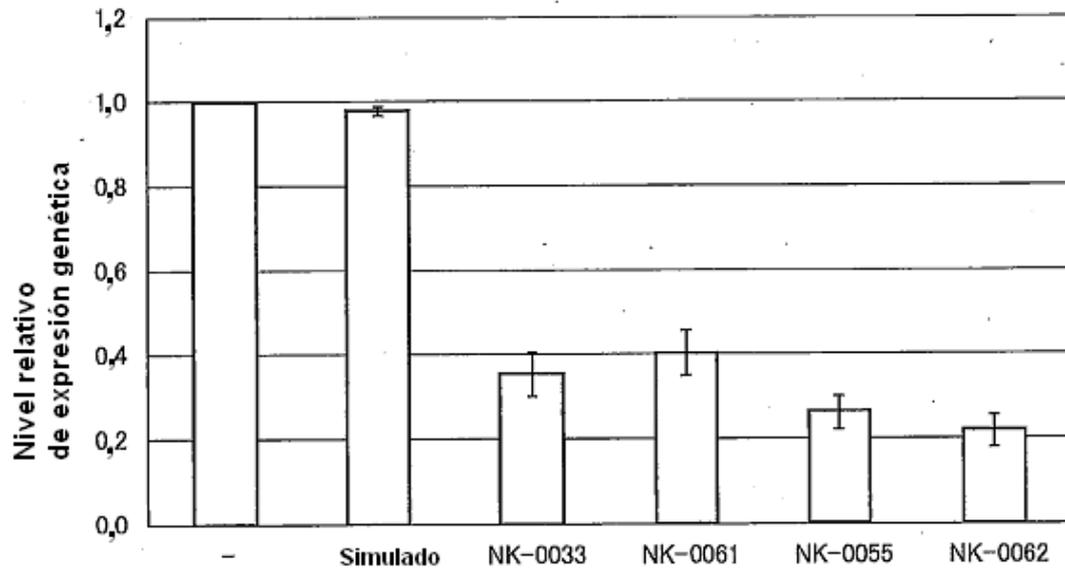


Fig. 8

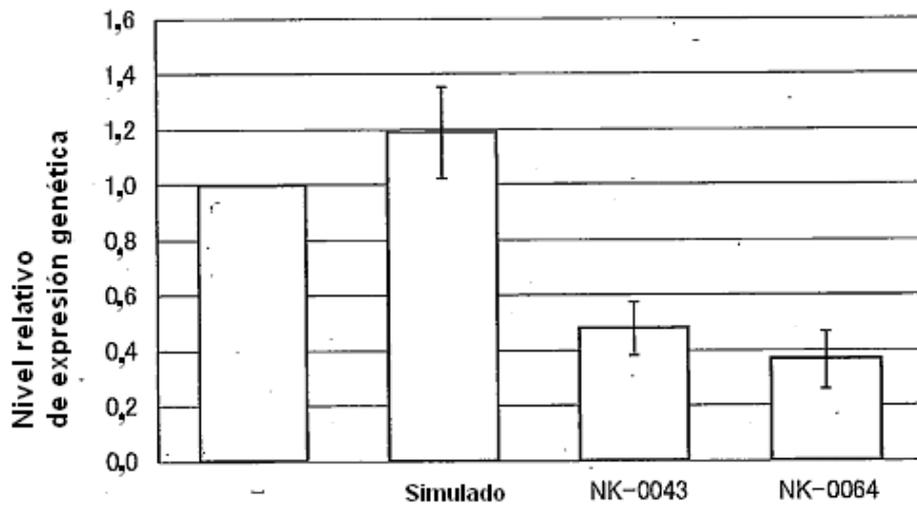


Fig. 9

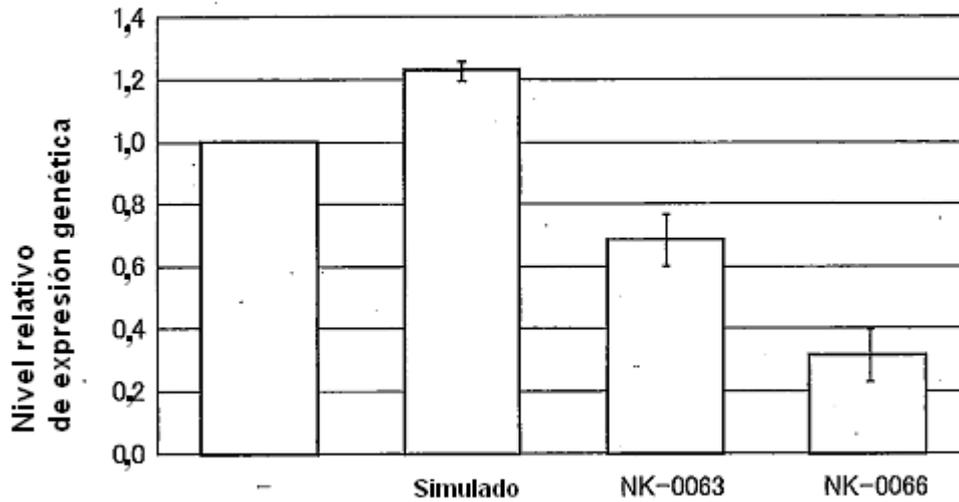


Fig. 10

Xc+Yc/X+Y

NK-0047	26/27	5' - <u>aa</u> ccaugaga <u>aa</u> quaugaca <u>aa</u> caagccCCACACCC <u>CGUGUGUCAUACUUCUCAUGGUU</u> ^X CTJCCe _a -3'	54
NK-0025	25/26	5' - <u>a</u> ccaugaga <u>aa</u> quaugaca <u>aa</u> caagccCCACACCC <u>CGUGUGUCAUACUUCUCAUGGUU</u> ^X CTJCCe _a -3'	55
NK-0048	24/25	5' - <u>a</u> ccaugaga <u>aa</u> quaugaca <u>aa</u> caagccCCACACCC <u>CGUGUGUCAUACUUCUCAUGGUU</u> ^X CTJCCe _a -3'	56
NK-0049	23/24	5' - <u>cc</u> augaga <u>aa</u> quaugaca <u>aa</u> caagccCCACACCC <u>CGUGUGUCAUACUUCUCAUGGUU</u> ^X CTJCCe _a -3'	57
NK-0050	23/24	5' - <u>a</u> ccaugaga <u>aa</u> quaugaca <u>aa</u> caagccCCACACCC <u>CGUGUGUCAUACUUCUCAUGGUU</u> ^X CTJCCe _a -3'	58
NK-0051	22/23	5' - <u>cc</u> augaga <u>aa</u> quaugaca <u>aa</u> caagccCCACACCC <u>CGUGUGUCAUACUUCUCAUGGUU</u> ^X JJCCe _a -3'	59
NK-0052	21/22	5' - <u>ca</u> ugaga <u>aa</u> quaugaca <u>aa</u> caagccCCACACCC <u>CGUGUGUCAUACUUCUCAUGGUU</u> ^X JJCCe _a -3'	60
NK-0053	21/22	5' - <u>cc</u> augaga <u>aa</u> quaugaca <u>aa</u> caagccCCACACCC <u>CGUGUGUCAUACUUCUCAUGGUU</u> ^X JJCCe _a -3'	61
NK-0054	20/21	5' - <u>ca</u> ugaga <u>aa</u> quaugaca <u>aa</u> caagccCCACACCC <u>CGUGUGUCAUACUUCUCAUGGUU</u> ^X JJCCe _a -3'	62

Fig. 11

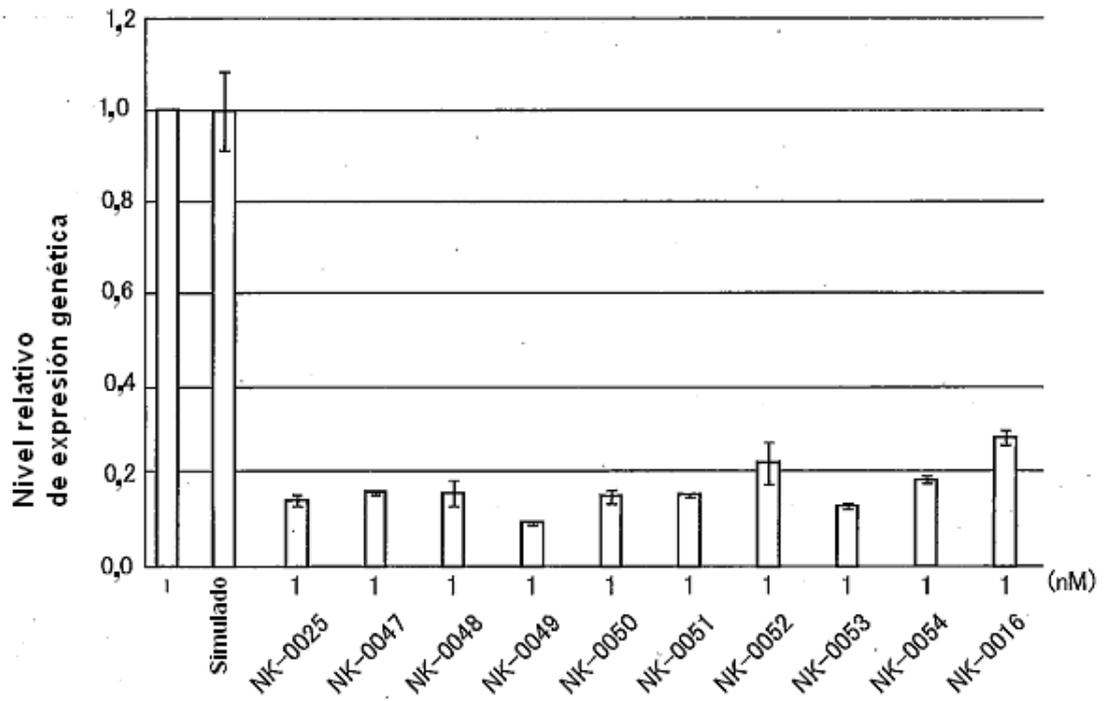


FIG. 12

