

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 992**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C07C 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.12.2011 PCT/JP2011/077758**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12074038**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2011 E 11845160 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2647713**

54 Título: **Polinucleótido monocatenario modificado**

30 Prioridad:

02.12.2010 JP 2010269498

27.04.2011 JP 2011100159

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

24.04.2018

73 Titular/es:

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)

3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku

Tokyo 103-8426, JP

72 Inventor/es:

**KOIZUMI, MAKOTO,;
HIROTA, YASUhide;
NAKAYAMA, MAKIKO y
IKEDA, MIKA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 664 992 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

Polinucleótido monocatenario modificado

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un polinucleótido monocatenario que tiene un efecto interferencia de ARN y/o un efecto inhibitor de la expresión génica, al uso del polinucleótido, a un procedimiento para producir el polinucleótido, a una composición farmacéutica que comprende el polinucleótido, etc.

Técnica antecedente

- 10 Los procedimientos para inhibir la expresión de un gen diana en las células, tejidos o individuos incluyen un enfoque en el que ARN bicatenario se introduce en las células, tejidos o individuos. Mediante esta introducción de ARN bicatenario, el ARNm que tiene homología con la secuencia se degrada, de forma que la expresión del gen diana queda inhibida. Este efecto se denomina "interferencia de ARN" o "ARNi". La interferencia de ARN se notificó inicialmente en *C. elegans* (véase por ejemplo, la Referencia no de patente 1) y posteriormente también se ha notificado en plantas (véase por ejemplo, la Referencia no de patente 2).

- 15 Se ha notificado que el ARN bicatenario que consiste en hebras de 21 nucleótidos de sentido directo y de sentido contrario que tienen un saliente de 2 nucleótidos en el extremo 3' (ARN interferente pequeño: ARNip) tiene un efecto de interferencia del ARN en células de vertebrados cultivadas (véase por ejemplo, la Referencia no de patente 3). El ARNip se considera de utilidad para la identificación de funciones génicas, cribado de cepas celulares adecuadas para la producción de sustancias útiles, regulación de genes implicados en enfermedades, etc., pero, sin embargo, de manera característica, se degrada fácilmente con RNasa (véase por ejemplo, la Referencia no de patente 4).

- 20 Se ha notificado que un polinucleótido bicatenario que tiene unidades de nucleótidos de ADN y 2'-OMeARN combinadas alternativamente, en lugar de los ARN que constituyen el ARNip, es resistente a la RNasa y tiene un efecto de interferencia del ARN (véase por ejemplo, la Referencia no de patente 1).

- 25 Se han realizado algunos informes sobre la modificación de los extremos 5' de las hebras de sentido directo y sentido contrario en el ARNip. Se ha notificado que el ARNip que tiene un grupo 6-aminohexilfosfato en el extremo 5' de la hebra de sentido contrario o de sentido contrario tiene un efecto inhibitor frente a la expresión del ARNm diana (véase por ejemplo, la Referencia no de patente 5). Por otra parte, se ha notificado que el ARNip que tiene un grupo 6-aminohexilfosfato en el extremo 5' de la hebra de sentido contrario no tiene actividad inhibitora contra la expresión del ARNm diana (véase por ejemplo, la Referencia no de patente 6). También se ha notificado que el ARNip que tiene un grupo 3-aminohexilfosfato en el extremo 5' de la hebra de sentido directo tiene un efecto inhibitor frente a la expresión del ARNm diana, mientras que el ARNip que tiene un grupo 3-aminohexilfosfato en el extremo 5' de la hebra de sentido contrario no tiene actividad inhibitora contra la expresión del ARNm diana (véase por ejemplo, la Referencia no de patente 7). Se ha notificado que la actividad inhibitora contra la expresión del ARNm diana se observa más baja en el ARNip que tiene el grupo 6-aminohexilfosfato o el grupo 3-aminopropilfosfato en el extremo 5' de la hebra de sentido contrario que en el ARNip sin modificar, pero no se pierde por completo. (véase por ejemplo, la Referencia no de patente 8).

- 35 Se ha notificado que el ARNip que tiene fluoresceína en el extremo 5' de la hebra de sentido contrario o de sentido contrario tiene también un efecto inhibitor frente a la expresión del ARNm diana (véase por ejemplo, la Referencia no de patente 9). Se ha notificado que los ARNip que tienen una estructura de esteroide o lípido en el extremo 5' de la hebra de sentido directo o de sentido contrario, el ARNip que tiene estructura de esteroide o lípido en el extremo 5' de la hebra de sentido detectado tiene actividad inhibitora contra la expresión del ARNm diana (véase por ejemplo, la Referencia no de patente 8). Se ha notificado que, cuando el ARNip tiene un derivado de orto-nitrobencilo, que se puede eliminar por irradiación UV, en el extremo 5' de la hebra de sentido contrario, su actividad inhibitora contra la expresión del ARNm diana se puede controlar usando la irradiación UV (véase por ejemplo, la Referencia no de patente 10).

- 45 El ARNip cuyo extremo 3' de la hebra de sentido directo y el extremo 5' de la hebra de sentido contrario están unidas mediante un bucle que consiste en aproximadamente 4 unidades de nucleótidos forma un polinucleótido monocatenario denominado ARN en horquilla corto (ARNsh). Se ha demostrado que el ARNsh que tiene un resto en el tallo de 19 pb en el resto del tallo tiene menor actividad que un ARNip de 19 pb que tiene la misma secuencia de nucleótidos que el anterior (véase por ejemplo, la Referencia no de patente 9). Aunque el ARNsh que comprende el tallo de 19 pb y el bucle que tiene dos nucleótidos se sustituya por un enlazador no nucleotídico tal como unidades de propil fosfato se sintetizó y examinó para determinar su actividad inhibitora frente a la expresión del ARNm diana, no se observó mejora en la actividad, en comparación con el ARNsh sin modificar (véase por ejemplo, la Referencia no de patente 9). Un ejemplo que utiliza un derivado de orto-nitrobencilo se ha notificado como ARNip en el que el extremo 3' de la hebra de sentido directo y el extremo 5' de la hebra de sentido contrario están unidas mediante un enlazador no nucleotídico (véase por ejemplo, la Referencia no de patente 8). Este ARNip de 19 pb cuyas hebras de sentido directo y de sentido contrario están unidas mediante el derivado de orto-nitrobencilo tiene una actividad inhibitora más baja contra la expresión del ARNm que el ARNip sin modificar. Además, las células cultivadas transfectadas con este ARNip fueron irradiadas con UV durante 10 minutos y se examinaron para detectar la

actividad inhibidora del ARNip contra la expresión del ARNm diana. Como resultado, la actividad inhibidora del ARNip contra la expresión del ARNm diana fue más baja que la del ARNip sin modificar. Un polinucleótido monocatenario que tenga una estructura en la cual el extremo 5' de la hebra de sentido contrario y el extremo 3' de la hebra de sentido directo estén unidas mediante un enlazador que contiene un grupo fenilo para formar una estructura fosfodiéster en cada uno de estos extremos no se conoce aún. El documento EP2233573 analiza el con del ARN de interferencia en cremallera (ARNzi).

El análisis mediante rayos X de un complejo de una hebra de sentido contrario con la proteína Argonauta (Ago) conocida por participar en la actividad de ARNi ha mostrado que el grupo fosfato del extremo 5' de la hebra de sentido contrario y sus nucleótidos vecinos están fuertemente unidos al dominio PIWI de Ago (véase por ejemplo, la Referencia no de patente 11). Se ha notificado que tras la introducción de ARNip químicamente sintetizado en células, tanto la hebras de sentido directo como la de sentido contrario quedan fosforiladas en su extremo 5' (véase por ejemplo, la Referencia no de patente 12). En células humanas, se ha notificado que la ARN quinasa hCip1 es la responsable de la fosforilación en 5' del ARNip (véase por ejemplo, la Referencia no de patente 13). Cuando el ARNip con el extremo 5' fosforilado y el ARNip que tiene un extremo 5' no fosforilado se introducen por separado en células, y se comparan sus actividades de ARNi, no se aprecia ninguna diferencia en la actividad entre las mismas, lo que indica que el ARNip que tiene un extremo 5' no fosforilado se somete fácilmente a fosforilación en las células (véase por ejemplo, la Referencia no de patente 9).

En el caso de usar el ARNsh en el que el extremo 3' de la hebra de sentido directo y el extremo 5' de la hebra de sentido contrario están unidas por un bucle, este ARNsh está escindido intracelularmente mediante la proteína Dicer o una endonucleasa para formar una hebra de sentido contrario que tiene un grupo fosfato en su extremo 5' (véase por ejemplo, la Referencia no de patente 9). No se puede esperar que el ARNsh que comprende un tallo de 19 pb y un bucle que tiene dos nucleótidos sustituidos por unidades de propilfosfato experimente escisión mediante Dicer o endonucleasa intracelulares, porque las unidades de propilfosfato son resistentes a nucleasa (véase por ejemplo, la Referencia no de patente 9). Como alternativa, se puede esperar que el ARNsh que comprende un tallo de 19 pb y un bucle que tiene un derivado de orto-nitrobencilo forme una hebra de sentido contrario que tenga un grupo fosfato en el extremo 5' mediante irradiación UV. Dicha irradiación UV, sin embargo, es difícil de aplicar a organismos vivos debido a las posibles reacciones adversas y debido a la dificultad de aplicar irradiación UV en el interior de un organismo vivo (véase por ejemplo, la Referencia no de patente 8). Un polinucleótido monocatenario que comprenda un tallo de 19 pb o menos y un bucle que tenga un enlazador no nucleotídico solo, que se escinde intracelularmente mediante Dicer o endonucleasa sin irradiación UV para formar una hebra de sentido contrario que tenga un grupo fosfato en el extremo 5', no se conoce aún.

Los presentes inventores han llevado a cabo esmerados estudios para obtener un polinucleótido que tenga un efecto de interferencia del ARN y/o un efecto inhibidor de la expresión génica y, en consecuencia, han completado la presente invención descubriendo un polinucleótido monocatenario que tiene un efecto de interferencia del ARN y/o un efecto inhibidor de la expresión génica, que se deriva de un polinucleótido bicatenario que comprende una hebra de sentido directo correspondiente a un gen diana, y un polinucleótido con hebra de sentido contrario que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria del polinucleótido con hebra de sentido directo, y tiene una estructura en la que el extremo 5' de la hebra de sentido contrario y el extremo 3' de la hebra de sentido directo están unidas mediante un enlazador que contiene un grupo fenilo para formar una estructura fosfodiéster en cada uno de estos extremos.

Referencia

Referencias de patente

Referencia de patente 1: Publicación Internacional n.º WO 2010/001909

Referencias no de patente

- Referencia no de patente 1: Nature, 1998, Vol. 391, págs. 806-811
- Referencia no de patente 2: Science, 1999, Vol. 286, págs. 950-952
- Referencia no de patente 3: Nature, 2001, Vol. 411, págs. 494-498
- Referencia no de patente 4: Clinical Chemistry, 2002, Vol. 48, págs. 1647-1653
- Referencia no de patente 5: Molecular Cell, 2002, Vol. 10, págs. 537-548
- Referencia no de patente 6: Nucleic Acids Research, 2003, Vol. 31, págs. 2705-2716
- Referencia no de patente 7: Molecular Cell, 2002, Vol. 10, págs. 549-561
- Referencia no de patente 8: Oligonucleotides, 2007, Vol. 17, págs. 35-43
- Referencia no de patente 9: Antisense Nucleic Acid Drug Development, 2003, Vol. 13, págs. 83-105
- Referencia no de patente 10: Biochimica Biophysica Acta, 2006, Vol. 1758, págs. 394-403
- Referencia no de patente 11: Nature, 2005, Vol. 434, págs. 663-666
- Referencia no de patente 12: Cell, 2001, Vol. 107, págs. 309-321
- Referencia no de patente 13: Nature, 2007, Vol. 447, págs. 222-226

Sumario de la invención

Problemas que va a resolver la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un polinucleótido que tiene un efecto de interferencia de ARN y/o un efecto inhibidor de la expresión génica.

- 5 Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un polinucleótido que sea resistente a ARNasa y que tenga un efecto de interferencia de ARN y/o un efecto inhibidor de la expresión génica.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un procedimiento para inhibir la expresión génica usando el polinucleótido.

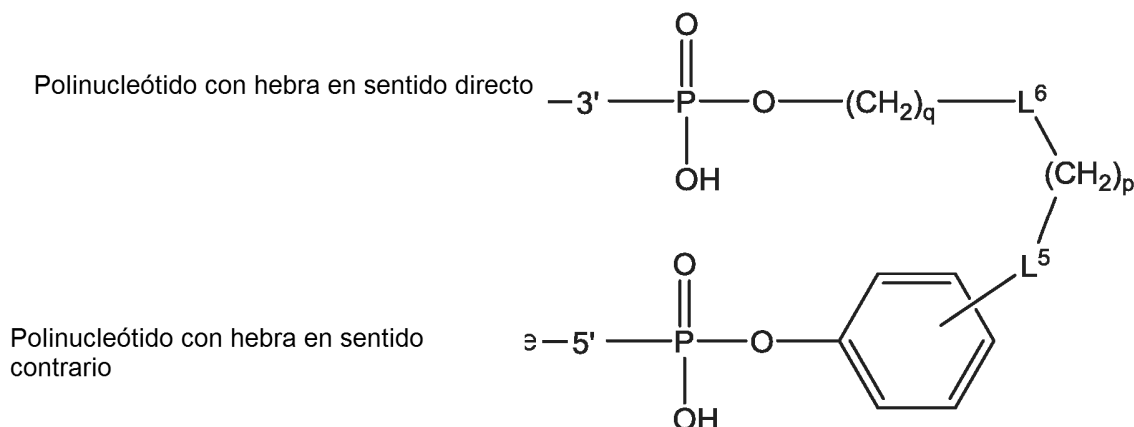
- 10 Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende el polinucleótido.

Medios para resolver los problemas

Específicamente, la presente invención consiste en:

- 15 (1) Un polinucleótido o una sal del mismo, comprendiendo el polinucleótido un polinucleótido con una hebra de sentido directo que correspondiente a un gen diana, y un polinucleótido con una hebra de sentido contrario que tiene una secuencia de polinucleótidos complementaria de la del polinucleótido con hebra de sentido directo y que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula, en la que el extremo 5' del polinucleótido con hebra en sentido contrario y el extremo 3' del polinucleótido con hebra en sentido directo están unidos mediante un enlazador a través de enlaces fosfodiéster:

[Fórmula 2]



en la que

- 25 p representa un número entero de 0 a 4,
 q representa un número entero de 4 a 10,
 L⁵ representa un enlace simple o -O-,
 L⁶ representa -(C=O)-NH- o -NH-(C=O)- partiendo del enlace con (CH₂)_p,
 L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición meta o para, y
 a condición de que L⁵ sea -O-, entonces, p representa un número entero de 1 a 4.

- 30 (2) El polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con (1), en el que la suma de p y q es un número entero de 4 o mayor, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para, preferentemente en el que la suma de p y q es un número entero de 8 o mayor.

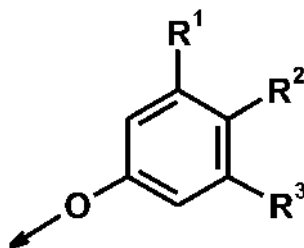
(3) El polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con (1), en el que p es 0 o 2, q es un número entero de 6 o mayor, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para, preferentemente en el que q es 6 u 8 más preferentemente en el que q es 8.

- 35 (4) El polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con (1), en el que p es 2, q es 8, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para.

(5) Un polinucleótido o una sal del mismo, comprendiendo el polinucleótido un polinucleótido con una hebra de sentido directo que correspondiente a un gen diana, y un polinucleótido con una hebra de sentido contrario que tiene una secuencia de polinucleótidos complementaria de la del polinucleótido con hebra de sentido directo, en el que el extremo 5' del polinucleótido con hebra en sentido contrario y el extremo 3' del polinucleótido con hebra

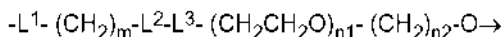
en sentido directo están unidos mediante un enlazador para formar una estructura fosfodiéster en cualquiera de dichos extremos, teniendo el enlazador una estructura representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 1]



5 en la que

el átomo de oxígeno unido al grupo fenilo está unido al extremo 5' de la hebra de sentido contrario para formar una estructura fosfodiéster;
uno cualquiera de R¹, R², y R³ representa una estructura representada mediante la siguiente fórmula:



10 en la que

m representa un número entero de 0 a 4,

n1 representa un número entero de 0 a 4,

n2 representa 0 o un número entero de 2 a 10,

L¹ representa un enlace simple o -O-,

15 L² representa un enlace simple o -CH(NH-L⁴-R)-,

L³ representa un enlace simple, -(C=O)-NH-, o -NH-(C=O)- partiendo del enlace con L²,

a condición de que L³ no sea un enlace simple, entonces n2 representa un número entero de 2 a 10,

a condición de que se cada L¹ y L² sean un enlace simple, m es 1, y cada uno de n1 y n2 es 0, entonces L³-

O→ representa -CH(COOH)NH-(resto de aminoácido)-Ser,

20 -CH(COOH)NH-(resto de aminoácido)-Thr,

-CH(NH₂)CO-(resto de aminoácido)-Ser, o

-CH(NH₂)CO-(resto de aminoácido)-Thr, en la que

el resto del grupo hidroxilo de esta serina o treonina está unido al grupo fosfato del extremo 3' del polinucleótido con hebra en sentido directo, y el grupo amino de la serina o treonina puede estar

25 adicionalmente sustituido por un grupo acilo, j representa un número entero de 0 a 2,

L⁴ representa un enlace simple, un grupo metileno, un grupo polimetileno que tiene de 2 a 4 átomos de carbono, o la estructura -(C=O)-CH₂-CH₂-(C=O)-O- en la que un grupo carbonilo de la estructura -(C=O)-CH₂-CH₂-(C=O)-O- está unido al grupo amino del extremo izquierdo de la fórmula estructural para formar la

30 estructura -NH-(C=O)-CH₂-CH₂-(C=O)-O- y
R representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, un grupo de hidrocarburo saturado o insaturado-carbonilo que tiene de 2 a 30 átomos de carbono, o un grupo hidrocarbonoxicarbonilo saturado o insaturado que tiene de 2 a 30 átomos de carbono; y

los dos restantes de R¹, R², y R³ representan, cada uno de ellos independientemente, un grupo seleccionado entre el grupo que consiste en un átomo de hidrógeno,

35 un grupo alquilo que tiene de 1 a 8 átomos de carbono que puede tener un sustituyente,

un grupo alcoxi que tiene de 1 a 8 átomos de carbono que puede tener un sustituyente,

un átomo de halógeno,

un grupo alquilcarbonilamino que tiene un grupo alquilo que tiene de 1 a 9 átomos de carbono, y

un grupo alquilcarbonilo que contiene un grupo alquilo que tiene de 1 a 8 átomos de carbono que puede tener un sustituyente;

40 (6) El polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con (5), en el que cada R¹ y R³ es un átomo de hidrógeno;

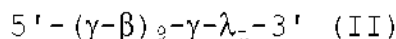
(7) El polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con (6), en el que cada L¹ y L² es un enlace simple, L³ es -(C=O)-NH-, y la suma de m y n2 es un número entero de 3 o mayor, preferentemente 8 o mayor;

45 (8) El polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con (6), en el que cada L¹ y L² es un enlace simple, L³ es -(C=O)-NH-, m es 0 o 2, y n2 es un número entero de 6 o mayor, preferentemente 6 u 8, más preferentemente 8;

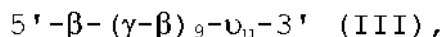
(9) El polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con (5), en el que cada R¹ y R³ es un átomo de hidrógeno, cada L¹ y L² es un enlace simple, L³ es -(C=O)-NH-, m es 2, y n2 es 8;

(10) El polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con (1) to (9), en el que el polinucleótido con hebra en sentido directo consiste de un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (II), el polinucleótido con hebra en sentido contrario consiste de un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (III), y el

polinucleótido tiene además las siguientes características de (a) a (d):

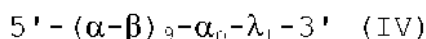


y



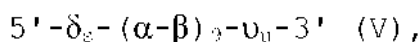
- 5 (a) γ representa un ARN, β representa un 2'-OMeARN, y cada λ y u representa un ADN;
 (b) t y u representan, de forma idéntica o diferente, cualquier número entero de 0 a 5;
 (c) $(\gamma - \beta)_9 - \gamma$ en el polinucleótido representado mediante la fórmula (II) tiene una secuencia de nucleótidos idéntica a la del gen diana; y
 10 (d) $(\gamma - \beta)_9 - \gamma$ en la fórmula (II) y $\beta - (\gamma - \beta)_9$ en la fórmula (III) tienen secuencias de nucleótidos complementarias entre sí;

(11) El polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con (1) to (9), en el que el polinucleótido con hebra en sentido directo consiste de un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (IV), el polinucleótido con hebra en sentido contrario consiste de un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (V), y el polinucleótido tiene además las siguientes características de (a) a (d):



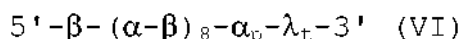
15

y

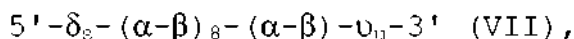


- 20 (a) α y β representan, de forma diferente, un ADN o un 2'-OMeARN, δ y λ representan, de forma idéntica o diferente, un ADN o un 2'-OMeARN, y u representa, de manera idéntica o diferente, cualquier nucleótido seleccionado entre un ADN, un ARN, y un 2'-OMeARN;
 (b) p representa un número entero de 0 o 1, t es 0 cuando p es 0 y representa cualquier número entero de 0 a 5 cuando p es 1, s representa cualquier número entero de 0 o 1, y u representa cualquier número entero de 0 a 5;
 25 (c) $(\alpha - \beta)_9 - \alpha_p$ en el polinucleótido representado mediante la fórmula (IV) tiene una secuencia de nucleótidos idéntica a la del gen diana; y
 (d) $(\alpha - \beta)_9$ en la fórmula (IV) y $(\alpha - \beta)_9$ en la fórmula (V) tienen secuencia de nucleótidos complementarias entre sí;

(12) El polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con (1) to (9), en el que el polinucleótido con hebra en sentido directo consiste de un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (VI), el polinucleótido con hebra en sentido contrario consiste de un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (VII), y el polinucleótido tiene además las siguientes características de (a) a (d):



y



- 35 (a) α y β representan, de forma diferente, un ADN o un 2'-OMeARN, δ y λ representan, de forma idéntica o diferente, un ADN o un 2'-OMeARN, y u representa, de manera idéntica o diferente, cualquier nucleótido seleccionado entre un ADN, un ARN, y un 2'-OMeARN;
 (b) p representa un número entero de 0 o 1, t es 0 cuando p es 0 y representa cualquier número entero de 0 a 5 cuando p es 1, s representa cualquier número entero de 0 o 1, y u representa cualquier número entero de 0 a 5;
 40 (c) $\beta - (\alpha - \beta)_8 - \alpha_p$ en el polinucleótido representado mediante la fórmula (VI) tiene una secuencia de nucleótidos idéntica a la del gen diana; y
 (d) $(\alpha - \beta)_8$ en la fórmula (VI) y $(\alpha - \beta)_8$ en la fórmula (VII) tienen secuencias de nucleótidos complementarias entre sí;

45 (13) El polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con (11) o (12), en el que α es un ADN, y β es un 2'-OMeARN;

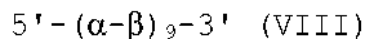
(14) El polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con una cualquiera de (10) a (13), en el que λ_t y u_u son, de manera idéntica o diferente, cualquiera de: ADN que tienen una base timina, una base adenina, o una base guanina; o 2'-OMeARN que tienen una base uracilo, una base adenina, o una base guanina;

50 (15) El polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (10) a (14), en el que t es 0, y u es 2;

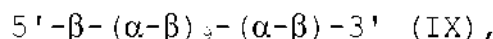
(16) El polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (11) a (14), en el que p y t son 0, s es 1, y u es 2;

(17) El polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con (11) a (14), en el que p y t son 0, s es 0 o 1, u es 2, y u₂ es un ADN o un 2'-OMeARN;

5 (18) El polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (9), en el que el polinucleótido con hebra en sentido directo consiste de un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (VIII), el polinucleótido con hebra en sentido contrario consiste de un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (IX), y el polinucleótido tiene además las siguientes características de (a) a (c):



10 y



(a) α es un ADN, y β es un 2'-OMeARN;

(b) $\beta - (\alpha - \beta)_9$ en el polinucleótido representado mediante la fórmula (IX) tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la del gen diana; y

15 (c) $(\alpha - \beta)_9$ en la fórmula (VIII) y $(\alpha - \beta)_9$ en la fórmula (IX) tienen secuencias de nucleótidos complementarias entre sí;

(19) El polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (10) a (18), en el que cualquiera o todos los restos 2'-OMeARN 1 a 4 están sustituidos por un ENA o una 2',4'-BNA/LNA;

20 (20) El polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (10) a (19), en el que cualquiera o todos los restos de ADN 1 a 4 están sustituidos por un ARN, un ENA o una 2',4'-BNA/LNA;

(21) El polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (20), en el que los nucleótidos están unidos entre sí mediante un enlace fosfodiéster o un enlace fosforotioato;

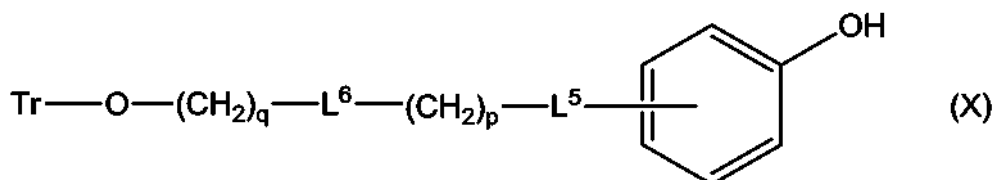
(22) Una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (1) to (21) como principio activo.

25 (23) La composición farmacéutica de acuerdo con (22), en la que la composición farmacéutica es para el tratamiento de una enfermedad derivada de la expresión génica;

(24) un polinucleótido o sal del mismo seleccionado de (1) a (21) para su uso en la inhibición de la expresión de un gen diana en un mamífero;

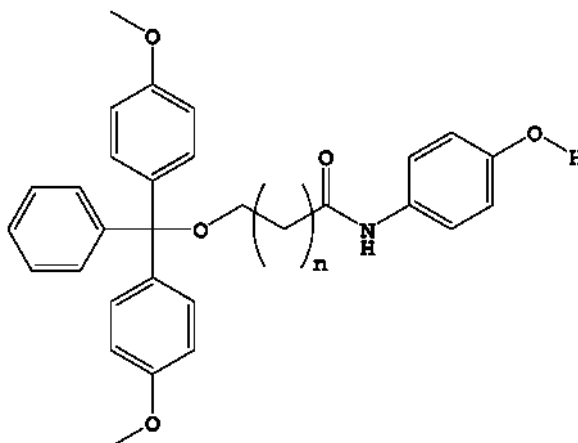
(25) Un compuesto representado por la fórmula (X) o una sal del mismo:

30 [Fórmula 3]

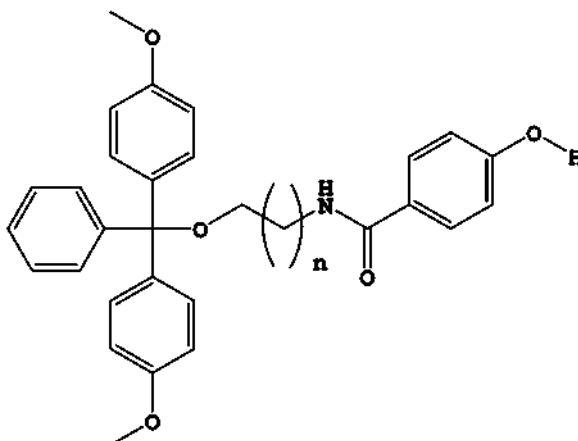


en la que Tr representa un grupo protector del grupo hidroxilo; p representa un número entero de 0 a 4; x representa un número entero de 4 a 10; L⁵ representa un enlace simple o -O-; L⁶ representa -(C=O)-NH- o -NH-(C=O)- partiendo del enlace con (CH₂)_p; y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición meta o para; y se caracteriza en que el compuesto no es

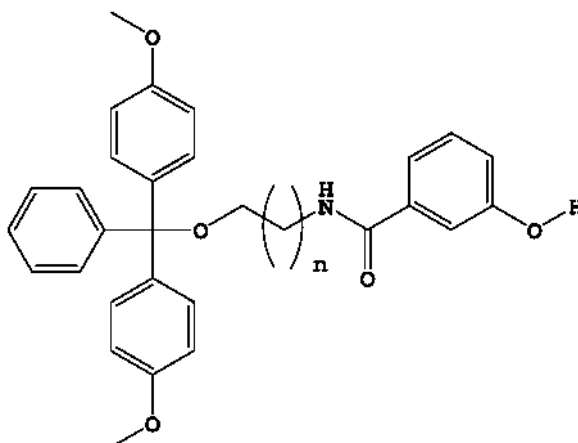
35



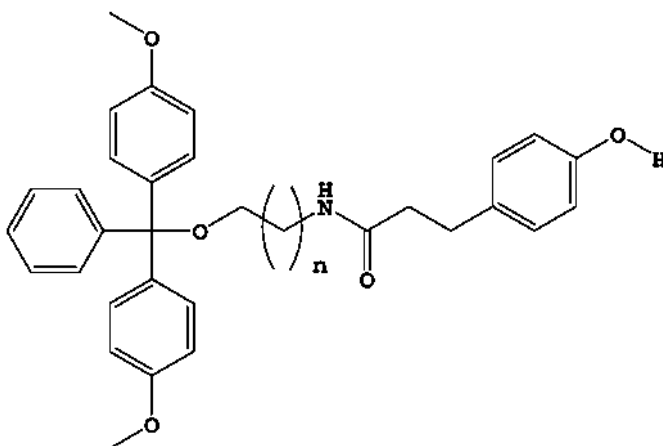
donde n es 4, 6 u 8;



donde n es 3, 5 o 7;



5 donde n es 3, 5 o 7; o



donde n es 3, 5 o 7.

10 (26) El compuesto o una sal del mismo de acuerdo con (25), en el que Tr es un grupo 4-metoxitritilo, un grupo 4,4'-dimetoxitritilo, un grupo pixilo, un grupo tritilo, un grupo levulinilo, o un grupo bis(trimetilsililoxi)(ciclohexiloxi)sililo;

(27) El compuesto o una sal del mismo de acuerdo con (25), en el que Tr es un grupo 4-metoxitritilo o un grupo 4,4'-dimetoxitritilo, la suma de p y q es un número entero de 4 o mayor, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para, preferentemente en el que la suma de p y q es un número entero de 8 o mayor;

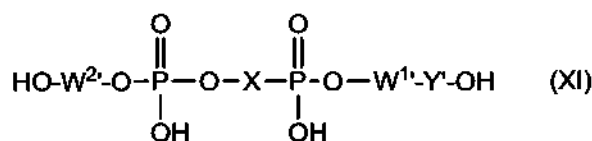
15 (28) El compuesto o una sal del mismo de acuerdo con (25), en el que Tr es un grupo 4-metoxitritilo o un grupo 4,4'-dimetoxitritilo, p es 0 o 2, q es un número entero de 6 o mayor, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y

L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para, preferentemente en el que q es 6 u 8;

(29) El compuesto o una sal del mismo de acuerdo con (25), en el que Tr es un grupo 4-metoxitritilo o un grupo 4,4'-dimetoxitritilo, p es 0 o 2, q es 8, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para, preferentemente en el que Tr es un grupo 4-metoxitritilo;

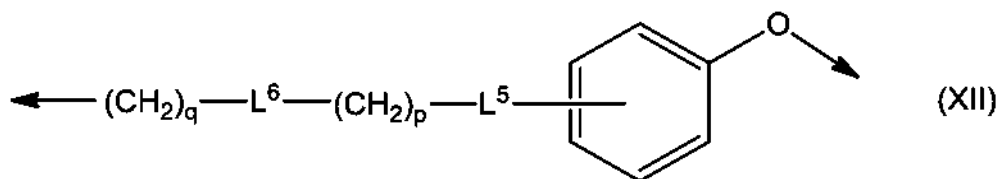
(30) Un procedimiento para producir un compuesto representado mediante la fórmula (XI), siendo el compuesto un polinucleótido que comprende un polinucleótido con una hebra de sentido directo que correspondiente a un gen diana, y un polinucleótido con una hebra de sentido contrario que tiene una secuencia de polinucleótidos complementaria de la del polinucleótido con hebra de sentido directo, en la que el extremo 5' del polinucleótido con hebra en sentido contrario y el extremo 3' del polinucleótido con hebra en sentido directo están unidos mediante X por enlaces fosfodiéster:

[Fórmula 4]



en la que W² representa un polinucleótido con hebra en sentido directo sin grupos hidroxilo en el extremo 5' y el extremo 3'; W¹-Y' representa un polinucleótido con hebra en sentido contrario sin grupos hidroxilo en el extremo 5' y el extremo 3'; y X representa la fórmula (XII):

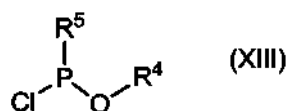
[Fórmula 5]



en la que p representa un número entero de 0 a 4; x representa un número entero de 4 a 10; L⁵ representa un enlace simple o -O-; L⁶ representa -(C=O)-NH- o -NH-(C=O)- partiendo del enlace con (CH₂)_p; L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición meta o para; a condición de que L⁵ sea -O-, entonces, p representa un número entero de 1 a 4; y el grupo metileno del extremo está unido al extremo 3' del polinucleótido con hebra en sentido directo para formar un enlace fosfodiéster; y el átomo de oxígeno unido al grupo fenilo está unido al extremo 5' del polinucleótido con hebra en sentido contrario para formar un enlace fosfodiéster, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

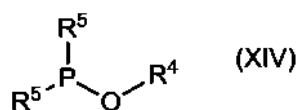
(i) hacer reaccionar el grupo hidroxilo de un compuesto representado por la fórmula Tr-O-X-H [en la que Tr representa un grupo protector del grupo hidroxilo, -(CH₂)_q- en X está unido a Tr-O- y el átomo de oxígeno unido al grupo fenilo está unido al hidrógeno] con un compuesto representada por la fórmula (XIII):

[Fórmula 6]



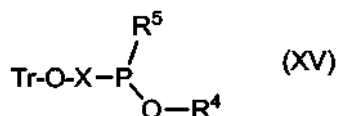
o la fórmula (XIV):

[Fórmula 7]



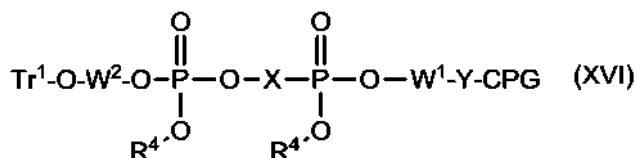
[en la que R⁴ representa un grupo a 2-cianoetilo, un grupo metilo, un grupo metanosulfonietilo, un grupo 2,2,2-tricloroetilo, o un grupo 4-clorofenilmetilo, y R⁵ representa un grupo morfolino, un grupo diisopropilamino, un grupo dietilamino, o un grupo dimetilamino] para producir un compuesto representado por la fórmula (XV):

[Fórmula 8]



(ii) hacer reaccionar el compuesto obtenido en la etapa (i) con un compuesto representado por la fórmula HO-W¹-Y-CPG [en la que W¹-Y representa un polinucleótido con hebra en sentido contrario protegido sin grupos hidroxilo en el extremo 5' y el extremo 3', y CPG representa un soporte polimérico que tiene un enlazador capaz de unirse al polinucleótido] según un procedimiento de fosforamidita y posteriormente producir un resto representado por la fórmula Tr¹-O-W²-O-P(=O)(OR⁴)-O-[en la que Tr¹ representa un grupo protector del grupo hidroxilo, y W² representa un polinucleótido con hebra en sentido directo protegido sin grupos hidroxilo en el extremo 5' y el extremo 3'] según un procedimiento de fosforamidita para producir un compuesto representado por la fórmula (XVI):

[Fórmula 9]



; y

(iii) escindir el compuesto obtenido en la etapa (ii) del CPG y eliminar el grupo protector;

(31) El procedimiento de acuerdo con (30), en el que Tr y Tr¹ son, de manera idéntica o diferente, un grupo 4-metoxitritilo, un grupo 4,4'-dimetoxitritilo, un grupo pixilo, un grupo tritilo, un grupo levulinilo, o un grupo bis(trimetilsililo)(ciclohexilo)sililo;

(32) El procedimiento de acuerdo con (30), en el que Tr y Tr¹ son, de manera idéntica o diferente, un grupo 4-metoxitritilo o un grupo 4,4'-dimetoxitritilo, la suma de p y q es un número entero de 4 o mayor, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para, preferentemente en el que la suma de p y q es un número entero de 8 o mayor;

(33) El procedimiento de acuerdo con (30), en el que Tr y Tr¹ son, de manera idéntica o diferente, un grupo 4-metoxitritilo o un grupo 4,4'-dimetoxitritilo, p es 0 o 2, q es un número entero de 6 o mayor, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para preferentemente en la que q es 6 u 8, más preferentemente en la que q es 8;

(34) El procedimiento de acuerdo con (30), en el que Tr y Tr¹ son, de manera idéntica o diferente, un grupo 4-metoxitritilo o un grupo 4,4'-dimetoxitritilo, p es 2, q es 8, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para, preferentemente en la que cada Tr y Tr¹ es un grupo 4,4'-dimetoxitritilo;

(35) El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de (30) a (34), en el que R⁴ es un grupo 2-cianoetilo, un grupo metilo, un grupo metanosulfoniletilo, un grupo 2,2,2-tricloroetilo, o un grupo 4-clorofenilmetilo, y R⁵ es un grupo morfolino, un grupo diisopropilamino, un grupo dietilamino, o un grupo dimetilamino, preferentemente en el que R⁴ es un grupo 2-cianoetilo o un grupo metilo, y R⁵ es un grupo morfolino o un grupo diisopropilamino;

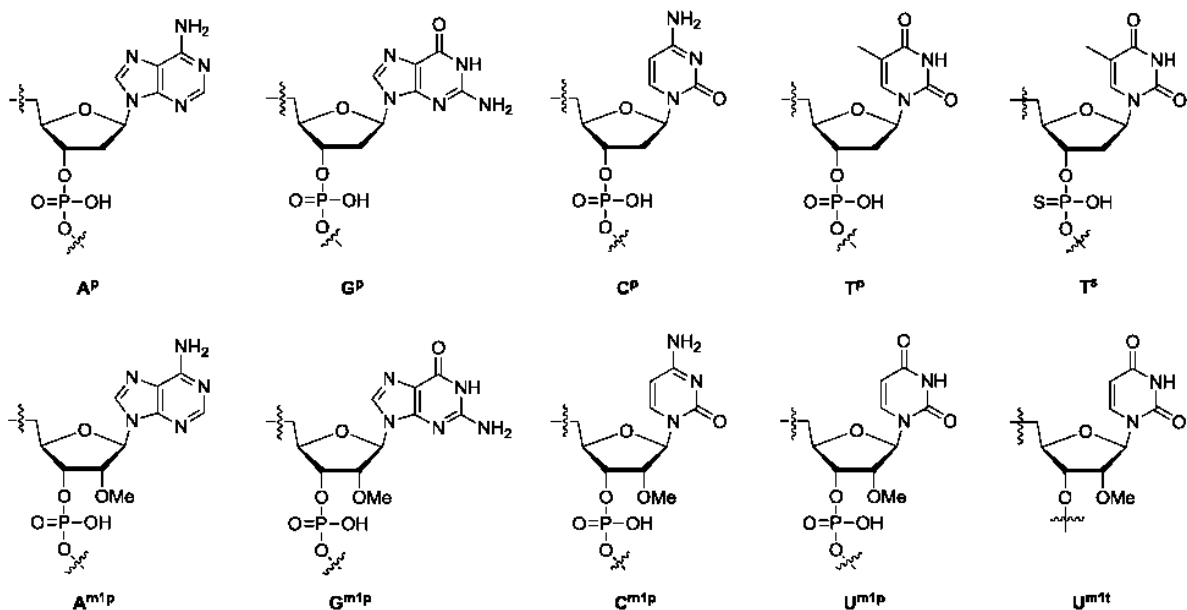
(36) El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de (30) a (34), en el que el compuesto representada por la fórmula (XIII) es cloro(morfolino)metoxifosdina, cloro(morfolino)cianoetoxifosdina, cloro(diisopropilamino)metoxifosdina, o cloro(diisopropilamino)cianoetoxifosdina;

(37) El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de (30) a (34), en el que el compuesto representado por la fórmula (XIV) es bis(diisopropilamino)cianoetoxifosdina;

(38) Un polinucleótido seleccionado entre los siguientes, o una sal del mismo: HO-C_p-G^{m1p}-A^p-G^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-G^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-T^p-A^{m1p}-X-P(=O)(OH)-O-U^{m1p}-T^p-A^{m1p}-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-C^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-C^p-U^{m1p}-C^p-G^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (HS-005), HO-C^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-T^p-G^{m1p}-G^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-C^p-U^{m1p}-A^p-U^{m1p}-X-P(=O)(OH)-O-U^{m1p}-A^p-U^{m1p}-A^p-G^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-C^{m1p}-C^p-A^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-C^p-U^{m1p}-A^p-U^{m1p}-X-P(=O)(OH)-O-U^{m1p}-T^p-A^{m1p}-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-C^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-C^p-U^{m1p}-C^p-G^{m1p}-T^s-U^{m1t}-H (HS-005s), o, HO-C^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-T^p-G^{m1p}-G^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-C^p-U^{m1p}-A^p-U^{m1p}-X-P(=O)(OH)-O-U^{m1p}-A^p-U^{m1p}-A^p-G^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-C^{m1p}-C^p-A^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-C^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^s-U^{m1t}-H (HS-006s)

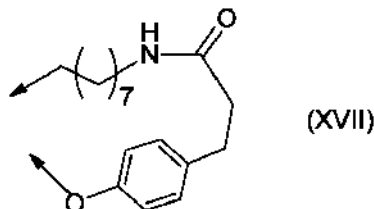
en los que cada uno de A^p, G^p, C^p, T^p, T^s, A^{m1p}, G^{m1p}, C^{m1p}, U^{m1p}, y U^{m1t} representa un nucleósido o un nucleótido que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 10]



la secuencia en dirección cadena arriba de X representa un polinucleótido con hebra en sentido directo correspondiente a un gen diana; la secuencia en dirección cadena abajo de X representa un polinucleótido que tiene un polinucleótido con hebra en sentido contrario que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria de la del polinucleótido con hebra en sentido directo; X representa un enlazador que tiene una estructura representada por la fórmula (XVII):

[Fórmula 11]



el grupo metileno del extremo está unido al extremo 3' del polinucleótido con hebra en sentido directo para formar un enlace fosfodiéster; y el átomo de oxígeno unido al grupo fenilo está unido al extremo 5' del polinucleótido con hebra en sentido contrario para formar un enlace fosfodiéster;

(39) Una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con (38) como principio activo;

(40) La composición farmacéutica de acuerdo con (39), en la que la composición farmacéutica está dirigida al tratamiento de una enfermedad derivada de la expresión del gen Hsp47, preferentemente fibrosis;

(41) Un polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con (38) para su uso en la inhibición de la expresión del gen Hsp47, en un mamífero;

(42) Un reactivo que comprende un polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (21) o (38).

Ventajas de la invención

La presente invención ha proporcionado un polinucleótido que tiene un efecto de interferencia de ARN y/o un efecto inhibidor de la expresión génica. La presente invención también ha proporcionado un polinucleótido que es resistente a al menos una enzima seleccionada entre ARNasa, fosfatasa, y exonucleasa, y tiene un efecto de interferencia de ARN y/o un efecto inhibidor de la expresión génica. La presente invención ha proporcionado además un polinucleótido que es resistente a ARNasa, fosfatasa, y exonucleasa, y tiene un efecto de interferencia de ARN y/o un efecto inhibidor de la expresión génica. La presente invención ha proporcionado además un polinucleótido que tiene un efecto de interferencia de ARN y/o un efecto inhibidor de la expresión génica sin la necesidad de la etapa de producir por separado un polinucleótido con hebra en sentido directo y un polinucleótido con hebra en sentido contrario y sin la necesidad del complicado procedimiento de mezclar con precisión estas hebras en las mismas cantidades para formar un dúplete. La presente invención permite el análisis funcional de varios genes usando el

polinucleótido, y proporciona una composición farmacéutica que comprende el polinucleótido.

La presente invención también ha proporcionado un compuesto intermedio sintético de utilidad para obtener el polinucleótido. La presente invención ha proporcionado además un procedimiento para producir el polinucleótido.

Breve descripción de los dibujos

- 5 [Figura 1] La Figura 1 es un diagrama que muestra el detalle de la etapa A-1.
 [Figure 2] La Figura 2 es un diagrama que muestra los detalles de los Procedimientos C y D.
 [Figure 3] La Figura 3 es un diagrama que muestra los detalles de los Procedimientos E y F.
 [Figura 4] La Figura 4 es un diagrama que muestra el detalle del Procedimiento G.
 10 [Figura 5] La Figura 5 es un diagrama que muestra las estructuras de los compuestos descritos en los Ejemplos de referencia 3 a 14, 17, y de 21 a 23.
 [Figura 6] La Figura 6 es un diagrama que muestra polinucleótidos correspondientes al gen de la β -catenina humana (a partir de ahora en el presente documento, los ejemplos de combinaciones de polinucleótidos como hebras de sentido directo y de sentido contrario se mostrará en cada diagrama; para los símbolos, el círculo relleno ($\bullet$) representa un ADN, y el círculo sin rellenar (O) representa un 2'-O-metil ARN. La línea entre el círculo relleno y el círculo sin rellenar representa un enlace fosfodiéster entre los nucleósidos. En el diagrama, p representa -P(=O)(OH)-. Cuando p está unido, un átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo final del polinucleótido se elimina. Cuando el extremo del polinucleótido no está unido, el extremo 3' o 5' del ADN o del 2'-O-metil ARN es un grupo OH. n representa el número de átomos de carbono. Lo mismo se aplica para las Figuras 7 y 11. La secuencia de nucleótidos de cada polinucleótido también se muestra en el diagrama.
 15 [Figura 7] La Figura 7 es un diagrama que muestra polinucleótidos correspondientes al gen de la β -catenina humana.
 [Figure 8] La Figura 8 es un diagrama que muestra las actividades de inhibición génica de los polinucleótidos analizados mediante PCR en tiempo real.
 [Figure 9] La Figura 9 es un diagrama que muestra las actividades de inhibición génica de los polinucleótidos analizados mediante PCR en tiempo real.
 25 [Figura 10] La Figura 10 es un diagrama que muestra las estructuras de los compuestos descritos en los Ejemplos de referencia 24 a 31.
 [Figura 11] La Figura 11 es un diagrama que muestra polinucleótidos correspondientes al gen de la β -catenina humana.
 30 [Figure 12] La Figura 12 es un diagrama que muestra las actividades de inhibición génica de los polinucleótidos analizados mediante PCR en tiempo real.
 [Figura 13] La Figura 13 es un diagrama que muestra polinucleótidos correspondientes al gen de la β -catenina humana. Para los símbolos, el cuadrado sin rellenar ($\square$) representa un ARN, el círculo relleno ($\bullet$) representa un ADN, y el círculo sin rellenar ($\circ$) representa un 2'-O-metil ARN. La línea entre los nucleósidos representa un enlace fosfodiéster. En el diagrama, p representa -P(=O)(OH)-. Cuando p está unido, un átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo final del polinucleótido se elimina. Cuando el extremo del polinucleótido no está unido, el extremo 3' o 5' del ARN, el ADN, o el 2'-O-metil ARN es un grupo OH. n representa el número de átomos de carbono. Lo mismo se aplica para las Figuras 15, 16, y 19. La secuencia de nucleótidos de cada polinucleótido también se muestra en el diagrama.
 35 [Figure 14] La Figura 14 es un diagrama que muestra las actividades de inhibición génica de los polinucleótidos analizados mediante PCR en tiempo real.
 [Figura 15] La Figura 15 es un diagrama que muestra polinucleótidos correspondientes al gen PKR de ratón.
 [Figura 16] La Figura 16 es un diagrama que muestra polinucleótidos correspondientes al gen Hsp47 humano. En el diagrama, s representa un enlace fosforotioato.
 45 [Figure 17] La Figura 17 es un diagrama que muestra las actividades de inhibición génica de los polinucleótidos analizados mediante PCR en tiempo real. La barra sin rellenar representa una concentración de polinucleótido de 0,1 nM. La barra rellena representa una concentración de polinucleótido de 1 nM. Lo mismo se aplica para las Figuras 18 y 20.
 [Figure 18] La Figura 18 es un diagrama que muestra las actividades de inhibición génica de los polinucleótidos analizados mediante PCR en tiempo real.
 50 [Figura 19] La Figura 19 es un diagrama que muestra polinucleótidos correspondientes al gen Hsp47 humano.
 [Figure 20] La Figura 20 es un diagrama que muestra las actividades de inhibición génica de los polinucleótidos analizados mediante PCR en tiempo real.

Descripción de las realizaciones

55 1. Descripción de términos

En la presente memoria descriptiva, el "gen diana" no está especialmente limitado a condición de que sea ARN de células, tejidos, o individuos, en el que o en los que esté gen se introduce (a partir de ahora en el presente documento, se pueden denominar como "receptores"). El gen diana puede ser ARNm que se traduce a una proteína o puede ser ARN no codificante que no se traduce a una proteína. Los ejemplos de ARN no codificante incluyen ARN funcional, por ejemplo, una región no traducida de ARNm, ARNt, ARNr, ARN no codificante análogo a ARN (ARNnc análogo a ARNm), ARN no codificante largo (ARNnc largo), ARN nuclear pequeño (ARNnp), ARN nucleolar

pequeño (ARNsno), y microARN (miARN). Específicamente, el gen diana puede ser endógeno para los receptores de la introducción, o puede ser exógeno e introducirse en el mismo mediante un enfoque tal como una transferencia génica. Puede también ser un gen presente en un cromosoma o en un gen extracromosómico. Los ejemplos del gen exógeno incluyen, aunque no de forma limitativa, los derivados de virus, bacterias, hongos, y protozoos, que puede infectar los receptores. La función del gen puede ser conocida o desconocida.

Los ejemplos de dicho gen diana puede incluir genes cuya expresión está específicamente aumentada y/o que estén específicamente mutados en pacientes que tengan una enfermedad en particular. Los ejemplos de enfermedades pueden incluir una enfermedad del sistema nervioso central (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, demencia, y trastornos de la alimentación), enfermedad inflamatoria (por ejemplo, alergia, reumatismo, artrosis y lupus eritematoso), enfermedad cardiovascular (por ejemplo, hipertensión, cardiomegalia, angina de pecho, arteriosclerosis, e hipercolesterolemia), cáncer (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de ovario, cáncer prostático, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello de útero, cáncer colorrectal, cáncer de colon, y cáncer rectal), enfermedad respiratoria (por ejemplo, neumonía, bronquitis, asma, y enfermedad pulmonar obstructiva crónica), diabetes mellitus, retinopatía diabética, nefropatía diabética, anemia (por ejemplo, anemia asociada con enfermedad crónica y anemia por deficiencia de hierro resistente al hierro), degeneración macular relacionada con la edad, enfermedad inmunitaria (por ejemplo, enfermedad de Crohn, dermatitis atópica, enfermedad autoinmunitaria, inmunodeficiencia, y leucemia), enfermedad del hígado/vesícula biliar (por ejemplo, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis hepática, hepatitis, insuficiencia hepática, colestasis, y cálculos), enfermedad gastrointestinal (por ejemplo, una úlcera, enteritis, e hipoabsorción), infección, adipositis, y fibrosis (fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, fibrosis renal, mielofibrosis, etc.). Los ejemplos de los genes causantes de estas enfermedades pueden incluir, aunque no de forma limitativa, proteína quinesina del huso (KSP), factor de crecimiento endotelial vascular, (VEGF), transtirretina (TTR), proproteína subtilisina convertasa/kexina tipo 9 (PCSK9), quinasa tipo polo (PLK), ApoB-100, subunidad M2 de la ribonucleótido reductasa (RRM2), clusterina, proteína de choque térmico 27 (Hsp27), survivina, factor de iniciación eucariota-4E (eIF-4E), molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), la subunidad alfa del receptor de interleucina 4 (IL-4R-alfa), Factor XI, Factor VII, N-ras, H-ras, K-ras, bcl-2, bcl-xL, Her-1, Her-2, Her-3, Her-4, MDR-1, gen de la β -catenina humana, polipéptido 3 de secuencia DDX3 (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp), unido a X), secuencia 1 del gen de la leucemia de células mieloides (MCL1), PKR (Eif2ak2), Hsp47 (Serpinh1), Hepcidina, proteína c activa (APC), transductor de la señal y activador de la transcripción (STAT3).

En la presente memoria descriptiva, el "nucleósido natural" se refiere a un 2'-desoxinucleósido tal como 2'-desoxiadenosina, 2'-desoxiguanosina, 2'-desoxiciditina, 2'-desoxi-5-metilcitidina, y timidina o un ribonucleósido tal como adenosina, guanosina, citidina, 5-metilcitidina, y uridina. Además, el "oligonucleótido" se refiere a un oligonucleótido constituido por un compuesto en el que el resto azúcar del nucleósido forma un éster con ácido fosfórico. En la presente memoria descriptiva, los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" se utilizan indistintamente.

En la presente memoria descriptiva, 2'-desoxiadenosina se puede denominar como A¹; 2'-desoxiguanosina se puede denominar como G¹; 2'-desoxiciditina se puede denominar como C¹; 2'-desoxi-5-metilcitidina se puede denominar como 5meC¹; timidina se puede denominar como T¹; 2'-desoxiuridina se puede denominar como U¹; adenosina se puede denominar como A^{rt}; guanosina se puede denominar como G^{rt}; citidina se puede denominar como C^{rt}; 5-metilcitidina se puede denominar como 5meC^{rt}; y uridina se puede denominar como U^{rt}. Además, en la presente memoria descriptiva, el nucleótido de 2'-desoxiadenosina se puede denominar como A^p; el nucleótido de 2'-desoxiguanosina se puede denominar como G^p; el nucleótido de 2'-desoxiciditina se puede denominar como C^p; el nucleótido de 2'-desoxi-5-metilcitidina se puede denominar como 5meC^p; un nucleótido de timidina se puede denominar como T^p; un nucleótido de 2'-desoxiuridina se puede denominar como U^p; nucleótido de adenosina se puede denominar como A^{rp}; nucleótido de guanosina se puede denominar como G^{rp}; nucleótido de citidina se puede denominar como C^{rp}; nucleótido de 5-metilcitidina se puede denominar como 5meC^{rp}; y un nucleótido de uracilo se puede denominar como U^{rp}.

En la presente memoria descriptiva, donde existe una forma de éster de fosforotioato en lugar de una forma de fosfoéster de un nucleótido, una contraparte de A^p se puede denominar como A^s; una contraparte de G^p se puede denominar como G^s; una contraparte de C^p se puede denominar como C^s; una contraparte de 5meC^p se puede denominar como 5meC^s; una contraparte de T^p se puede denominar como T^s; una contraparte de U^p se puede denominar como U^s; una contraparte de A^{rp} se puede denominar como A^{rs}; una contraparte de G^{rp} se puede denominar como G^{rs}; una contraparte de C^{rp} se puede denominar como C^{rs}; una contraparte de 5meC^{rp} se puede denominar como 5meC^{rs}; y una contraparte de U^{rp} se puede denominar como U^{rs}.

En la presente memoria descriptiva, la expresión "nucleósido modificado con azúcar" se refiere a un nucleósido cuyo resto azúcar se ha modificado.

En particular, los ejemplos de modificación 2'-O-metil incluyen 2'-O-metilnucleósido y 2'-O-metilnucleótido; una contraparte de A^{rt} se puede denominar como A^{m1t}; una contraparte de G^{rt} se puede denominar como G^{m1t}; una contraparte de C^{rt} se puede denominar como C^{m1t}; una contraparte de 5meC^{rt} se puede denominar como 5meC^{m1t}; una contraparte de U^{rt} se puede denominar como U^{m1t}; una contraparte de A^{rp} se puede denominar como A^{m1p}; una contraparte de G^{rp} se puede denominar como G^{m1p}; una contraparte de C^{rp} se puede denominar como C^{m1p}; una

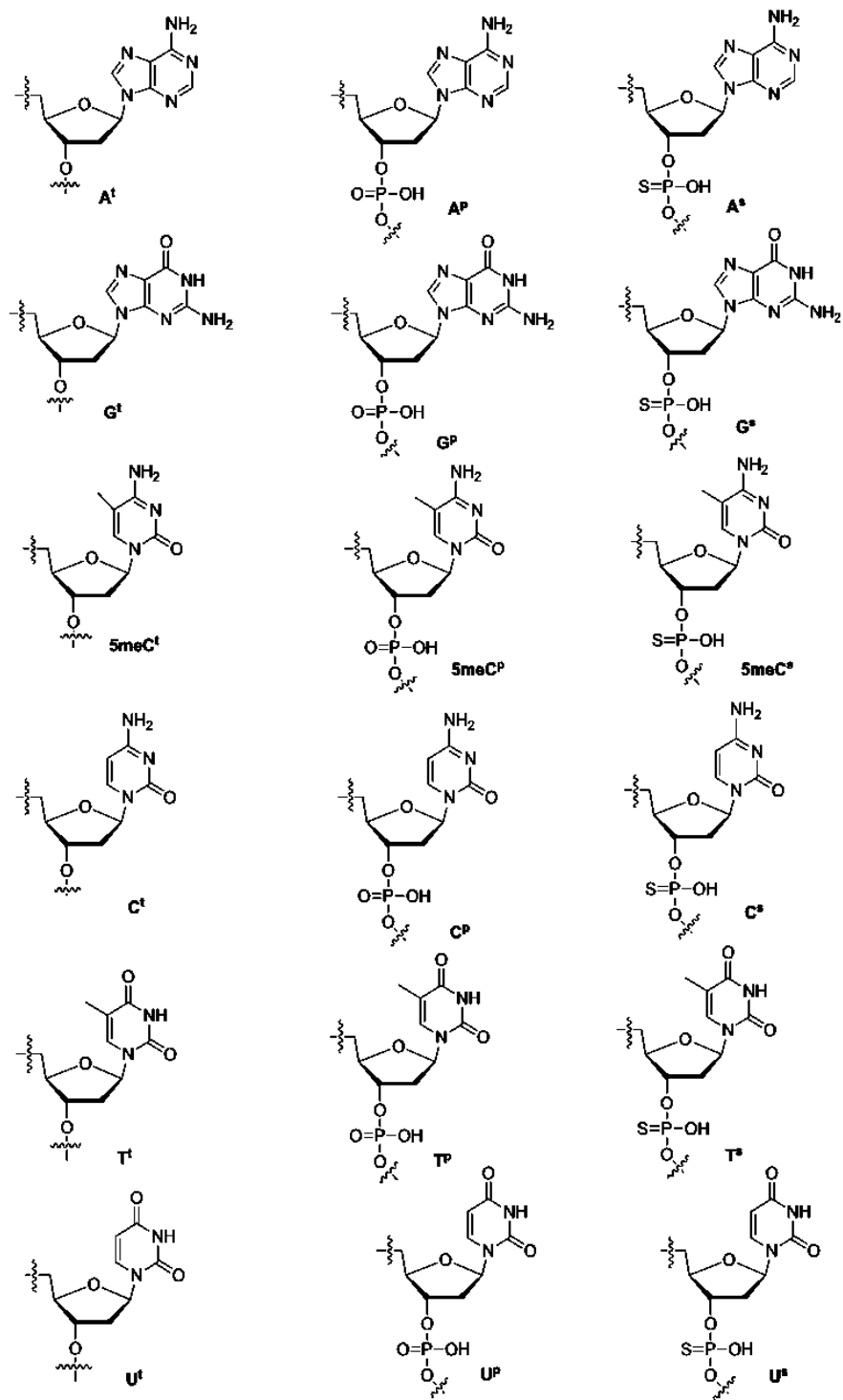
contraparte de 5meC^{rp} se puede denominar como 5meC^{m1p} ; una contraparte de U^{rp} se puede denominar como U^{m1p} ; una contraparte de A^{rs} se puede denominar como A^{m1s} ; una contraparte de G^{rs} se puede denominar como G^{m1s} ; una contraparte de C^{rs} se puede denominar como C^{m1s} ; una contraparte de 5meC^{s} se puede denominar como 5meC^{m1s} ; y una contraparte de U^{rs} se puede denominar como U^{m1s} .

- 5 En la presente memoria descriptiva, la unidad nucleótido de 2'-O,4'-C-etileno y la "unidad ENA" se refieren a aquellos nucleósidos que tienen una ENA, y también se refieren a los nucleósidos y nucleótidos que tienen una unidad ENA: una contraparte de A^{t} se puede denominar como A^{2t} ; una contraparte de A^{p} se puede denominar como A^{e2p} ; una contraparte de A^{s} se puede denominar como A^{e2s} ; una contraparte de G^{t} se puede denominar como G^{2t} ; una contraparte de G^{p} se puede denominar como G^{e2p} ; una contraparte de G^{s} se puede denominar como G^{e2s} ;
- 10 una contraparte de 5meC^{t} se puede denominar como C^{2t} ; una contraparte de 5meC^{p} se puede denominar como C^{e2p} ; una contraparte de 5meC^{s} se puede denominar como C^{e2s} ; una contraparte de T^{t} se puede denominar como T^{2t} ; una contraparte de T^{p} se puede denominar como T^{e2p} ; y una contraparte de T^{s} se puede denominar como T^{e2s} .

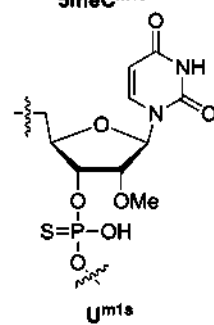
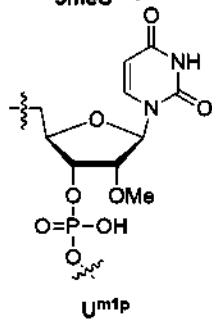
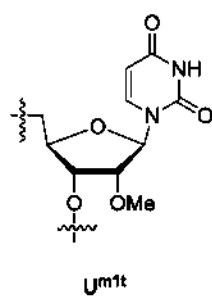
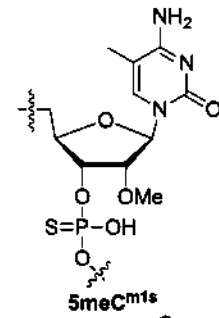
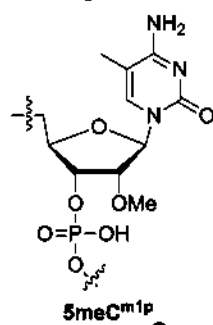
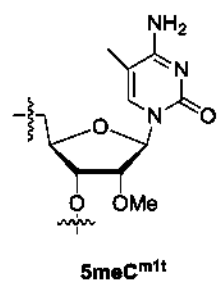
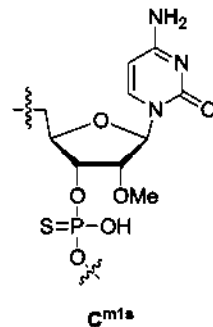
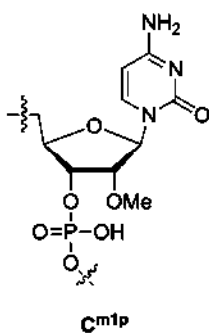
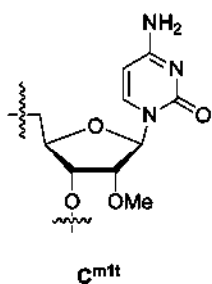
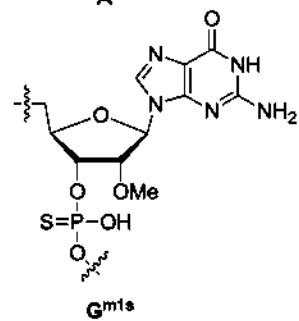
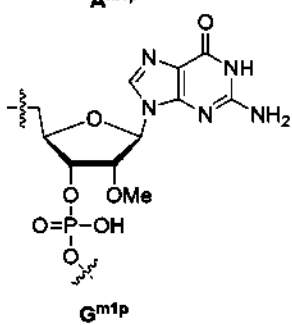
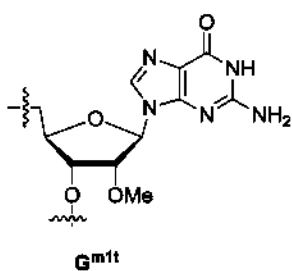
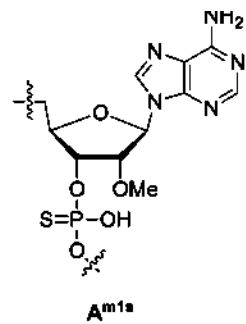
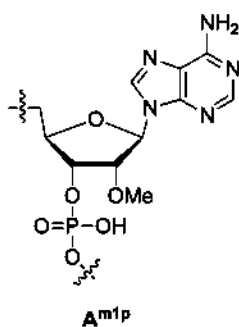
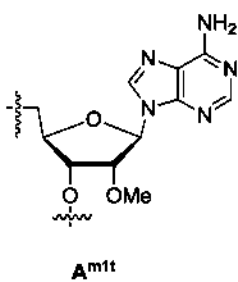
- En la presente memoria descriptiva, la unidad de nucleótido de 2'-O,4'-C-metileno y la "unidad 2',4'-BNA/LNA" se refieren a aquellos nucleósidos y nucleótidos que tienen un 2',4'-BNA/LNA y también se refieren a nucleósidos y nucleótidos que tienen una unidad 2',4'-BNA/LNA: una contraparte de A^{t} se puede denominar como A^{1t} ; una contraparte de A^{p} se puede denominar como A^{e1p} ; una contraparte de A^{s} se puede denominar como A^{e1s} ; una contraparte de G^{t} se puede denominar como G^{1t} ; una contraparte de G^{p} se puede denominar como G^{e1p} ; una contraparte de G^{s} se puede denominar como G^{e1s} ; una contraparte de 5meC^{t} se puede denominar como C^{1t} ; una contraparte de 5meC^{p} se puede denominar como C^{e1p} ; una contraparte de 5meC^{s} se puede denominar como C^{e1s} ;
- 15 una contraparte de T^{t} se puede denominar como T^{1t} ; una contraparte de T^{p} se puede denominar como T^{e1p} ; y una contraparte de T^{s} se puede denominar como T^{e1s} .
- 20

A partir de ahora en el presente documento, se muestra la fórmula estructural de cada nucleótido.

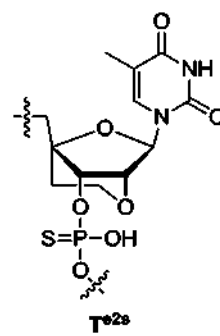
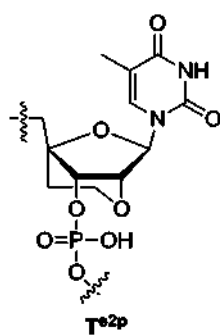
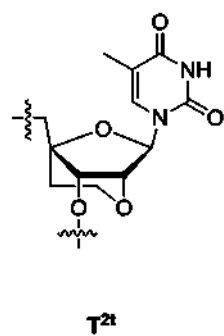
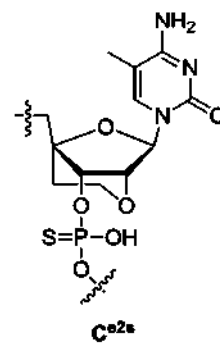
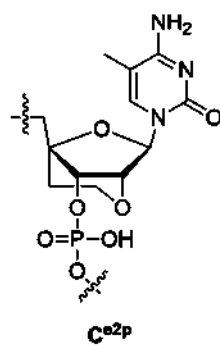
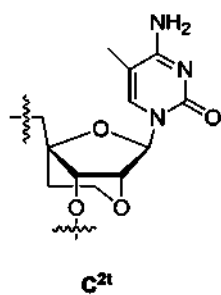
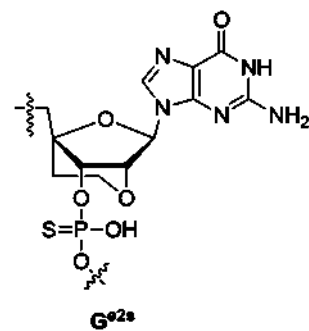
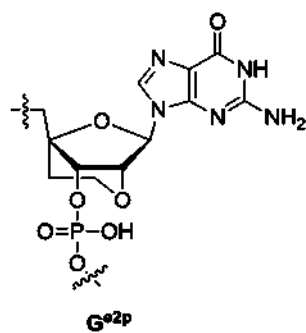
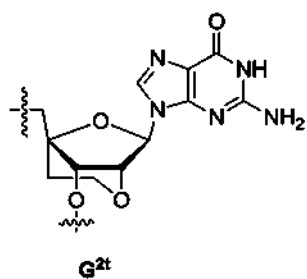
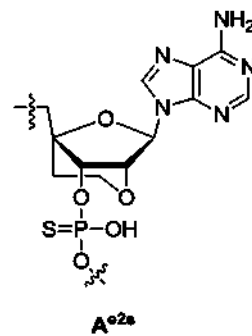
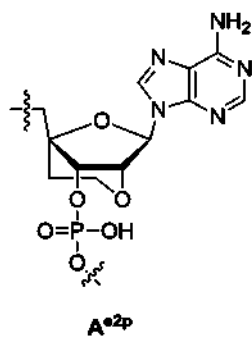
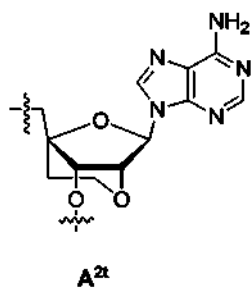
[Fórmula 12]



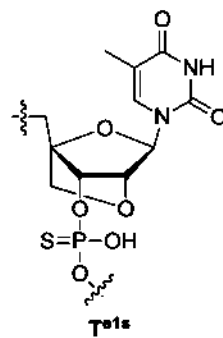
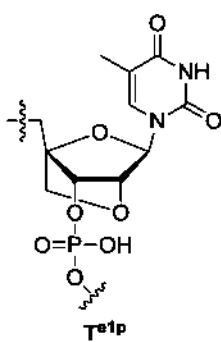
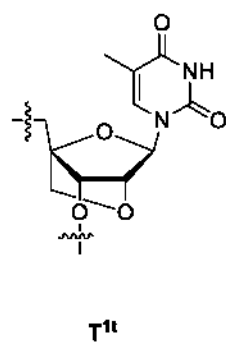
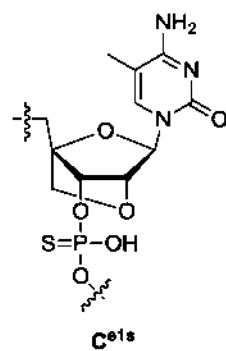
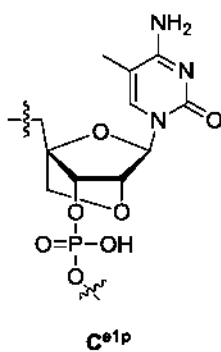
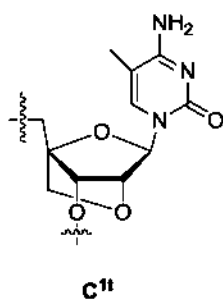
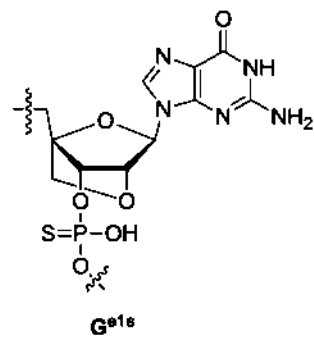
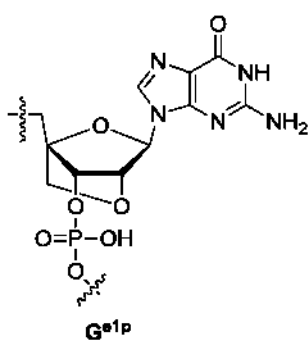
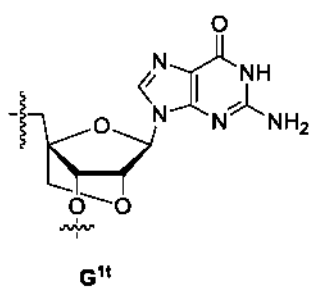
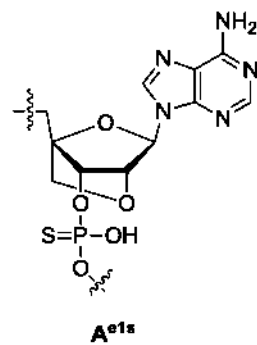
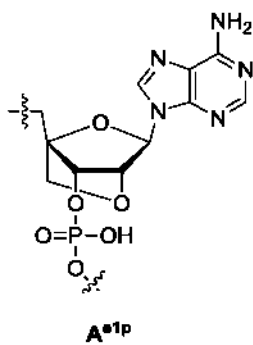
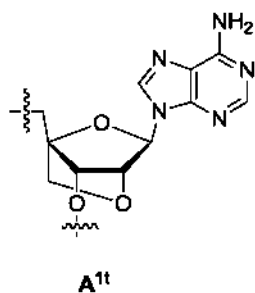
[Fórmula 13]



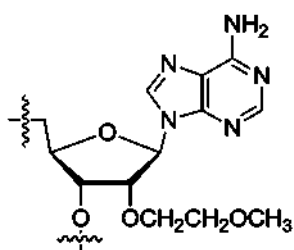
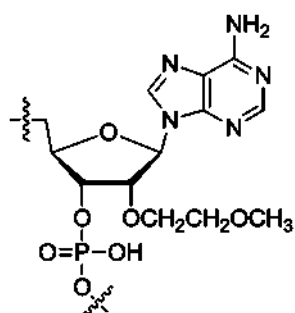
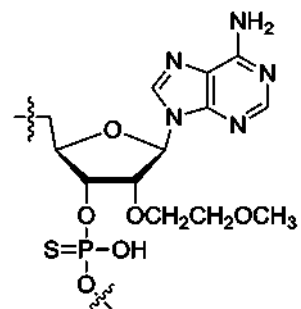
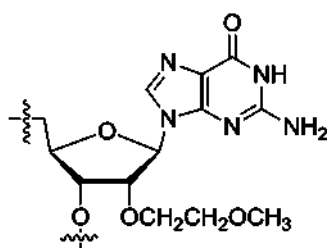
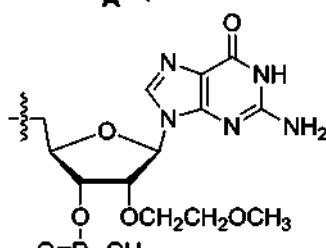
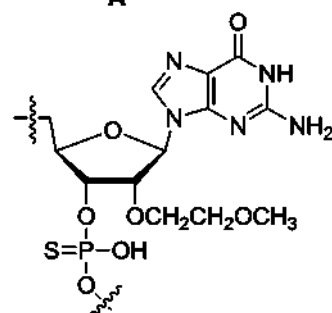
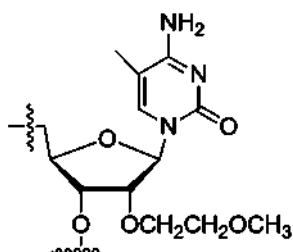
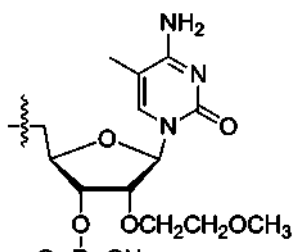
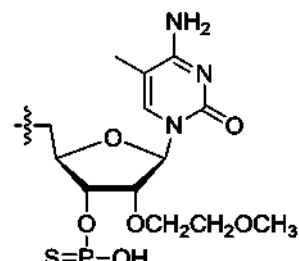
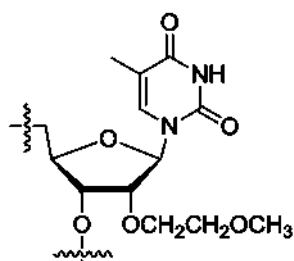
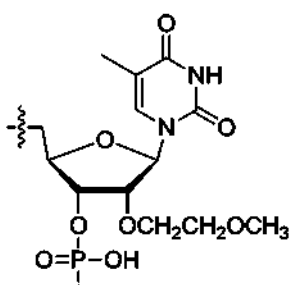
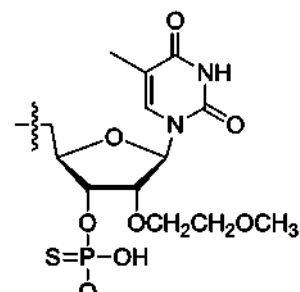
[Fórmula 14]



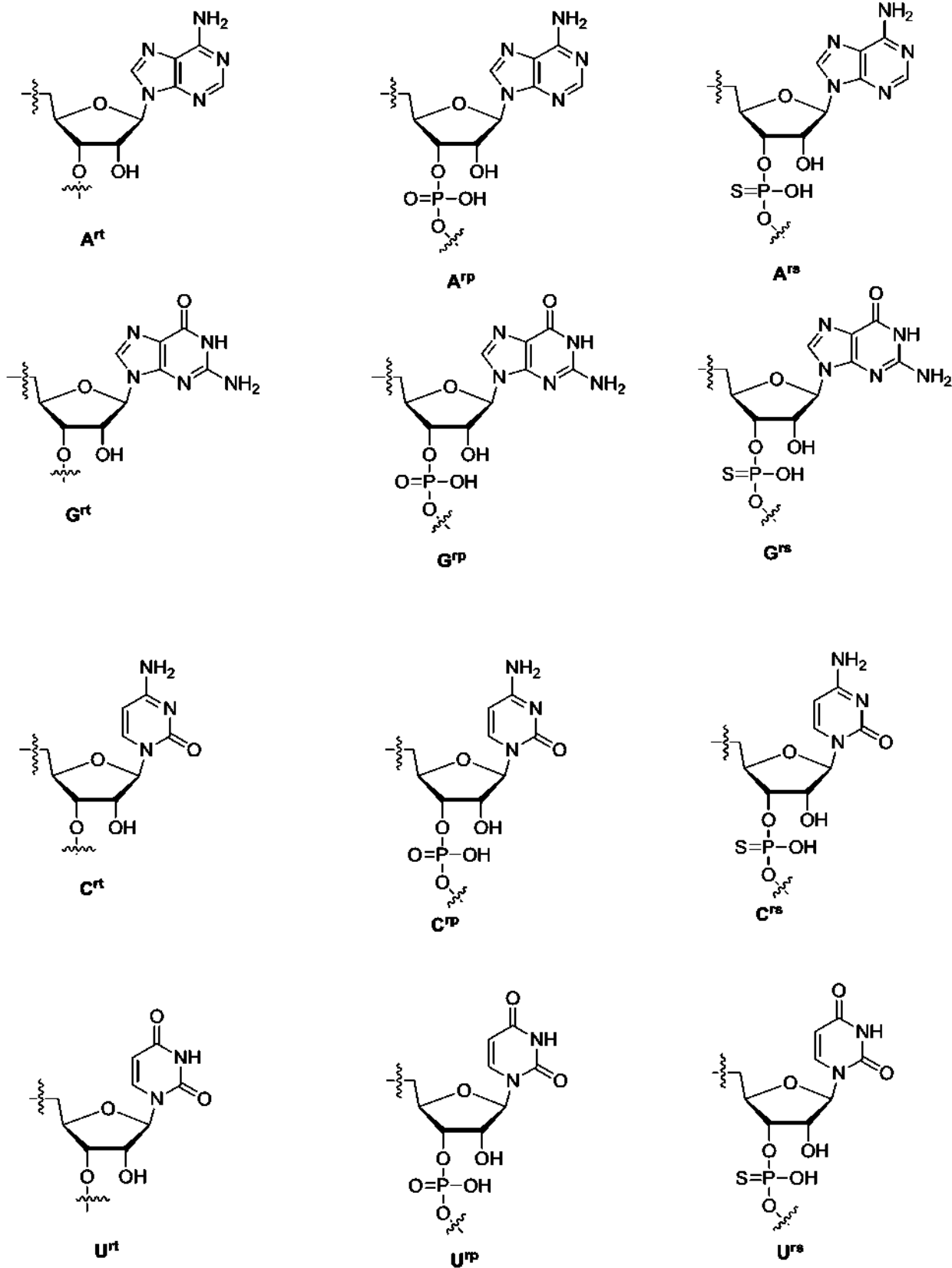
[Fórmula 15]



[Fórmula 16]

**A^{m2t}****A^{m2p}****A^{m2s}****G^{m2t}****G^{m2p}****G^{m2s}****5meC^{m2t}****5meC^{m2p}****5meC^{m2s}****T^{m2t}****T^{m2p}****T^{m2s}**

[Fórmula 17]

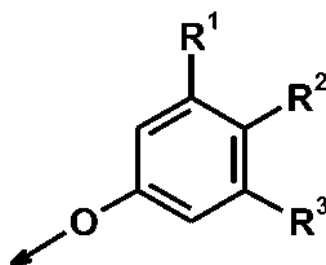


En la presente memoria descriptiva, una característica del polinucleótido o una sal del mismo es que el polinucleótido se deriva de un polinucleótido bicatenario que comprende una hebra de sentido directo correspondiente a un gen diana, y un polinucleótido con hebra de sentido contrario que tiene una secuencia de

nucleótidos complementaria del polinucleótido con hebra de sentido directo, y tiene una estructura monocatenaria en la que el extremo 5' de la hebra de sentido contrario y el extremo 3' de la hebra de sentido directo están unidas mediante un enlazador estructuralmente definido mediante una fórmula estructural mostrada a continuación para formar una estructura fosfodiéster en cada uno de estos extremos. Específicamente, el polinucleótido tiene la siguiente estructura: polinucleótido-3'-P(=O)(OH)-[enlazador]-P(=O)(OH)-5'-polinucleótido en el que "polinucleótido-3'" representa la estructura del polinucleótido sin un átomo hidrógeno en su grupo hidroxilo del extremo 3', y "5'-polinucleótido" representa la estructura del polinucleótido sin un átomo hidrógeno en su grupo hidroxilo del extremo 5'.

Este enlazador contiene un grupo fenilo. El enlazador se une, en un resto de átomo de oxígeno (que se refiere a un átomo de oxígeno definido mediante la fórmula estructural mostrada en la Fórmula 18 siguiente) unido al grupo fenilo, con el extremo 5' de la hebra de sentido contrario para formar un enlace fosfodiéster en este extremo 5'. Este grupo fenilo tiene además R¹, R², y R³, uno de los cuales sirve como sitio de unión al extremo 3' de la hebra de sentido directo para formar un enlace fosfodiéster en este extremo 3'. Incluso si R¹, R², y R³ están unidos al grupo fenilo mediante átomos de oxígeno, estos átomos de oxígeno no sirven como sitios de unión al extremo 5' de la hebra de sentido contrario. La estructura de este enlazador es la siguiente:

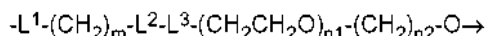
[Fórmula 18]



en la que

el átomo de oxígeno mostrado unido al grupo fenilo está unido al extremo 5' de la hebra de sentido contrario para formar una estructura fosfodiéster;

uno cualquiera de R¹, R², y R³ representa una estructura representada mediante la siguiente fórmula:



en la que

m representa un número entero de 0 a 4,

n₁ representa un número entero de 0 a 4,

n₂ representa 0 o un número entero de 2 a 10,

L¹ representa un enlace simple o -O-,

L² representa un enlace simple o -CH(-NH-L⁴-R)-,

L³ representa un enlace simple, -(C=O)-NH-, o -NH-(C=O)-,

a condición de que L³ no sea un enlace simple, entonces n₂ representa un número entero de 2 a 10,

a condición de que se cada L¹ y L² sean un enlace simple, m es 1, y cada uno de n₁ y n₂ es 0, entonces L³-O→

representa -CH(COOH)NH-(resto de aminoácido)_j-Ser,

-CH(COOH)NH-(resto de aminoácido)_j-Thr,

-CH(NH₂)CO-(resto de aminoácido)_j-Ser, o

-CH(NH₂)CO-(resto de aminoácido)_j-Thr, en la que

el resto grupo hidroxilo de esta serina o treonina está unido al grupo fosfato del extremo 3' del polinucleótido con hebra en sentido directo para formar una estructura fosfodiéster, j representa un número entero de 0 a 2,

L⁴ representa un enlace simple, -(C=O)-(CH₂)_k-NH-, o -(C=O)-(CH₂)_k-

k representa un número entero de 1 a 6, y

R representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, un grupo hidrocarbonilo que tiene de 2 a 30 átomos de carbono, o un grupo hidrocarburo-oxicarbonilo saturado o insaturado que tiene de 2 a 30 átomos de carbono; y

los dos restantes de R¹, R², y R³ representan, cada uno de ellos independientemente, un grupo seleccionado entre el grupo que consiste en un átomo de hidrógeno,

un grupo alquilo que tiene de 1 a 8 átomos de carbono que puede tener un sustituyente,

un grupo alcoxi que tiene de 1 a 8 átomos de carbono que puede tener un sustituyente,

un átomo de halógeno,

un grupo alquilcarbonilamino que tiene un grupo alquilo que tiene de 1 a 9 átomos de carbono, y

un grupo alquilcarbonilo que contiene un grupo alquilo que tiene de 1 a 8 átomos de carbono que puede tener un sustituyente.

El grupo fenilo incluido en el enlazador tiene R¹, R², y R³, uno de los cuales tiene una función de conector y sirve

como sitio de unión al extremo 3' de la hebra de sentido directo. El rasgo estructural de este resto es formar una estructura fosfodiéster. Los dos restos que quedan son simples sustituyentes, sin la función enlazadora, en el grupo fenilo.

Un resto diferente al resto de grupo fenilo en la estructura que tiene la función enlazadora, es decir, $-L^1-(CH_2)_m-L^2-L^3-(CH_2CH_2O)_{n1}-(CH_2)_{n2}-O\rightarrow$, se describe más adelante.

L^1 es un enlace simple o un átomo de oxígeno divalente $-O-$.

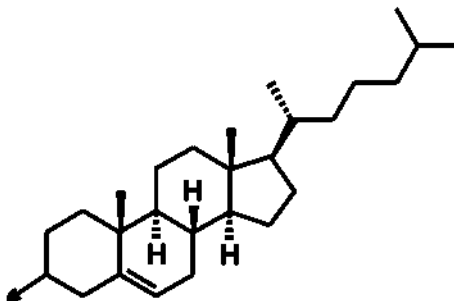
L^2 es un enlace simple o una estructura que tiene un grupo amino que puede tener un sustituyente en el átomo de carbono del metileno. Este grupo amino tiene un sustituyente R mediante una estructura enlazadora L^4 .

L^4 es un enlace simple, un grupo metileno, un grupo polimetileno que tiene de 2 a 4 átomos de carbono, o una estructura $-(C=O)-CH_2-CH_2-(C=O)-O-$. Un grupo carbonilo en la estructura $-(C=O)-CH_2-CH_2-(C=O)-O-$ está unido al grupo amino del extremo izquierdo de la fórmula estructural para conformar una estructura $-NH-(C=O)-CH_2-CH_2-(C=O)-O-$.

Cuando R' es un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, este grupo alquilo puede ser lineal o ramificado. Los ejemplos del mismo pueden incluir un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo, un grupo isopropilo, un grupo butilo, un grupo isobutilo, un grupo butilo secundario, un grupo pentilo, y un grupo hexilo.

Cuando R es un grupo hidrocarburo-carbonilo saturado o insaturado que tiene de 2 a 30 átomos de carbono (grupo hidrocarburo- $(C=O)-$) o es un grupo hidrocarburo-oxicarbonilo saturado o insaturado que tiene de 2 a 30 átomos de carbono (grupo hidrocarburo $-O-(C=O)-$), estos restos de grupo hidrocarburo pueden ser lineales o ramificados. También, el grupo hidrocarburo puede estar saturado o insaturado. Los ejemplos de dicho grupo de hidrocarburo pueden incluir un grupo derivado de hidrocarburo alifático. Los ejemplos del grupo hidrocarburo pueden incluir un grupo alquilo que tiene hasta 30 átomos de carbono. Además, Se pueden usar alcanos que están insaturados mediante un doble enlace carbono-carbono en este grupo alquilo. Como alternativa, este resto de grupo hidrocarburo puede contener un enlace insaturado para formar una estructura de anillo condensado. Los ejemplos de dicho grupo hidrocarburo cíclico pueden incluir un grupo colesterilo.

[Fórmula 19]



L^3 es un enlace simple o una estructura $-(C=O)-NH-$ o $-NH-(C=O)-$. L^3 está unido en su extremo izquierdo a L^2 y, en algunos casos, puede estar unido directamente al grupo fenilo mostrado en la Fórmula 8. Cuando L^3 no es un enlace simple, es decir, cuando L^3 es $-(C=O)-NH-$ o $-NH-(C=O)-$, la estructura unida al anterior que se muestra a continuación contiene inevitablemente un grupo metileno o un grupo polimetileno. Esto significa que $n2$ no es 0 en este caso.

L^3 está unido por su extremo derecho a la estructura $-(CH_2CH_2O)_{n1}-(CH_2)_{n2}-O\rightarrow$. L^3 puede estar unido a una estructura de dimetilenoxi ($n1 = 1$) o 2 a 4 repeticiones de esta unidad ($n1 = 2$ to 4). En algunos casos, esta estructura de dimetilenoxi puede estar ausente. Son preferibles 2 o 3 repeticiones de la estructura de dimetilenoxi. En otras palabras, $n1$ es preferentemente 2 o 3. Dos estructuras de dimetilenoxi, es decir, $n1$ es 2, son más preferibles.

Esta estructura de dimetilenoxi está unida por su lado derecho con un grupo metileno o un grupo polimetileno(hasta decametileno). Este grupo metileno o grupo polimetileno puede estar ausente. El grupo metileno o grupo polimetileno es preferentemente un grupo polimetileno. Cuando el grupo polimetileno está presente, su longitud de cadena está preferentemente comprendida de 2 a 10 átomos de carbono. Una cadena de polimetileno más larga es más preferible. Una cadena de polimetileno que tiene 5 o más átomos de carbono es preferible. Una cadena de polimetileno que tiene 7 o más átomos de carbono es más preferible.

La estructura de dimetilenoxi y el grupo metileno o grupo polimetileno pueden coexistir entre sí. En este caso, la longitud de cadena puede ser aproximadamente de 2 a 10 átomos.

Cuando cada L^1 y L^2 es un enlace simple, m es 1, y cada uno de n_1 y n_2 es 0, el resto $-L^1-(CH_2)_m-L^2-L^3-(CH_2CH_2O)_{n_1}-(CH_2)_{n_2}-O\rightarrow$ es $L^3-O\rightarrow$. Este $L^3-O\rightarrow$ representa una de las estructuras $-CH(COOH)NH-(\text{resto de aminoácido})_j\text{-Ser}$, $-CH(COOH)NH-(\text{resto de aminoácido})_j\text{-Thr}$, $-CH(NH_2)CO-(\text{resto de aminoácido})_j\text{-Ser}$, y $-CH(NH_2)CO-(\text{resto de aminoácido})_j\text{-Thr}$.

- 5 Cada una de estas estructuras forma un polipéptido. Este polipéptido puede tener tirosina en un extremo y un aminoácido que contiene un grupo hidroxilo en el otro extremo. El grupo fenilo de este resto tirosina sirve como sitio de unión con la estructura de fosfodiéster en el extremo 5', mientras que el resto de grupo hidroxilo del aminoácido en el otro extremo sirve como sitio de unión con la estructura de fosfodiéster del extremo 3'. El aminoácido unido al extremo 3' puede ser cualquier aminoácido que contiene un grupo hidroxilo y puede ser serina o treonina. El grupo amino de esta serina o treonina puede estar sustituido por un grupo acilo. Este grupo acilo puede ser un grupo fenilcarbonilo o un grupo alquilcarbonilo. El grupo fenilo del grupo fenilcarbonilo puede estar sustituido por un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, un grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, un átomo de halógeno, o similar. El grupo alquilo del grupo alquilcarbonilo puede ser un grupo alquilo que tenga de 1 a 6 átomos de carbono que sean lineales o ramificados. Este grupo alquilo puede estar adicionalmente sustituido por un grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, un átomo de halógeno, o similar. De estos grupos acilo, un grupo alquilcarbonilo es preferible, y un grupo acetilo es especialmente preferible.

Por ejemplo, la estructura $\leftarrow O\text{-Ph-CH(COOH)NH-(resto de aminoácido)}_j\text{-Ser}$ es una estructura en la que el grupo amino de la tirosina está unido a serina o a un polipéptido que tiene una serina en el extremo. Esta estructura peptídica se puede unir por la misma al extremo carboxi de la tirosina para formar un polipéptido, como en $\leftarrow O\text{-Ph-CH(NH}_2\text{)CO-(resto de aminoácido)}_j\text{-Ser}$.

Los aminoácidos que constituyen el polipéptido pueden estar en forma L, D, o DL.

- El polipéptido puede ser cualquiera de un dipéptido hasta un tetrapéptido. El aminoácido unido a tirosina y serina o treonina no está especialmente limitado, y puede ser cualquier aminoácido seleccionado entre glicina, alanina, β -alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano, prolina, histidina, arginina, lisina, cisteína, glutamina, asparagina, serina, treonina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutámico, y similares. El aminoácido es preferentemente glicina, alanina, o β -alanina. El diaminoácido unido a tirosina y serina o treonina no está especialmente limitado, y puede ser cualquier diaminoácido compuesto por los aminoácidos descritos anteriormente. Los aminoácidos son preferentemente glicina-glicina, glicina-alanina, glicina- β -alanina, alanina-glicina, alanina-alanina, alanina- β -alanina, β -alanina-glicina, β -alanina-alanina, o β -alanina- β -alanina.

- Uno cualquiera de R^1 , R^2 , y R^3 presente en el grupo fenilo que constituye el enlazador sirve como función enlazadora con la estructura representada por $-L^1-(CH_2)_m-L^2-L^3-(CH_2CH_2O)_{n_1}-(CH_2)_{n_2}-O\rightarrow$. Los dos restantes de R^1 , R^2 , y R^3 son sustituyentes del grupo fenilo. Cada uno de dichos sustituyentes puede ser, independientemente, un grupo seleccionado entre el grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo que tiene de 1 a 8 átomos de carbono que puede tener un sustituyente, un grupo alcoxi que tiene de 1 a 8 átomos de carbono que puede tener un sustituyente, un átomo de halógeno, un grupo alquilcarbonilamino que tiene un grupo alquilo que tiene de 1 a 9 átomos de carbono, y un grupo alquilcarbonilo que contiene un grupo alquilo que tiene de 1 a 8 átomos de carbono que puede tener un sustituyente.

- Cuando dos de R^1 , R^2 , y R^3 son cada uno independientemente un grupo alquilo que tiene de 1 a 8 átomos de carbono y que tiene opcionalmente un sustituyente, el grupo alquilo puede ser lineal o ramificado. Los ejemplos del mismo pueden incluir un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo, un grupo isopropilo, un grupo butilo, un grupo isobutilo, un grupo butilo secundario, un grupo pentilo, un grupo hexilo, un grupo heptilo, y un grupo octilo. Cuando el grupo alquilo tiene un sustituyente, el grupo alquilo puede tener, como el sustituyente, 1 o 2 o más grupos seleccionados entre el grupo de sustituyentes que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo amino, un átomo de halógeno, un grupo alquiltio que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, un grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, un grupo carboxi, y un grupo alcoxycarbonilo que contiene un grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. El 1 o más sustituyentes pueden ser iguales o diferentes. Cuando un grupo hidroxilo o un grupo amino se usa como el sustituyente del grupo alquilo, es más preferido que el grupo alquilo deba sustituirse por este grupo en el átomo de carbono del extremo del mismo. El grupo alquilo que tiene un grupo hidroxilo es preferentemente un grupo hidroximetilo, un grupo 2-hidroxietilo, un grupo 2-hidroxipropilo, o un grupo 3-hidroxipropilo. Cuando se usa un átomo de halógeno como el sustituyente del grupo alquilo, el grupo alquilo puede ser cualesquiera grupos alquilo lineales o ramificados que tienen de 1 a 6 átomos de carbono y es más preferido un grupo metilo o un grupo etilo, especialmente preferentemente un grupo metilo, que tiene un átomo de halógeno. Cuando se usa un átomo de halógeno como el sustituyente del grupo alquilo, el átomo de halógeno es preferentemente un átomo de flúor. El uno o más átomos de flúor puede ser una monosustitución o una sustitución con perfluoruro. Los ejemplos de dicho grupo alquilo pueden incluir un grupo monofluorometilo, un grupo difluorometilo, un grupo trifluorometilo, y un grupo 2,2,2-trifluoroetilo. Un grupo monofluorometilo, un grupo difluorometilo y un grupo trifluorometilo, son preferibles. El grupo alquilo del grupo alquiltio que tiene de 1 a 6 átomos de carbono y el grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono puede ser lineal o ramificado, y sus ejemplos incluyen un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo, un grupo isopropilo, un grupo butilo, un grupo isobutilo, y un grupo isobutilo secundario. Cuando un grupo carboxi o un grupo alcoxycarbonilo que contiene un grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono se utiliza como el sustituyente del grupo alquilo, es más preferido que el grupo alquilo deba sustituirse por este grupo en el átomo de

carbono del extremo del mismo. El grupo alquilo del grupo alcóxicarbonilo que contiene un grupo alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono puede ser lineal o ramificado, y sus ejemplos pueden incluir un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo, un grupo isopropilo, un grupo butilo, un grupo isobutilo, y un grupo isobutilo secundario.

- 5 Cuando dos de R^1 , R^2 , y R^3 con cada uno independientemente un grupo alcoxi que tiene de 1 a 8 átomos de carbono, y que tiene opcionalmente un sustituyente, este grupo alcoxi puede ser cualquier grupo alcoxi compuesto del grupo alquilo anteriormente mostrado y un átomo de oxígeno.

Cuando dos de R^1 , R^2 , y R^3 son cada uno independientemente un átomo de halógeno, este átomo de halógeno puede ser un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo o un átomo de yodo. De estos, es preferible un átomo de cloro o un átomo de flúor. Es más preferible un átomo de flúor.

- 10 Cuando dos de R^1 , R^2 , y R^3 son cada uno independientemente un grupo alquilcarbonilo (grupo acilo alifático) que contiene un grupo alquilo que tiene de 1 a 9 átomos de carbono que pueden tener un sustituyente, este resto alquilo puede ser un grupo alquilo que tiene hasta 9 átomos de carbono, que incluye el grupo alquilo que tiene de 1 a 8 átomos de carbono como se ha mostrado anteriormente. El grupo alquilcarbonilo puede estar formado por dicho grupo alquilo y un grupo carbonilo. El grupo alquilcarbonilo es preferentemente un grupo acetilo.

- 15 R^1 , R^2 , y R^3 son preferentemente un átomo de hidrógeno para cada uno de R^1 y R^3 y una estructura enlazadora representada por $-L^1-(CH_2)_m-L^2-L^3-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_{n2}-O-$ para R^2 .

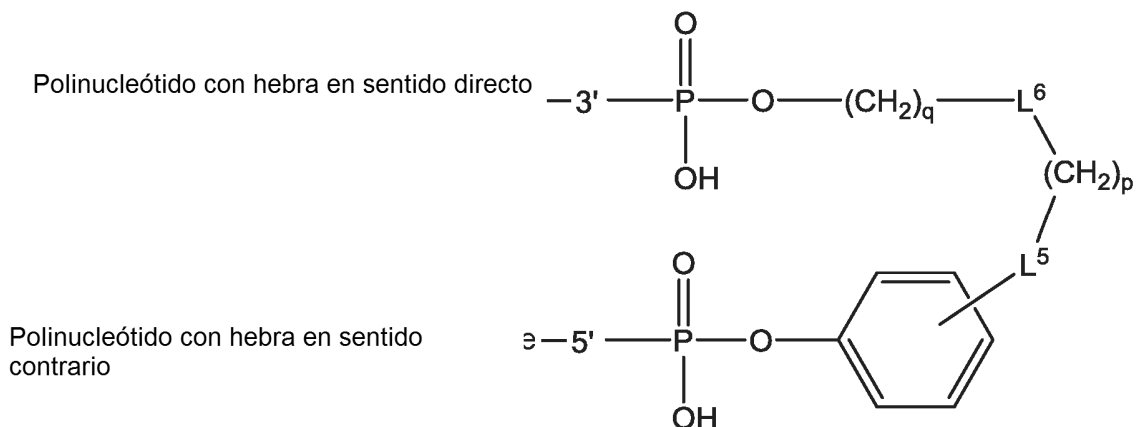
Cuando cada R^1 y R^3 es un átomo de hidrógeno, la estructura enlazadora representada por R^2 es preferentemente una combinación como se indica a continuación:

- 20 cada L^1 y L^2 es un enlace simple, L^3 es $-(C=O)-NH-$, y la suma de m y $n2$ es un número entero de 3 o mayor;
 cada L^1 y L^2 es un enlace simple, L^3 es $-(C=O)-NH-$, y la suma de m y $n2$ es un número entero de 8 o mayor;
 cada L^1 y L^2 es un enlace simple, L^3 es $-(C=O)-NH-$, m es 0 o 2, y $n2$ es un número entero de 6 o mayor;
 cada L^1 y L^2 es un enlace simple, L^3 es $-(C=O)-NH-$, m es 0 o 2, y $n2$ es 6 u 8;
 cada L^1 y L^2 es un enlace simple, L^3 es $-(C=O)-NH-$, m es 0 o 2, y $n2$ es 8; o
 cada L^1 y L^2 es un enlace simple, L^3 es $-(C=O)-NH-$, m es 2, y $n2$ es 8.

- 25 En la presente memoria descriptiva, el polinucleótido anteriormente descrito, un rasgo del cual es que el polinucleótido se deriva de un polinucleótido bicatenario que comprende una hebra de sentido directo correspondiente a un gen diana, y un polinucleótido con hebra de sentido contrario que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria del polinucleótido con hebra de sentido directo, y tiene una estructura monocatenaria en la que el extremo 5' de la hebra de sentido contrario y el extremo 3' de la hebra de sentido directo están unidas
 30 mediante un enlazador estructuralmente definido mediante una fórmula estructural mostrada a continuación para formar una estructura fosfodiéster en cada uno de estos extremos, siendo la estructura monocatenaria el polinucleótido $-3'-P(=O)(OH)-[enlazador]-P(=O)(OH)-5'$ -polinucleótido, también denominado como "3L5-polinucleótido".

- 35 El 3L5-polinucleótido es preferentemente un polinucleótido que tiene una estructura representa mediante la siguiente fórmula:

[Fórmula 20]



en la que

- 40 p representa un número entero de 0 a 4,
 q representa un número entero de 4 a 10,

L⁵ representa un enlace simple o -O-,
 L⁶ representa -(C=O)-NH- o -NH-(C=O)- partiendo del enlace con (CH₂)_p,
 L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición meta o para, y
 a condición de que L⁵ sea -O-, entonces, p representa un número entero de 1 a 4.

5 Además, las siguientes combinaciones son más preferibles:

- la suma de p y q es un número entero de 4 o mayor, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para;
- la suma de p y q es un número entero de 8 o mayor, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para;
- 10 p es 0 o 2, q es un número entero de 6 o mayor, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para;
- p es 0 o 2, q es 6 u 8, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para;
- 15 p es 0 o 2, q es 8, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para; o
- p es 2, q es 8, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para.

En la presente memoria descriptiva, la expresión "nucleótidos complementarios" se refiere a nucleótidos cuyos restos de base son complementarios entre sí y se refiere, por ejemplo, a nucleótidos complementarios entre sí por medio de adenina y timina, guanina y citosina, guanina y 5-metilcitosina, y adenina y uracilo como restos de bases.

- 20 En la presente memoria descriptiva, la "secuencia de nucleótidos complementaria" incluye una secuencia de nucleótidos que consiste en nucleótidos, todos los cuales son complementarios de una secuencia de nucleótidos diana, y también incluye pares de bases que conforman una secuencia de nucleótidos en los nucleótidos de un polinucleótido, aunque uno o más nucleótidos no sean complementarios.

- 25 En la presente memoria descriptiva, la estructura bicatenaria del polinucleótido se refiere a una estructura bicatenaria formada por pares de bases de Watson-Crick entre las respectivas secuencias de nucleótidos complementarias de dos polinucleótidos y una estructura bicatenaria (dentro de un polinucleótido monocatenario) formada por pares de bases de Watson-Crick entre secuencias complementarias dentro del polinucleótido monocatenario.

- 30 En la presente memoria descriptiva, el 3L5-polinucleótido es un polinucleótido monocatenario que forma una estructura bicatenaria mediante pares de bases de Watson-Crick formadas entre nucleótidos complementarios, aunque no todos los nucleótidos del polinucleótido puedan formar pares de bases de Watson-Crick.

- 35 En la presente memoria descriptiva, de los polinucleótidos que constituyen el 3L5-polinucleótido, una hebra que comprende una secuencia de nucleótidos idéntica a la de un gen diana se denomina una hebra pasajero o una hebra de sentido directo correspondiente al gen diana, mientras que una hebra que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria de la del gen diana se denomina una hebra guía o una hebra de sentido contrario contra el gen diana. La hebra de sentido contrario contra el gen diana tiene una secuencia de nucleótidos complementaria del ARNm del gen diana.

- 40 En la presente memoria descriptiva, la expresión "tener una secuencia de nucleótidos idéntica a la de un gen diana" se refiere a tener una secuencia idéntica a al menos una parte de la secuencia de nucleótidos del gen diana. Esto incluye una secuencia completamente idéntica y también incluye una secuencia sustancialmente idéntica a condición de que el 3L5-polinucleótido resultante tenga un efecto de interferencia del ARN y/o un efecto de inhibición de la expresión génica sobre el gen diana. La expresión "tener una secuencia de nucleótidos complementaria de la del gen diana" se refiere a tener una secuencia complementaria con al menos una parte de la secuencia de nucleótidos del gen diana. Incluye una secuencia totalmente complementaria e incluye también una secuencia sustancialmente complementaria a condición de que el 3L5-polinucleótido resultante tenga un efecto de interferencia del ARN y/o un efecto de inhibición de la expresión génica sobre el gen diana. Además, cuando se sabe que el gen diana tiene SNP o similares, una secuencia que tenga estas variaciones también se incluye como secuencia de nucleótidos idéntica.
- 45 En la presente memoria descriptiva, un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria de la de un gen diana y tiene un efecto de interferencia del ARN y/o un efecto de inhibición de la expresión génica sobre el gen diana se denomina como un polinucleótido correspondiente del gen diana.
- 50

- La secuencia de nucleótidos del 3L5-polinucleótido correspondiente del gen diana no está especialmente limitada a condición de que tenga un efecto de interferencia del ARN y/o un efecto de inhibición de la expresión génica sobre el gen diana. Por ejemplo, esto se puede determinar estableciendo las secuencias de las hebras de sentido directo y de sentido contrario sobre la base de una secuencia con predicción de tener un efecto de interferencia del ARN sobre el gen diana mediante el uso de un programa informático (por ejemplo, GENETYX (marca comercial registrada): fabricado por GENETYX CORPORATION), y también se puede determinar confirmando adicionalmente que el efecto de interferencia del ARN y/o un efecto de inhibición de la expresión génica sobre el gen diana de un 3L5-polinucleótido preparado sobre la base de la secuencia seleccionada.
- 55

En la presente memoria descriptiva, la expresión "efecto de inhibición de la expresión génica" incluye el efecto de inhibir por completo la expresión génica y también incluye el efecto de reducir la expresión génica, en comparación con un control. Además, el silenciamiento génico también está incluido en la expresión "efecto de inhibición de la expresión génica". Además, en la presente memoria descriptiva, la expresión "efecto de inhibición de la expresión génica" se utiliza con el mismo significado que la expresión "actividad inhibidora de la expresión génica".

El efecto de interferencia del ARN y/o un efecto de inhibición de la expresión génica se pueden confirmar por un procedimiento habitualmente realizado por el experto en la técnica y se puede confirmar, por ejemplo, mediante: administración de un 3L5-polinucleótido correspondiente a un gen diana a células que expresan el gen diana; después de un período de tiempo determinado, cuantificar una proteína, que es un producto de traducción del gen diana, mediante análisis por transferencia Western; y comprar el nivel de expresión de la proteína con un control. Además, el efecto de interferencia del ARN y/o el efecto de inhibición de la expresión génica también se pueden confirmar midiendo en tiempo real el nivel de expresión del gen diana después de la administración del polinucleótido monocatenario correspondiente al gen diana mediante la técnica de la PCR en tiempo real.

Un polinucleótido que tiene una secuencia idéntica o sustancialmente idéntica a al menos parte de una secuencia de nucleótidos del gen diana es un polinucleótido que tiene una secuencia idéntica o sustancialmente idéntica a cualquier secuencia de 18 nucleótidos o más de la secuencia de nucleótidos del gen diana. En este contexto, la "secuencia sustancialmente idéntica" se refiere a una secuencia que tiene un 70% o más, preferentemente el 80% o más, más preferentemente el 90% o más, de homología, con la secuencia de nucleótidos del gen diana. La homología de la secuencia de nucleótidos se puede calcular usando un programa informático de análisis génico conocido en la técnica tal como BLAST (marca comercial registrada).

En el punto <223> de cada secuencia del Listado de Secuencias adjunto a la presente memoria descriptiva, "cm" representa 2'-O-metilcitidina; "um" representa 2'-O-metiluridina; y "gm" representa 2'-O-metilguanosina.

2. 3L5-polinucleótido

Las respectivas longitudes de cadena de las hebras de sentido directo y de sentido contrario que constituyen el 3L5-polinucleótido de acuerdo con la presente invención pueden tener cualquier longitud desde 18 nucleótidos a la longitud completa del marco de lectura abierto (ORF) del gen diana, a condición de que el 3L5-polinucleótido resultante tenga un efecto de interferencia de ARN y/o un efecto inhibidor de la expresión génica. La hebra de sentido directo tienen preferentemente de 18 a 21 nucleótidos, más preferentemente 18 o 19 nucleótidos, de longitud de cadena. La hebra de sentido contrario tiene preferentemente de 19 a 21 nucleótidos, más preferentemente 21 nucleótidos, de longitud de cadena. El 3L5-polinucleótido no tiene que tener una estructura bicatenaria en su conjunto, e incluye la que se solapa parcialmente en los extremos 5' y/o 3'. El extremo solapante tiene de 1 a 5 nucleótidos, preferentemente de 1 a 3 nucleótidos, más preferentemente 2 nucleótidos. Además, los ejemplos más preferibles del 3L5-polinucleótido incluyen un polinucleótido que tiene una estructura en la cual el extremo 3' del polinucleótido con hebra en sentido contrario solapa en 2 nucleótidos (estructura solapante), y que tiene 18 pares de bases.

El 3L5-polinucleótido tiene al menos una propiedad seleccionada entre las siguientes (a) a (h):

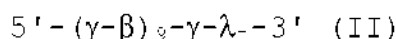
- (a) tener un efecto de interferencia de ARN y/o un efecto inhibidor de la expresión génica sobre el gen diana;
- (b) ser resistente a ARNasa y tener un efecto de interferencia de ARN y/o un efecto inhibidor de la expresión génica sobre el gen diana;
- (c) ser resistente a fosfatasa y tener un efecto de interferencia de ARN y/o un efecto inhibidor de la expresión génica sobre el gen diana;
- (d) ser resistente a exonucleasa y tener un efecto de interferencia de ARN y/o un efecto inhibidor de la expresión génica sobre el gen diana;
- (e) ser resistente a ARNasa, fosfatasa y exonucleasa y tener un efecto de interferencia de ARN y/o un efecto inhibidor de la expresión génica sobre el gen diana;
- (f) tener una hebra de sentido contrario que es resistente a fosfatasa y que tiene un efecto de interferencia de ARN y/o un efecto inhibidor de la expresión génica sobre el gen diana;
- (g) que tiene una hebra de sentido contrario que es resistente a exonucleasa y que tiene un efecto de interferencia de ARN y/o un efecto inhibidor de la expresión génica sobre el gen diana; y
- (h) que tiene una hebra de sentido contrario que es resistente a 5'-3'-exonucleasa y que tiene un efecto de interferencia de ARN y/o un efecto inhibidor de la expresión génica sobre el gen diana.

2-1. Un ejemplo del 3L5-polinucleótido puede incluir un polinucleótido, un rasgo del cual es que el polinucleótido se deriva de un polinucleótido bicatenario que comprende una hebra de sentido directo correspondiente a un gen diana, y un polinucleótido con hebra de sentido contrario que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria del polinucleótido con hebra de sentido directo, y tiene una estructura en la que el extremo 5' de la hebra de sentido contrario y el extremo 3' de la hebra de sentido directo están unidas mediante un enlazador estructuralmente definido mediante una fórmula estructural mostrada a continuación para formar una estructura fosfodiéster en cada uno de estos extremos, siendo la estructura la siguiente estructura: polinucleótido-3'-P(=O)(OH)-[enlazador]-P(=O)(OH)-5'-polinucleótido en el que "polinucleótido-3'" representa la estructura del

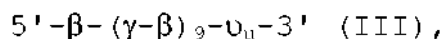
polinucleótido sin un átomo hidrógeno en su grupo hidroxilo del extremo 3', y "5'-polinucleótido" representa la estructura del polinucleótido sin un átomo hidrógeno en su grupo hidroxilo del extremo 5'.

Un ejemplo adicional del 3L5-polinucleótido puede incluir una molécula de ARN aislada que tiene una estructura bicatenaria que comprende hebra de sentido directo y de sentido contrario de 18 a 23 bases de longitud, cada una de las cuales tiene de 18 a 23 bases de longitud y al menos una de las cuales tiene un saliente en 3' que consiste en de 1 a 3 bases, en la que la molécula de ARN es una molécula de ARN que es capaz de una interferencia del ARN específica de la diana y tiene una hebra que consiste en una secuencia 100% idéntica a la molécula del ARNm diana predeterminada salvo por el saliente en 3', estando la molécula de ARNm diana presente en una célula o en un organismo, y en el que la molécula de ARN es un polinucleótido que tiene una estructura en la cual el extremo 5' de la hebra de sentido contrario y el extremo 3' de la hebra de sentido directo están unidas mediante un enlazador para formar una estructura fosfodiéster en cada uno de estos extremos.

Un ejemplo adicional del 3L5-polinucleótido puede incluir un polinucleótido o una sal del mismo, comprendiendo el polinucleótido un polinucleótido con hebra en sentido directo que consiste en un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (II) y un polinucleótido con hebra en sentido contrario que consiste en un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (III), que tiene una estructura en la que el extremo 5' de la hebra de sentido contrario y el extremo 3' de la hebra de sentido directo están unidos mediante un enlazador para formar una estructura de fosfodiéster en cada uno de dichos extremos, y que además tiene las siguientes características de (a) a (d):



y



(a) γ representa un ARN, β representa un 2'-OMeARN, y cada λ y u representa un ADN;

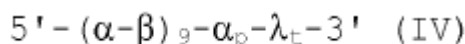
(b) t y u representan, de forma idéntica o diferente, cualquier número entero de 0 a 5;

(c) $(\gamma - \beta)_9 - \gamma$ en el polinucleótido representado mediante la fórmula (II) tiene una secuencia de nucleótidos idéntica a la del gen diana; y

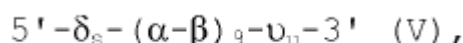
(d) $(\gamma - \beta)_9 - \gamma$ en la fórmula (II) y $\beta - (\gamma - \beta)_9$ en la fórmula (III) tienen secuencias de nucleótidos complementarias entre sí.

Cada uno de γ , β , λ , y u representa una unidad de nucleósido. La línea entre los nucleósidos representa un enlace fosfodiéster o un enlace fosforotioato. La unidad de nucleósido se refiere a una forma N-glucosilo de una base de ácido nucleico (por ejemplo, el "nucleósido natural" o el "nucleósido modificado con azúcar" anteriormente descrito), que es un constituyente de la unidad de polinucleótido.

Un ejemplo adicional del 3L5-polinucleótido puede incluir un polinucleótido o una sal del mismo, comprendiendo el polinucleótido un polinucleótido con hebra en sentido directo que consiste en un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (IV) y un polinucleótido con hebra en sentido contrario que consiste en un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (V), que tiene una estructura en la que el extremo 5' de la hebra de sentido contrario y el extremo 3' de la hebra de sentido directo están unidos mediante un enlazador para formar una estructura de fosfodiéster en cada uno de dichos extremos, y que además tiene las siguientes características de (a) a (d)



y



(a) α y β representan, de forma diferente, un ADN o un 2'-OMeARN, δ y λ representan, de forma idéntica o diferente, un ADN o un 2'-OMeARN, y u representa, de manera idéntica o diferente, cualquier nucleótido seleccionado entre un ADN, un ARN, y un 2'-OMeARN;

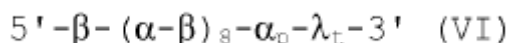
(b) p representa un número entero de 0 o 1, t es 0 cuando p es 0 y representa cualquier número entero de 0 a 5 cuando p es 1, s representa cualquier número entero de 0 o 1, y u representa cualquier número entero de 0 a 5;

(c) $(\alpha - \beta)_9 - \alpha_p$ en el polinucleótido representado mediante la fórmula (IV) tiene una secuencia de nucleótidos idéntica a la del gen diana; y

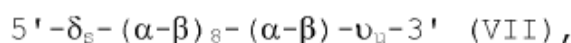
(d) $(\alpha - \beta)_9$ en la fórmula (IV) y $(\alpha - \beta)_9$ en la fórmula (V) tienen secuencia de nucleótidos complementarias entre sí.

Cada uno de α , β , δ , y λ representa una unidad de nucleósido. La línea entre los nucleósidos representa un enlace fosfodiéster o un enlace fosforotioato. La unidad de nucleósido se refiere a una forma N-glucosilo de una base de ácido nucleico (por ejemplo, el "nucleósido natural" o el "nucleósido modificado con azúcar" anteriormente descrito), que es un constituyente de la unidad de polinucleótido.

Un ejemplo adicional del 3L5-polinucleótido puede incluir un polinucleótido o una sal del mismo, comprendiendo el polinucleótido un polinucleótido con hebra en sentido directo que consiste en un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (VI) y un polinucleótido con hebra en sentido contrario que consiste en un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (VII), que tiene una estructura en la que el extremo 5' de la hebra de sentido contrario y el extremo 3' de la hebra de sentido directo están unidos mediante un enlazador para formar una estructura de fosfodiéster en cada uno de dichos extremos, y que además tiene las siguientes características de (a) a (d):



y



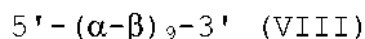
(a) α y β representan, de forma diferente, un ADN o un 2'-OMeARN, δ y λ representan, de forma idéntica o diferente, un ADN o un 2'-OMeARN, y u representa, de manera idéntica o diferente, cualquier nucleótido seleccionado entre un ADN, un ARN, y un 2'-OMeARN;

(b) p representa un número entero de 0 o 1, t es 0 cuando p es 0 y representa cualquier número entero de 0 a 5 cuando p es 1, s representa cualquier número entero de 0 o 1, y u representa cualquier número entero de 0 a 5;

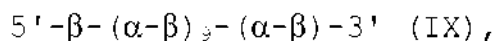
(c) $\beta - (\alpha - \beta)_s - \alpha_p$ en el polinucleótido representado mediante la fórmula (VI) tiene una secuencia de nucleótidos idéntica a la del gen diana; y

(d) $(\alpha - \beta)_s$ en la fórmula (VI) y $(\alpha - \beta)_s$ en la fórmula (VII) tienen secuencias de nucleótidos complementarias entre sí.

Un ejemplo adicional del 3L5-polinucleótido puede incluir el polinucleótido o una sal del mismo, comprendiendo el polinucleótido un polinucleótido con hebra en sentido directo que consiste en un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (VIII) y un polinucleótido con hebra en sentido contrario que consiste en un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (IX), que tiene una estructura en la que el extremo 5' de la hebra de sentido contrario y el extremo 3' de la hebra de sentido directo están unidos mediante un enlazador para formar una estructura de fosfodiéster en cada uno de dichos extremos, y que además tiene las siguientes características de (a) a (c):



y



(a) α es un ADN, y β es un 2'-OMeARN;

(b) $\beta - (\alpha - \beta)_9$ en el polinucleótido representado mediante la fórmula (IX) tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la del gen diana; y

(c) $(\alpha - \beta)_9$ en la fórmula (VIII) y $(\alpha - \beta)_9$ en la fórmula (IX) tienen secuencias de nucleótidos complementarias entre sí.

El 3L5-polinucleótido también incluye un polinucleótido en el que de 1 a 4 restos arbitrarios en el 3L5-polinucleótido están sustituidos por otros nucleótidos modificados con azúcar a condición de que el polinucleótido tenga un efecto de interferencia de ARN y/o un efecto inhibitor de la expresión génica.

El nucleótido modificado con azúcar abarca todas las formas de modificación con azúcar conocidas en el campo técnico al que pertenece la presente invención. El nucleótido modificado con azúcar puede retener todos los sitios de la base heterocíclica y enlaces internucleosídicos, e incluye además nucleótidos modificados con azúcares diferentes de las modificaciones con azúcar anteriormente descritas. El grupo de nucleótidos modificados con azúcares incluye nucleósidos modificados en 2', nucleósidos tiomodificados en 4', nucleósidos 4'-tio-2'-modificados, y nucleósidos bicíclicos modificados con azúcar.

Los nucleósidos modificados en 2' son, por ejemplo, halo, alilo, amino, azida, O-alilo, -O-alquilo C_1 - C_{10} , OCF_3 , $O-(CH_2)_2-O-CH_3$, $2'-O-(CH_2)_2SCH_3$, $O-(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$, y $O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$, en la que R_m y R_n son cada uno individualmente H, un grupo protector de amino, o un alquilo C_1 - C_{10} sustituido o no sustituido. Una modificación en 2' preferida es -F, $-OCH_3$, o $-O-(CH_2)_2-O-CH_3$, más preferentemente $-OCH_3$.

Los ejemplos de nucleósidos tiomodificados en 4' pueden incluir β -D-ribonucleósidos en los que el átomo de oxígeno en 4' se ha sustituido por un átomo de azufre (Hoshika, S. y col. FEBS Lett. 579, págs. 3115-3118, (2005); Dande, P. y col. J. Med. Chem. 49, págs. 1624-1634 (2006); y Hoshika, S. y col. ChemBioChem. 8, págs. 2133-2138, (2007)).

Los ejemplos de nucleósidos 4'-tio-2'-modificados pueden incluir nucleósidos 4'-tio-2'-modificados que retienen 2'-H

o 2'-O-metilo (Matsugami, y col. *Nucleic Acids Res.* 36, 1805 (2008)).

Los ejemplos de nucleósidos bicíclicos modificados con azúcar pueden incluir nucleósidos que retienen el segundo anillo formado al crear un puente entre dos átomos del anillo de ribosa. Los ejemplos de dichos nucleósidos pueden incluir: 2',4'-BNAs/LNA (ácidos nucleicos con puente/ácidos nucleicos bloqueados) en los que el átomo de oxígeno en 2' y el átomo de carbono en 4' forman un puente mediante una cadena de metileno (Obika, S. y col. *Tetrahedron Lett.*, 38, págs. 8735-(1997); Obika, S. y col., *Tetrahedron Lett.*, 39, págs. 5401-(1998); A.A. Koshkin, A.A. y col. *Tetrahedron*, 54, pág. 3607 (1998); y Obika, S. *Bioorg. Med. Chem.*, 9, p. 1001 (2001).); y ENA (2'-O,4'-C-etileno-ácidos nucleicos con puente) que forman un puente con una cadena de etileno más larga en un átomo de carbono que la cadena de metileno aplicada a 2',4'-BNA/LNA (Morita, K. y col. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12, pág. 73 (2002); y Morita, K. y col. *Bioorg. Med. Chem.*, 11, pág. 2211 (2003).

Cuando de 1 a 4 restos 2'-OMeARN arbitrarios del 3L5-polinucleótido que contiene 2'-OMeARN están sustituidos por nucleótidos modificados con azúcares, además de los nucleótidos modificados con azúcares anteriores, los nucleótidos modificados con azúcares más preferidos son, de manera idéntica o diferente, un ENA o un 2',4'-BNA/LNA.

El 3L5-polinucleótido también incluye un polinucleótido en el que de 1 a 4 restos de ADN del polinucleótido están, de manera idéntica o diferente, sustituidos por un ARN, un ENA, o un 2',4'-BNA/LNA.

2-2 Procedimiento para sintetizar la hebra de sentido directo del 3L5-polinucleótido

El procedimiento para preparar el polinucleótido que constituye el 3L5-polinucleótido no está especialmente limitado a condición de que se pueda sintetizar el polinucleótido deseado, y se pueda usar un procedimiento de síntesis química conocido, por ejemplo, un procedimiento de fosfotriéster, fosforamidita, o H-fosfonato. Por ejemplo, se puede sintetizar mediante un sintetizador de ácido nucleico comercialmente disponible y reactivos comercialmente disponibles utilizados en la síntesis de ADN/ARN.

2-3 Procedimiento para sintetizar el 3L5-polinucleótido

El procedimiento para fabricar el 3L5-polinucleótido no está limitado a condición de que se pueda sintetizar el 3L5-polinucleótido. Se puede sintetizar mediante, por ejemplo, el siguiente procedimiento:

2-3-1 Procedimiento A

2-3-1-1 Etapa A-1

El detalle de la Etapa A-1 se muestra en la Figura 1.

La presente etapa es la etapa de utilizar un soporte polimérico (1) unido a los nucleósidos deseados (denominados como Tr^1 -O-Y-CPG en la Etapa A-1, en la que CPG representa un soporte polimérico que tiene un enlazador capaz de unirse al polinucleótido, Y representa una unidad de nucleósido, con un grupo amino protegido en el resto de la nucleobase, sin grupos hidroxilo 5' y 3' y Tr^1 representa un grupo protector del grupo hidroxilo) para producir un compuesto (2) (denominado como HO- W^1 -Y-CPG en la Etapa A-1, en la que W^1 -Y representa un polinucleótido protegido sin grupos hidroxilo en los extremos 5' y 3'), que es un análogo de oligonucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos deseada.

Tr^1 no está especialmente limitado a condición de que sea un grupo protector del grupo hidroxilo que se puede desproteger sin eliminar el grupo protector del ácido nucleico. Los ejemplos de los mismos pueden incluir un grupo 4-metoxitritilo, un grupo 4,4'-dimetoxitritilo, un grupo pixilo, un grupo tritilo, un grupo levulinilo, y un grupo bis(trimetilsililo)(ciclohexilo)sililo. Es preferible un grupo 4-metoxitritilo o un grupo 4,4'-dimetoxitritilo.

El grupo protector del grupo amino del resto de la base del ácido nucleico no está especialmente limitado a condición de que tenga aplicación práctica. Los ejemplos del mismo incluyen un grupo benzoilo, un grupo isobutirilo, un grupo acetilo, un grupo fenoxiacetilo, un grupo 4-(t-butil)fenoxiacetilo, un grupo aliloxicarbonilo, y un grupo p-nitrofenilcarbonilo.

Los ejemplos de CPG incluyen vidrio de poro controlado, vidrio de poro controlado de alquilamino de cadena larga (Oligonucleotide synthesis Editado por M.J. Gait, IRL Press, 1984, págs. 84-115), y perlas de poliestireno (Tetrahedron Lett. 34, 3373 (1994)). Otro ejemplo de CPG incluye un soporte polimérico que tiene un grupo aminoalquilo tal como un grupo aminopropilo o un grupo aminohexilo.

Los ejemplos de enlazador capaz de unirse al polinucleótido incluye un enlazador de ácido succínico -OC(=O)-CH₂CH₂C(=O)- que forman un enlace éster mediante el átomo de oxígeno en la polímeros 3' de Y y forma un enlace amida mediante el otro grupo ácido carboxílico del ácido succínico con el grupo amino del soporte polimérico. Los ejemplos de un enlazador distinto al enlazador de ácido succínico incluyen enlazadores de sarcosina (-OC(=O)-CH₂CH₂C(=O)-) y ácido oxálico (-OC(=O)C(=O)-).

Los ejemplos de Tr^1 -O-Y-CPG comercialmente disponible en la que Tr^1 es un grupo 4,4'-dimetoxitritilo, y CPG tiene

un enlazador de ácido succínico $\text{-OC(=O)-CH}_2\text{CH}_2\text{C(=O)-}$ que forma un enlace éster mediante el átomo de oxígeno en la posición 3' de Y y que forma un enlace amida mediante el otro ácido carboxílico del ácido succínico con el grupo amino del soporte polimérico incluyen 2'-OMe-A-ARN-CPG (20-3600-10), 2'-OMe-C-ARN-CPG (20-3610-10), 2'-OMe-G-ARN-CPG (20-3621-10), 2'-OMe-U-ARN-CPG (20-3630-10), Bz-A-ARN-CPG (20-3303-10), Ac-C-ARN-CPG (20-3315-10), iPr-Pac-G-ARN-CPG (20-3324-10), U-ARN-CPG (20-3330-10), dA-CPG (20-2000-10), dC-CPG (20-2010-10), dG-CPG (20-2020-10), y dT-CPG (20-2030-10) de Glen Research Corp.

El compuesto (2) se produce mediante un procedimiento de fosforamidita habitual usando un sintetizador automático de ADN y un reactivo de fosforamidita, etc., necesario para producir el compuesto (2). El análogo de oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos deseada se puede sintetizar de acuerdo con el procedimiento descrito en la bibliografía (Nucleic Acids Research, 12, 4539 (1984)) usando un sintetizador de ADN, por ejemplo, el modelo 392 (fabricado por PerkinElmer Inc.), que está basado en el procedimiento de la fosforamidita.

Además, cuando el análogo de nucleótido se convierte, si se desea, en la forma tioato, se puede obtener un derivado de tioato de acuerdo con los procedimientos descritos en la literatura (Tetrahedron Letters, 32, 3005 (1991); y J. Am. Chem. Soc., 112, 1253 (1990)) usando azufre o un reactivo tal como disulfuro de tetraetiluramo (TETD, Applied Biosystems), reactivo de Beaucage, o una solución de disulfuro de fenilacetilo/piridina-acetonitrilo (1:1 v/v) (Ravikumar, V.T. y col., Bioorg. Med. Chem. Lett. (2006) 16, págs. 2513-2517).

2-3-2 Procedimiento C

El detalle del Procedimiento C se muestra en la Figura 2.

2-3-2-1 Etapa C-1

La presente etapa es la etapa de hacer reaccionar el compuesto (9) con un reactivo protector (preferentemente, cloruro de dimetoxitritilo) que se puede eliminar en condiciones ácidas, en presencia de un desoxidante en un disolvente inerte para obtener un compuesto (10) con un grupo hidroxilo protegido en el compuesto (9).

El disolvente utilizado no está especialmente limitado a condición de que no inhiba la reacción y disuelva los materiales de partida en cierta medida. Ejemplos de los mismos pueden incluir: hidrocarburos aromáticos tales como benceno, tolueno y xileno; hidrocarburos halogenados tales como cloruro de metileno y cloroformo; éteres tales como éter, tetrahidrofurano, dioxano, y dimetoxietano; amidas tales como dimetilformamida, dimetilacetamida, y triamida hexametilfosfórica; sulfóxidos tales como dimetilsulfóxido; cetonas tales como acetona y metil etil cetona; aminas heterocíclicas tales como piridina; y nitrilos tales como acetonitrilo. Los ejemplos preferidos de los mismos incluyen aminas heterocíclicas (especialmente, piridina).

Los ejemplos del reactivo protector utilizado incluyen haluros de tritilo tales como cloruro de tritilo, cloruro de monometoxitritilo, cloruro de dimetoxitritilo, y cloruro de trimetoxitritilo. El cloruro de monometoxitritilo o el cloruro de dimetoxitritilo son preferibles.

El desoxidante utilizado no está especialmente limitado a condición de que ni inhiba la reacción ni descomponga los productos y los materiales de partida. Son preferibles las aminas aromáticas tales como piridina y dimetilaminopiridina.

La temperatura y el tiempo de reacción difieren dependiendo de los tipos de reactivo protector y agente desoxidante. En el caso de usar cloruro de dimetoxitritilo como reactivo protector y usar piridina tanto como disolvente como desoxidante, la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas.

Después de completarse la reacción, el compuesto de interés se recoge de la mezcla de reacción según un procedimiento convencional. El compuesto de interés se obtiene, por ejemplo, mediante: neutralización adecuada de la mezcla de reacción, o eliminación de la materia insoluble, en caso de haberlos, por filtración; a continuación, adición de agua y un disolvente orgánico inmiscible con agua tal como acetato de etilo; después de lavar con agua, separar la capa orgánica que contiene el compuesto de interés; secar la capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro o similar; y a continuación eliminar el disolvente por destilación. El compuesto de interés obtenido se puede purificar adicionalmente, si es necesario, por un procedimiento convencional, por ejemplo, recristalización, reprecipitación, o cromatografía.

2-3-2-2 Etapa C-2

La presente etapa es la etapa de hacer reaccionar el grupo carboxilo del compuesto (10) con fenol que tiene un grupo amino en un disolvente inerte para formar un compuesto (11) que tiene un enlace amida.

El disolvente utilizado no está especialmente limitado a condición de que no inhiba la reacción. Ejemplos de los mismos incluyen: hidrocarburos aromáticos tales como benceno, tolueno y xileno; hidrocarburos halogenados tales como cloruro de metileno, cloroformo, tetracloruro de carbono, dicloroetano, clorobenceno, y diclorobenceno; ésteres tales como formiato de etilo, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de butilo, y carbonato de dietilo; cetonas tales como acetona, metil etil cetona, metil isobutil cetona, isoforona, y ciclohexanona; nitrocompuestos tales como

nitroetano y nitrobenzeno; nitrilos tales como acetonitrilo e isobutironitrilo; amidas tales como formamida, dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida, y triamida hexametilfosfórica; y sulfóxidos tales como dimetilsulfóxido y sulfolano. Son preferibles los hidrocarburos halogenados (especialmente, cloruro de metileno) o las amidas (especialmente dimetilformamida).

- 5 Los ejemplos del fenol utilizado pueden incluir 4-aminofenol y 3-aminofenol. Se prefiere el 4-aminofenol.

Los ejemplos de un reactivo formador de aminas usado incluyen: N-hidroxicompuestos tales como N-hidroxisuccinimida, 1-hidroxibenzotriazol, y N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida; compuestos de diimidazol tales como 1,1'-oxalildiimidazol y N,N'-carbonildiimidazol; compuestos de disulfuro tales como disulfuro de 2,2'-dipiridilo; compuestos de ácido succínico tales como carbonato de N,N'-disuccinimidilo; compuestos de cloruro fosfínico tales como cloruro de N,N'-bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico; compuestos de oxalato tales como oxalato de N,N'-disuccinimidilo (DSO), oxalato de N,N'-difalimidilo (DPO), oxalato de N,N'-bis(norbornenilsuccinimidilo) (BNO), oxalato de 1,1'-bis(benzotriazolilo) (BBTO), oxalato de 1,1'-bis(6-clorobenzotriazolilo) (BCTO), y oxalato de 1,1'-bis(6-trifluorometilbenzotriazolilo) (BTBO); y carbodiimidas tales como dicilohexilcarbodiimida (DCC) y 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC). Particularmente, se prefieren los compuestos de diimidazol o carbodiimidas (especialmente EDC).

1-Hidroxibenzotriazol (HOBt) se puede añadir como reactivo auxiliar de reacción.

La temperatura y el tiempo de reacción varían dependiendo de los tipos de reactivo formador de amida y el disolvente usado, y son de 0°C a 100°C durante de 5 a 50 hora. Particularmente, en el caso de usar 4-aminofenol y EDC en cloruro de metileno, la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 18 horas.

Después de completarse la reacción, el compuesto de interés se recoge de la mezcla de reacción según un procedimiento convencional. El compuesto de interés se obtiene, por ejemplo, mediante: neutralización adecuada de la mezcla de reacción, o eliminación de la materia insoluble, en caso de haberlos, por filtración; a continuación, adición de agua y un disolvente orgánico inmiscible con agua tal como acetato de etilo; después de lavar con agua, separar la capa orgánica que contiene el compuesto de interés; secar la capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro o similar; y a continuación eliminar el disolvente por destilación. El compuesto de interés obtenido se puede purificar adicionalmente, si es necesario, por un procedimiento convencional, por ejemplo, recristalización, reprecipitación, o cromatografía.

2-3-3 Procedimiento D

El detalle del Procedimiento D se muestra en la Figura 2. En el diagrama, n1, n2, m, y L¹ son como se han definido anteriormente. Específicamente, m representa un número entero de 0 a 4, y L¹ representa un enlace simple o -O-.

2-3-3-1 Etapa D-1a

La presente etapa es la etapa de hacer reaccionar el grupo amino del compuesto (12a) con fenol que tiene un grupo carboxilo en un disolvente inerte para formar un compuesto (13a) que tiene un enlace amida.

Los ejemplos del fenol usado pueden incluir ácido 3-hidroxifenilacético, ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-(3-hidroxifenil)propiónico, ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico, ácido 4-(3-hidroxifenil)valérico, ácido 4-(4-hidroxifenil)valérico, ácido 3-hidroxifenociacético, y ácido 4-hidroxifenociacético. Es preferible el ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico.

La presente etapa se puede llevar a cabo de la misma forma que la etapa C-2.

2-3-3-2 Etapa D-2a

La presente etapa es la etapa de hacer reaccionar el compuesto (13a) con un reactivo protector (preferentemente, cloruro de dimetoxitritilo) que se puede eliminar en condiciones ácidas, en presencia de un desoxidante en un disolvente inerte para obtener un compuesto (14a) con un grupo hidroxil protegido en el compuesto (13a).

La presente etapa se puede llevar a cabo de la misma forma que la etapa C-1.

2-3-3-3 Etapa D-1b

La presente etapa es la etapa de hacer reaccionar el grupo amino del compuesto (12b) con fenol que tiene un grupo carboxilo en un disolvente inerte para formar un compuesto (13b) que tiene un enlace amida.

Los ejemplos del fenol usado pueden incluir ácido 3-hidroxifenilacético, ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-(3-hidroxifenil)propiónico, ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico, ácido 4-(3-hidroxifenil)valérico, ácido 4-(4-hidroxifenil)valérico, ácido 3-hidroxifenociacético, y ácido 4-hidroxifenociacético. Es preferible el ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico.

La presente etapa se puede llevar a cabo de la misma forma que la etapa C-2.

2-3-3-4 Etapa D-2b

La presente etapa es la etapa de hacer reaccionar el compuesto (13b) con un reactivo protector (preferentemente, cloruro de dimetoxitritilo) que se puede eliminar en condiciones ácidas, en presencia de un desoxidante en un disolvente inerte para obtener un compuesto (14b) con un grupo hidroxil protegido en el compuesto (13b).

- 5 La presente etapa se puede llevar a cabo de la misma forma que la etapa C-1.

2-3-3-5 Etapa D-1c

La presente etapa es la etapa de hacer reaccionar el grupo amino del compuesto (12a) con fenol que tiene un grupo carboxilo en un disolvente inerte para formar un compuesto (13c) que tiene un enlace amida.

Los ejemplos del fenol usado pueden incluir N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-tirosina.

- 10 La presente etapa se puede llevar a cabo de la misma forma que la etapa C-2.

2-3-3-6 Etapa D-2c

La presente etapa es la etapa de hacer reaccionar el compuesto (13c) con un reactivo protector (preferentemente, cloruro de dimetoxitritilo) que se puede eliminar en condiciones ácidas, en presencia de un desoxidante en un disolvente inerte para obtener un compuesto (14c) con un grupo hidroxil protegido en el compuesto (13c).

- 15 La presente etapa se puede llevar a cabo de la misma forma que la etapa C-1.

2-3-4 Procedimiento E

El detalle del Procedimiento E se muestra en la Figura 3.

2-3-4-1 Etapa E-1

- 20 La presente etapa es la etapa de hacer reaccionar el compuesto (15) con un reactivo protector (preferentemente, cloruro de monometoxitritilo) que se puede eliminar en condiciones ácidas, en presencia de un desoxidante en un disolvente inerte para obtener un compuesto (16) con un grupo hidroxil protegido en el compuesto (15).

La presente etapa se puede llevar a cabo de la misma forma que la etapa C-1.

2-3-4-2 Etapa E-2

- 25 La presente etapa es la etapa de hacer reaccionar el grupo carboxilo del compuesto (16) con éster de tirosina en un disolvente inerte para formar un compuesto (17) que tiene un enlace amida.

Los ejemplos del éster de tirosina usado puede incluir éster metílico de tirosina y éster etílico de tirosina. El éster etílico de tirosina.

La presente etapa se puede llevar a cabo de la misma forma que la etapa C-2.

2-3-5 Procedimiento F

- 30 El detalle del Procedimiento F se muestra en la Figura 3. En el diagrama, A representa $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2]-$, o $-\text{CH}[\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3]-$.

2-3-5-1 Etapa F-1

- 35 La presente etapa es la etapa de hacer reaccionar el grupo amino del compuesto (18) con un aminoácido (19) que tiene un grupo amino protegido con un grupo t-Boc en un disolvente inerte para formar un compuesto (20) que tiene un enlace amida.

Los ejemplos del tipo de aminoácido protegido con un grupo t-Boc pueden incluir glicina, alanina, β -alanina, leucina e isoleucina. Glicina, alanina, o β -alanina son preferibles.

La presente etapa se puede llevar a cabo de la misma forma que la etapa C-2.

2-3-5-2 Etapa F-2

- 40 La presente etapa es la etapa de hacer reaccionar el compuesto (20) con un reactivo de desprotección para la eliminación selectiva del grupo protector del grupo amino en un disolvente inerte para producir un compuesto (21).

Los ejemplos preferibles del disolvente utilizado incluyen: hidrocarburos aromáticos tales como benceno, tolueno y xileno; hidrocarburos halogenados tales como cloruro de metileno, cloroformo, tetracloruro de carbono, dicloroetano, clorobenceno, y diclorobenceno; ésteres tales como formiato de etilo, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de

- butilo, y carbonato de dietilo; éteres tales como éter dietílico, éter diisopropílico, tetrahidrofurano, dioxano, dimetoxietano, y dietilenglicol dimetil éter; alcoholes tales como metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, t-butanol, alcohol isoamílico, dietilenglicol, glicerina, octanol, ciclohexanol, y metilcelosolve; cetonas tales como acetona, metil etil cetona, metil isobutil cetona, isoforona, y ciclohexanona; nitrocompuestos tales como
- 5 nitroetano y nitrobenzono; nitrilos tales como acetonitrilo e isobutironitrilo; amidas tales como formamida, dimetilformamida, dimetilacetamida, y triamida hexametilfosfórica; y sulfóxidos tales como dimetilsulfóxido y sulfolano. Los ejemplos más preferibles de los mismos incluyen alcoholes (especialmente, metanol y etanol), cloruro de metileno, y, en el caso de utilizar ácido acético como el reactivo de desprotección, una solución mixta de ácido acético y agua.
- 10 El reactivo de desprotección utilizado no está especialmente limitado siempre se que se puede aplicar habitualmente. En el caso de usar un grupo t-Boc como el grupo protector, los ejemplos del reactivo de desprotección incluyen ácidos de Lewis tales como ácido acético, ácido dicloroacético, ácido trifluoroacético, ácido clorhídrico, y bromuro de cinc. Ácido acético, ácido dicloroacético, o ácido trifluoroacético, son preferibles.
- 15 La temperatura de reacción difiere dependiendo de los reactivos, materiales de partida, disolventes, etc. utilizados, y es normalmente de -10 a 100°C, preferentemente de 0 a 50°C.
- El tiempo de reacción difiere dependiendo de los materiales de partida reactivos, temperaturas de reacción, etc. utilizados, y es normalmente de 1 minuto a 50 horas, preferentemente de 1 minuto a 24 horas.
- Después de completarse la reacción, el compuesto de interés se recoge de la mezcla de reacción según un procedimiento convencional.
- 20 2-3-5-3 Etapa F-3
- La presente etapa es la etapa de hacer reaccionar el grupo amino del compuesto (21) con un compuesto (16) en un disolvente inerte para formar un compuesto (22) que tiene un enlace amida.
- La presente etapa se puede llevar a cabo de la misma forma que la etapa C-2.
- 2-3-6 Procedimiento G
- 25 El detalle del Procedimiento G se muestra en la Figura 4.
- 2-3-6-1 Etapa G-1
- La presente etapa es la etapa de hacer reaccionar el grupo hidroxilo del fenol (denominado como Tr-O-X-H en la Figura 4, en la que Tr representa un grupo protector del grupo hidroxilo) del compuesto (11) producido en la etapa C-2, el compuesto (14a) producido en etapa D-2a, el compuesto (14b) producido en etapa D-2b, el compuesto (14c)
- 30 producido en etapa D-2c, el compuesto (17) producido en etapa E-2, o el compuesto (22) producido en etapa F-3 con cloro(alcoxi)fosfinas monosustituidas (denominadas como $R^5-P(-O-R^4)-Cl$ en la Figura 4) o alcoxi fosfinas disustituidas (denominadas como $(R^5)_2P(-O-R^4)$ en la Figura 4) para su uso en la conversión a una forma amidada para producir un compuesto (23).
- Tr no está especialmente limitado a condición de que sea un grupo protector del grupo hidroxilo que se puede desproteger sin eliminar el grupo protector del ácido nucleico. Los ejemplos de los mismos pueden incluir un grupo 4-metoxitritilo, un grupo 4,4'-dimetoxitritilo, un grupo pixilo, un grupo tritilo, un grupo levulinilo, y un grupo bis(trimetilsililo)(ciclohexilo)sililo. Es preferible un grupo 4-metoxitritilo o un grupo 4,4'-dimetoxitritilo.
- 35 El disolvente utilizado no está especialmente limitado a condición de que no afecte la reacción. Los ejemplos preferibles de los mismos incluyen: éteres tales como tetrahidrofurano, dietil éter, y dioxano; e hidrocarburos halogenados tales como cloruro de metileno, cloroformo, tetracloruro de carbono, dicloroetano, clorobenceno, y diclorobenceno.
- 40 Los ejemplos de R^4 en la presente etapa pueden incluir un grupo 2-cianoetilo, un grupo metilo, un grupo metanosulfonietilo, un grupo 2,2,2-tricloroetilo, y un grupo alilo. Un grupo cianoetilo o un grupo metilo son preferibles.
- 45 Los ejemplos de R^5 en la presente etapa pueden incluir un grupo morfolino, un grupo diisopropilamino, un grupo dietilamino, y un grupo dimetilamino. Un grupo diisopropilamino es preferido.
- Los ejemplos de las cloro(alcoxi)fosfinas monosustituidas usadas incluyen fosfinas tales como cloro(morfolino)metoxifosdina, cloro(morfolino)cianoetoxifosdina, cloro(dimetilamino)metoxifosdina, cloro(dimetilamino)cianoetoxifosdina, cloro(diisopropilamino)metoxifosdina, y
- 50 cloro(diisopropilamino)cianoetoxifosdina. Cloro(morfolino)metoxifosdina, cloro(morfolino)cianoetoxifosdina, cloro(diisopropilamino)metoxifosdina, o cloro(diisopropilamino)cianoetoxifosdina son preferibles.
- Cuando se utilizan las cloro(alcoxi)fosfinas monosustituidas, se utiliza un desoxidante. En este caso, los ejemplos del

desoxidante utilizado incluyen: aminas heterocíclicas tales como piridina y dimetilaminopiridina; y aminas alifáticas tales como trimetilamina, trietilamina, y diisopropiletilamina. Las aminas alifáticas (especialmente, diisopropiletilamina) son preferibles.

- 5 Los ejemplos de alcoxifosfinas disustituidas usadas pueden incluir fosfinas tales como bis(diisopropilamino)cianoetoxifosfina, bis(diethylamino)metanosulfoniletoxifosfina, bis(diisopropilamino) (2,2,2-tricloroetoxi)fosfina, y bis(diisopropilamino)(4-clorofenilmetoxi)fosfina. Bis(diisopropilamino)cianoetoxifosfina es preferible.

Cuando se usan las alcoxifosfinas disustituidas, se usa un ácido. En este caso, el ácido usado es preferentemente tetrazol, ácido acético, o ácido p-toluenosulfónico.

- 10 La temperatura de reacción no está especialmente limitada, y es normalmente de 0 a 80 °C, preferentemente temperatura ambiente.

El tiempo de reacción difiere dependiendo de los materiales de partida, reactivos, temperatura, etc. utilizados, y es normalmente de 5 minutos a 30 horas, preferentemente de 30 minutos a 10 horas para la reacción a temperatura ambiente.

- 15 Después de completarse la reacción, se obtiene el compuesto (23) de interés en la presente reacción, por ejemplo, mediante: neutralización adecuada de la mezcla de reacción, o eliminación de la materia insoluble, en caso de haberlos, por filtración; a continuación, adición de agua y un disolvente orgánico inmiscible con agua tal como acetato de etilo; después de lavar con agua, separar la capa orgánica que contiene el compuesto de interés; secar la capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro o similar; y a continuación eliminar el disolvente por destilación.
- 20 El compuesto de interés obtenido se puede purificar adicionalmente, si es necesario, por un procedimiento convencional, por ejemplo, recristalización, reprecipitación, o cromatografía.

2-3-6-2 Etapa G-2

- 25 La presente etapa es la etapa de hacer reaccionar el compuesto (2) producido en la etapa A-1 con el compuesto (23) producido en la etapa G-1 según un procedimiento de fosforamidita habitual usando un sintetizador automático de ADN para producir un compuesto (24) (en el diagrama, W² representa un polinucleótido con hebra en sentido directo protegido sin grupos hidroxilo en el extremo 5' ni el extremo 3', W¹-Y representa un polinucleótido con hebra en sentido contrario protegido sin grupos hidroxilo en el extremo 5' ni el extremo 3', y Tr¹ representa un grupo protector del grupo hidroxilo).

- 30 Tr¹ no está especialmente limitado a condición de que sea un grupo protector del grupo hidroxilo que se puede desproteger sin eliminar el grupo protector del ácido nucleico. Los ejemplos de los mismos pueden incluir un grupo 4-metoxitritilo, un grupo 4,4'-dimetoxitritilo, un grupo pixilo, un grupo tritilo, un grupo levulinilo, y un grupo bis(trimetilsililo)(ciclohexiloxi)sililo. Es preferible un grupo 4-metoxitritilo o un grupo 4,4'-dimetoxitritilo.

- 35 El compuesto (24) se produce mediante un procedimiento de fosforamidita habitual usando un sintetizador automático de ADN. El análogo de oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos deseada se puede sintetizar de acuerdo con el procedimiento descrito en la literatura (Nucleic Acids Research, 12, 4539 (1984)) usando un sintetizador de ADN, por ejemplo, el modelo 392 (fabricado por PerkinElmer Inc.), que está basado en el procedimiento de la fosforamidita.

- 40 Además, cuando el análogo de nucleótido se convierte, si se desea, en la forma tioato, se puede obtener un derivado de tioato de acuerdo con los procedimientos descritos en la literatura (Tetrahedron Letters, 32, 3005 (1991); y J. Am. Chem. Soc., 112, 1253 (1990)) usando azufre o un reactivo tal como disulfuro de tetraetiluramo (TETD, Applied Biosystems), reactivo de Beaucage, o una solución de disulfuro de fenilacetilo/piridina-acetonitrilo (1:1 v/v) (Ravikumar, V.T. y col., Bioorg. Med. Chem. Lett. (2006) 16, págs. 2513-2517).

2-3-6-3 Etapa G-3

- 45 La presente etapa es la etapa de extirpar el compuesto (24) producido en la etapa G-2 del CPG y eliminar el grupo protector par producir un compuesto final (25) (en el diagrama, W^{2'} representa un polinucleótido con hebra en sentido directo sin grupos hidroxilo en el extremo 5' ni el extremo 3', y W^{1'}-Y' representa un polinucleótido con hebra en sentido contrario sin grupos hidroxilo en el extremo 5' ni el extremo 3').

- 50 Los ejemplos de la base usada pueden incluir agua con amoníaco concentrado, amoníaco metanólico, amoníaco etanólico, una solución mixta de agua con amoníaco concentrado-etanol (3:1 v/v), una solución mixta de agua con amoníaco concentrado al 40% con una solución acuosa de metilamina (1:1 v/v), metilamina, una solución acuosa de LiOH 0,5 M, y una solución mixta de trietilamina 3,5 M en metanol (1:10 v/v). Se prefiere agua con amoníaco concentrado, o una solución mixta de agua con amoníaco concentrado-etanol (3:1 v/v).

La temperatura de reacción no está especialmente limitada, y es normalmente de -50 a 80 °C, preferentemente de temperatura ambiente a 60°C.

El tiempo de reacción difiere dependiendo de los materiales de partida, reactivos, temperatura, etc. utilizados, y es normalmente de 5 minutos a 30 horas, preferentemente 5 horas para la reacción a 60 °C.

Cuando un compuesto que se obtiene mediante eliminación por destilación del disolvente después de completar la reacción se une a Tr¹, el compuesto se puede purificar por procedimientos de purificación, por ejemplo, diferentes técnicas de cromatografía tales como la cromatografía de fase invertida y la cromatografía de intercambio iónico (incluida la cromatografía de líquidos de alta resolución).

Cuando, por ejemplo, un grupo 4-metoxitritilo, un grupo 4,4'-dimetoxitritilo, un grupo pixilo, o un grupo tritilo, permanecen sin desprotegerse en condiciones básicas, Tr¹ se puede desproteger en condiciones ácidas de la misma forma que en etapa F-2. Las condiciones preferentemente implican una solución acuosa de ácido acético al 80%.

La mezcla de reacción que contiene el compuesto (25) así obtenido se puede purificar según los procedimientos de purificación habituales para purificar ácido nucleico, por ejemplo, diferentes técnicas de cromatografía tales como la cromatografía de fase invertida cromatografía y la cromatografía de intercambio iónico (incluida la cromatografía de líquidos de alta resolución) para obtener el compuesto (25).

Un 3L5-polinucleótido y un polinucleótido bicatenario que tienen un fosfato sin modificar en el extremo 3' de una hebra de sentido directo y un fosfato sin modificar en el extremo 5' de una hebra de sentido contrario se puede obtener con el presente procedimiento.

El 3L5-polinucleótido también incluya: un 3L5-polinucleótido que comprende un colesterol, lípido o unidad de vitamina E introducida en el mismo (véanse por ejemplo, Lorenz, C. y col. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, págs. 4975-4977 (2004); Soutschek, J., y col. *Nature*, 432, págs. 173-178, (2004); Wolfrum, C. y col. *Nature Biotech.* 25, págs. 1149-1157, (2007); Kubo, T. y col. *Oligonucleotides*, 17, págs. 1-20, (2007); Kubo, T., y col. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 365, págs. 54-61, (2008); y Nishina, K., y col., *Mol. Ther.* 16, págs. 734-740, (2008)); y un 3L5-polinucleótido unido en el extremo con un aptámero, una molécula de ácido nucleico de unión a proteína.

El 3L5-polinucleótido también incluye un 3L5-polinucleótido unido a un anticuerpo monoclonal (o un fragmento de unión adecuado del mismo) o una proteína (o un fragmento de oligopéptido adecuado de la misma) (véanse por ejemplo, Song, y col. *Nature Biotech.* 23, págs. 709-717 (2005); Xia y col. *Pharm. Res.* 24, págs. 2309-2316 (2007); y Kumar, y col. *Nature*, 448, págs. 39-43, 2007.

Además, el 3L5-polinucleótido también incluye un complejo cargado positivamente de un 3L5-polinucleótido suplementado con un polímero catiónico (véase, como ejemplos con éxito en conseguir su distribución en órganos y células, Leng y col. *J. Gen. Med.* 7, págs. 977-986 (2005); Baigude y col. 2, págs. 237-241, *ACS Chem. Biol.* (2007); y Yadava y col. *Oligonucleotide* 17, págs. 213-222, 2007.

El 3L5-polinucleótido incluye todas y cada una de las sales o ésteres farmacéuticamente aceptables del 3L5-polinucleótido, o sales de dichos ésteres.

Los ejemplos preferibles de la sal farmacéuticamente aceptable del 3L5-polinucleótido pueden incluir: sales de metal alcalino, tales como una sal sódica, una sal potásica, y una sal de litio, sales de metales alcalinotérreos, tales como una sal de calcio y una sal de magnesio, y sales metálicas tales como una sal de aluminio, una sal de hierro, una sal de cinc, una sal de cobre, una sal de níquel, y una sal de cobalto; sales de aminas incluidas sales inorgánicas tales como una sal de amonio y sales orgánicas tales como una sal de t-octilamina, una sal de bencilamina, una sal de morfolina, una sal de glucosamina, una sal de éster de alquilo de fenilglicina, una sal de etilendiamina, una sal de N-metilglucamina, una sal de guanidina, una sal de dietilamina, una sal de trietilamina, una sal de diciclohexilamina, una sal de N,N'-dibenciletilendiamina, una sal de cloroprocaína, una sal de procaína, una sal de dietanolamina, una sal de N-bencil-feniletilamina, una sal de piperazina, una sal de tetrametilamonio, una sal de tris(hidroximetil)aminometano; sales de ácido inorgánico, tales como halohidratos (por ejemplo, un fluorohidrato, un clorhidrato, un bromhidrato, y un yodhidrato), un nitrato, un perclorato, un sulfato, y un fosfato; sales de ácidos orgánicos tales como alcanosulfonatos inferiores (por ejemplo, un metanosulfonato, un trifluorometanosulfonato, y un etanosulfonato), arilsulfonatos (por ejemplo, un bencenosulfonato y un p-toluenosulfonato), un acetato, un malato, un fumarato, un succinato, un citrato, un tartrato, un oxalato y un maleato; y sales de aminoácidos, tales como una sal de glicina, una sal de lisina, una sal de arginina, una sal de ornitina, un glutamato y un aspartato.

Una composición que comprende el 3L5-polinucleótido se mezcla, encapsula, o conjuga con otra molécula, estructura molecular, o mezcla de compuestos, por ejemplo, como liposoma, una molécula de direccionamiento del receptor, una formulación oral, rectal o local, u otras formulaciones para ayudar en absorción, distribución, y/o absorción.

Cuando el 3L5-polinucleótido se utiliza como un fármaco preventivo o terapéutico para una enfermedad, el polinucleótido o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se puede administrar tanto por sí mismo o tras su mezcla con un excipiente farmacológicamente aceptable, diluyente, o similar, como formulación oral tales como comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos o jarabes, o como formulación parenteral tales como inyecciones, supositorios, parches, o preparaciones externas.

Estas preparaciones se producen por un procedimiento bien conocido usando aditivos tales como excipientes (sus ejemplos pueden incluir excipientes orgánicos entre los que se incluyen: derivados de azúcares, tales como lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y sorbitol; derivados de almidón tales como almidón de maíz, almidón de patata, α almidón, y dextrina; derivados de celulosa, tales como celulosa cristalina; goma arábiga; dextrano; y pululano, y excipientes inorgánicos entre los que se incluyen: derivados de silicato tales como ácido silícico anhidro ligero, silicato de aluminio sintético, silicato de calcio, y aluminometasilicato de magnesio; un fosfato tal como hidrogenofosfato de calcio; un carbonato tal como carbonato de calcio; y un sulfato tal como sulfato de calcio), lubricantes (los ejemplos de los mismos pueden incluir: sales metálicas de ácido esteárico, tal como ácido esteárico, estearato de calcio, y estearato de magnesio; talco; sílice coloidal; ceras tales como cera de abeja y esperma de ballena; ácido bórico; ácido adípico; un sulfato tal como sulfato de sodio; glicol; ácido fumárico; benzoato de sodio; DL leucina; un laurilsulfato tal como laurilsulfato de sodio y laurilsulfato de magnesio; ácidos silícicos, tales como ácido silícico anhidro e hidrato silícico; y los derivados de almidón anteriormente descritos), aglutinantes (los ejemplos de los mismos pueden incluir hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, macrogol, y los mismos compuestos que los excipientes), disgregantes (los ejemplos de los mismos pueden incluir: derivados de celulosa tales como hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa cálcica, y carboximetilcelulosa de sodio con puentes internos; y almidones/celulosas químicamente modificados tales como carboximetil almidón, carboximetil almidón de sodio, y polivinilpirrolidona con puentes), emulsionante (los ejemplos de los mismos pueden incluir: arcilla coloidal tal como bentonita y veegum; un hidróxido metálico tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; tensioactivos aniónicos tales como laurilsulfato de sodio y estearato de calcio; tensioactivos catiónicos tales como cloruro de benzalconio; y tensioactivos no iónicos tales como alquil éter polioxietilenado, ésteres de ácidos grasos de sorbitán polioxietilenado, y ésteres de ácidos grasos de sacarosa), estabilizantes (los ejemplos de los mismos pueden incluir: ésteres de ácido p-oxibenzoico tales como metilparabeno y propilparabeno; alcoholes tales como clorobutanol, alcohol bencílico, y alcohol fenilético; cloruro de benzalconio; fenoles tales como fenol y cresoles; timerosal; ácido dehidroacético; y ácido sórbico), correctores (los ejemplos de los mismos pueden incluir edulcorantes, acidulantes, y aromas que se utilizan habitualmente), y diluyentes.

3. Introducción del 3L5-polinucleótido en las células, tejidos o individuos, y regulación de la expresión del gen diana

Los receptores en los que se introduce el 3L5-polinucleótido así preparado no están especialmente limitados, a condición de que el gen diana se puede transcribir intracelularmente a ARN en su interior. Los receptores significan células, tejidos o individuos.

Las células en las que se usa el 3L5-polinucleótido pueden ser cualesquiera de células de la línea germinal, células somáticas, células totipotentes, células pluripotentes, células escindidas, células no escindidas, células parenquimales, células epiteliales, células inmortalizadas, células transformadas, células nerviosas, e inmunocitos.

Los tejidos incluyen embriones monocelulares o células constitutivas, o embriones poliploides, tejidos embrionarios, o similares. Además, los ejemplos de las células anteriormente diferenciadas incluyen adipocitos, fibroblastos, miocitos, cardiomiocitos, células endoteliales, células nerviosas, células gliales, células sanguíneas, megacariocitos, linfocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, leucocitos, granulocitos, queratinocitos, condrocitos, osteoblastos, osteoclastos, hepatocitos, y células endocrinas o exocrinas. Por ejemplo, células CHO-K1 (banco RIKEN Cell), células de *Drosophila* S2 (Schneider, I. y col., J. Embryol. Exp. Morph., 27, págs. 353-365, (1972)), células HeLa humanas (ATCC: CCL-2), o células HEK293 humanas (ATCC: CRL-1573) se utilizan preferentemente como dichas células.

Además, los ejemplos específicos de individuos utilizados como receptores del 3L5-polinucleótido incluyen plantas, animales, protozoos, virus, bacterias, y aquellos organismos que pertenecen a los *Eumycetes*. Las plantas pueden ser monocotiledóneas, dicotiledóneas, o gimnospermas. Los animales pueden ser vertebrados o invertebrados. Los vertebrados son preferentemente mamíferos que incluyen ratones, ratas, monos, perros y seres humanos.

Cuando los receptores son células o tejidos, un procedimiento de fosfato de calcio, electroporación, un procedimiento de lipofección, infección vírica, inmersión en una solución del 3L5-polinucleótido, o transformación, o similares, se utiliza como el procedimiento para introducir el 3L5-polinucleótido en receptores. Además, los ejemplos de los procedimientos de introducción en embriones incluyen microinyección, electroporación, e infección vírica. Cuando los receptores son plantas, se utiliza un procedimiento que implica la inyección o perfusión en las cavidades o células intersticiales o similares de las plantas o pulverización sobre las mismas. Además, para los animales individuales, se utiliza un procedimiento que implica la introducción sistémica a través de, por ejemplo, la administración oral, local, subcutánea, intramuscular, intravenosa, parenteral, transvaginal, rectal, nasal, ocular, o transmucosal, o mediante electroporación, infección vírica, o similar. También se puede usar un procedimiento en el que el 3L5-polinucleótido se mezcla directamente con una dieta de los organismos como procedimiento de introducción oral.

Además de estos enfoques, se puede utilizar un sistema de dispersión coloidal como procedimiento para introducir el 3L5-polinucleótido en pacientes.

Se espera que el sistema de dispersión coloidal tenga el efecto de potenciar la estabilidad *in-vivo* del compuesto o el efecto de transportar eficazmente el compuesto a órganos, tejidos o células concretos.

- El sistema de dispersión coloidal utilizado no está limitado, a condición de que se pueda aplicar de manera normal. Los ejemplos del mismo pueden incluir complejos poliméricos, nanocápsulas, microesferas, perlas, y emulsionante de agua en aceite, micelas, micelas mixtas, y sistemas de dispersión basados en lípidos, incluyendo liposomas. Preferentemente, el sistema de dispersión coloidal es una pluralidad de liposomas o vesículas de membrana artificial
- 5 que tienen el efecto de transportar eficazmente el compuesto a órganos, tejidos, o células concretos (Mannino y col., *Biotechniques*, 1988, 6, pág. 682-; Blume y Cevc, *Biochem. et Biophys. Acta*, 1990, 1029, pág. 91-; Lappalainen y col., *Antiviral Res.*, 1994, 23, pág. 119-; y Chonn y Cullis, *Current Op. Biotech.*, 1995, 6, pág. 698-).
- Los liposomas unilamelares comprendidos en un intervalo de tamaños de 0,2 a 0,4 μm son capaces de encapsular una considerable cantidad de un tampón acuoso que contiene macromoléculas, y los compuestos se encapsulan en esta membrana acuosa interna y se transportan en una forma biológicamente sustancia activa a las células del
- 10 cerebro (Fraley y col., *Trends Biochem. Sci.*, 1981, 6, págs. (77-80).
- La composición del liposoma suele ser un complejo de lípido, especialmente fosfolípidos, específicamente fosfolípidos que tienen una elevada temperatura de transición de fase, con uno o más esteroides, especialmente
- 15 colesteroles.
- Los ejemplos de lípidos útiles para la producción de liposomas incluyen los compuestos de fosfatidilo tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, esfingolípido, fosfatidiletanolamina, cerebrósido, y gangliósido.
- El diacilfosfatidilglicerol es especialmente útil, en el que el resto lipídico contiene de 14 a 18 átomos de carbono, y está saturado (desprovisto de cualesquiera dobles enlaces internos en la cadena de 14 a 18 átomos de carbono) y, en particular, contiene de 16 a 18 átomos de carbono.
- 20 Los fosfolípidos típicos abarcan fosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y disteroilfosfatidilcolina.
- El direccionamiento mediante el sistema de dispersión coloidal que incluye liposomas puede ser pasivo o activo.
- Dicho direccionamiento pasivo se consigue mediante el uso de la tendencia fundamental de los liposomas a distribuirse entre las células reticuloendoteliales de órganos que contienen sinusoides.
- Por otra parte, los ejemplos de direccionamiento activo pueden incluir enfoques de modificación de liposomas que implican la unión de ligandos concretos tales como proteína del revestimiento vírico (Morishita y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 1993, 90, pág. 8474-), anticuerpos monoclonales (o fragmentos de unión adecuados de los mismos), azúcares, glicolípidos, o proteínas (o fragmentos de oligopéptido adecuados de las mismas) a liposomas o
- 25 alterar la composición del liposoma para conseguir la distribución a tipos de órganos y células diferentes a los sitios de localización de origen natural.
- La superficie del sistema de dispersión coloidal se puede modificar de varias formas con fines de direccionamiento.
- En el sistema de administración dirigido liposómicamente, se puede incorporar un grupo lípido a la bicapa lipídica del liposoma para mantener los ligandos diana en asociación estrecha con la bicapa lipídica.
- Se pueden usar varios grupos enlazadores para unir la cadena lipídica a los ligandos diana.
- Los ligandos diana que se unen a moléculas de la superficie celular concretas que se encuentran predominantemente en las células deseadas para recibir la administración del 3L5-polinucleótido pueden ser, por
- 35 ejemplo, (1) hormonas, factores de crecimiento, o fragmentos de oligopéptido adecuados de los mismos, que se unen a receptores celulares concretos que se expresan predominantemente por las células que se desean para recibir la administración, o (2) anticuerpos policlonales o monoclonales o fragmentos adecuados de los mismos (por ejemplo, Fab o F(ab')₂) que se unen específicamente a epítomos antigénicos encontrados predominantemente en las
- 40 células diana.
- Dos o más agentes bioactivos también pueden incluirse y administrarse en un único liposoma.
- Un medicamento para mejorar la estabilidad intracelular del contenido y/o el direccionamiento puede añadirse adicionalmente al sistema de dispersión coloidal.
- La cantidad del 3L5-polinucleótido o sal farmacológicamente aceptable del mismo utilizada difiere dependiendo de los síntomas, edades, etc., 1 mg (preferentemente, 30 mg) como límite inferior hasta 2000 mg (preferentemente, 1500 mg) como el límite superior del polinucleótido o las sal por dosis para administración por vía oral, 0,5 mg (preferentemente, 5 mg) como el límite inferior hasta 500 mg (preferentemente, 250 mg) como el límite superior del polinucleótido o las sal por dosis para administración intravenosa o subcutánea, 0,5 mg (preferentemente, 5 mg) como el límite inferior hasta 500 mg (preferentemente, 250 mg) como el límite superior del polinucleótido o las sal por dosis para administración intratraqueal, o 0,05 mg (preferentemente, 0,5 mg) como el límite inferior hasta 10 mg (preferentemente, 5 mg) como el límite superior del polinucleótido o las sal por dosis para administración intraocular se administran preferentemente a un adulto de una a tres veces al día dependiendo de los síntomas. Como alternativa, un fármaco más seguro se administra preferentemente de una a tres veces a la semana dependiendo de los síntomas. Un fármaco mucho más seguro se administra preferentemente de una a tres veces al mes
- 50

dependiendo de los síntomas.

Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para administración local incluyen parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, trociscos, supositorios, pulverizadores, líquidos, y polvos.

Ejemplos

- 5 A partir de ahora en el presente documento, la presente invención se describirá más específicamente con referencia a los Ejemplos, Ejemplos de referencia, y Ejemplos de ensayo. Sin embargo, no se pretende que la presente invención esté limitada a los mismos. En los ejemplos siguientes, se llevaron a cabo procedimientos de ingeniería genética según los procedimientos descritos en "Molecular Cloning" [Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., publicado en 1989 por Cold Spring Harbor Laboratory Press] o de acuerdo con las instrucciones de los reactivos o kits comercialmente disponibles utilizados, salvo que se especifique otra cosa. La fórmula estructural de X en cada polinucleótido sintetizado en los ejemplos y el valor del peso molecular determinado para cada nucleótido medido en un espectrómetro de masas se relacionan en las Tablas 1 a 3.

(Ejemplo de Referencia 1)

- 15 Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1t}-H (SEQ ID NO: 1 del listado de secuencias) (CT-169)

CT-169 se sintetizó según un programa de síntesis de ARN en la escala de 0,2 µmol usando un sintetizador de ácido nucleico automático (fabricado por PerkinElmer Inc., sintetizador de ADN/ARN ABI modelo 394). Los disolventes, reactivos, y fosforamiditas se utilizaron en cada ciclo de síntesis en las mismas concentraciones que en la síntesis natural de los oligodesoxinucleótidos.

- 20 Cuando se utilizaron didexoxinucleósidos de fosforamidita, 5'-O-dimetoxitritil-6-N-benzoil-2'-deoxiadenosina-3'-O-(2-cianoetil N,N-diisopropil)fosforoamidita, 5'-O-dimetoxitritil-2-N-isobutiril-2'-desoxiguanosina-3'-O-(2-cianoetil N,N-diisopropil)fosforoamidita, 5'-O-dimetoxitritil-4-N-benzoil-2'-desoxicitidina-3'-O-(2-cianoetil N,N-diisopropil)fosforoamidita, y 5'-O-dimetoxitritilotimidina-3'-O-(2-cianoetil N,N-diisopropil)fosforoamidita se adquirieron de Proligo y se ajustaron adecuadamente para su uso.

- 25 Cuando se usaron 2'-O-metil nucleósidos de fosforoamidita, 5'-O-dimetoxitritil-6-N-benzoil-2'-O-metiladenosina-3'-O-(2-cianoetil N,N-diisopropil)fosforoamidita, 5'-O-dimetoxitritil-2-N-isobutiril-2'-O-metilguanosina-3'-O-(2-cianoetil N,N-diisopropil)fosforoamidita, 5'-O-dimetoxitritil-4-N-acetil-2'-O-metilcitidina-3'-O-(2-cianoetil N,N-diisopropil)fosforoamidita, y 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-metiluridina-3'-O-(2-cianoetil N,N-diisopropil)fosforoamidita se adquirieron de Glen Research Corp. y se ajustaron adecuadamente para su uso.

- 30 Cuando se utilizaron ribonucleósidos de fosforamidita, 5'-O-dimetoxitritil-6-N-benzoil-2'-O-(terc-butildimetilsilil)adenosina-3'-O-(2-cianoetil N,N-diisopropil)fosforoamidita, 5'-O-dimetoxitritil-2-N-dimetilformamida-2'-O-(terc-butildimetilsilil)guanosina-3'-O-(2-cianoetil N,N-diisopropil)fosforoamidita, 5'-O-dimetoxitritil-4-N-acetil-2'-O-(terc-butildimetilsilil)citidina-3'-O-(2-cianoetil N,N-diisopropil)fosforoamidita, y 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-(terc-butildimetilsilil)uridina-3'-O-(2-cianoetil N,N-diisopropil)fosforoamidita se adquirieron de Proligo y se ajustaron adecuadamente para su uso.

- 35 Cuando se usaron 2'-O,4'-C-etileno nucleósidos de fosforoamiditas, los compuestos del Ejemplo 14 (5'-O-dimetoxitritil-2'-O,4'-C-etilen-6-N-benzoiladenosina-3'-O-(2-cianoetil N,N-diisopropil)fosforoamidita), Ejemplo 27 (5'-O-dimetoxitritil-2'-O,4'-C-etilen-2-N-isobutirilguanosina-3'-O-(2-cianoetil N,N-diisopropil)fosforoamidita), Ejemplo 22 (5'-O-dimetoxitritil-2'-O,4'-C-etilen-4-N-benzoil-5-metilcitidina-3'-O-(2-cianoetil N,N-diisopropil)fosforoamidita), y Ejemplo 9 (5'-O-dimetoxitritil-2'-O,4'-C-etilen-5-metiluridina-3'-O-(2-cianoetil N,N-diisopropil)fosforoamidita) de la patente japonesa n.º 3420984 se prepararon adecuadamente para su uso.

Cuando cada polinucleótido tiene un resto grupo fosfato en el extremo 5', PHOSPHALINK (fabricado por Applied Biosystems) se ajustó adecuadamente para su uso.

- 45 Las fosforamiditas se suministraron en la forma debida al sintetizador de ácido nucleico automático para sintetizar un polinucleótido de la secuencia deseada. 0,5 µmol de CPG (vidrio de poro controlado; fabricado por Applied Biosystems o Glen Research Corp.) unido a los nucleósidos deseados se utilizó como transportador en fase sólida para sintetizar el polinucleótido del título. En la etapa final del sintetizador de ácido nucleico automático, no se llevó a cabo el tratamiento con ácido (el grupo dimetoxitritilo estaba unido al oligonucleótido). El presente polinucleótido se trató con amoniaco-agua y después se purificó mediante HPLC en fase invertida (LC-10VP fabricado por Shimadzu Corp., columna (Merck, Chromolith Performance RP-18e (4,6x100 mm)), Solución A: 5% acetonitrilo, solución acuosa de acetato de trietilamonio 0,1 M (TEAA), pH 7,0, Solución B: acetonitrilo, B%: 10%→60% (10 min, gradiente lineal); 60°C; 2 ml/min; 260 nm) para recoger los picos del producto de interés que tienen el grupo dimetoxitritilo. Se añadió agua a lo anterior, y el TEAA se eliminó mediante destilación a presión reducida. Cuando el grupo dimetoxitritilo estaba unido al anterior, se añadió al anterior una solución acuosa de ácido acético al 80% (2 ml), y la mezcla se dejó reposar durante 20 minutos para desproteger el grupo dimetoxitritilo. El disolvente se eliminó mediante destilación, y el residuo se disolvió en 500 µl de agua, se lavó con acetato de etilo, y se criodesecó para

obtener el oligonucleótido de interés. Además, si es necesario, los precipitados obtenidos se purificaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 20% que contenía urea 7 M urea (1x TBE, 600 V, 4 horas). Después de la electroforesis, las bandas se visualizaron con una lámpara UV, y las bandas de interés se recortaron con una cuchilla. 1 ml de una solución que contenía NaCl 0,2 M y EDTA 10 mM (pH 7,2) se añadió al anterior, y la mezcla se dejó reposar durante la noche para eluir el polinucleótido del gel de sílice. El oligonucleótido precipitó por la adición de etanol y se recogió mediante centrifugación. El peso molecular del presente polinucleótido se identificó mediante espectrometría de masas con ion negativo ESI.

Valor del peso molecular calculado: 5767,86, valor medido: 5767,78

Secuencia de nucleótidos: que comprende una secuencia de nucleótidos números 3139-3156 del gen de la β -catenina humana (n.º de registro GenBank NM_001904.3)

(Ejemplo 1)

Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-A^{m1p}-G^p-p^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-X-P(=O)(OH)-O-U^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-T^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (CT-437)

CT-437 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X.

CT-437 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo de referencia 1. Para el presente polinucleótido, el resto X se acopló con un reactivo preparado de X amidita preparado de la siguiente forma: el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 3 se disolvió en 2 ml de acetonitrilo:cloruro de metileno (1:1 v/v). A esta solución, se añadieron tetraisopropilfosforoamidita de 2-cianoetilo (74 μ l, 0,23 mmol) y 360 μ l de una solución 0,45 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo, y la mezcla se agitó durante 2 horas. El progreso de la reacción se confirmó mediante TLC, seguido por filtración en filtro para preparar el reactivo de amidita X. La estructura de CT-437 se muestra en la Figura 6.

(Ejemplo 2)

Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-p^{m1p}-X-P(=O)(OH)-O-U^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-T^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (CT-455)

CT-455 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 4.

CT-455 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-455 se muestra en la Figura 6.

(Ejemplo 3)

Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-X-P(=O)(OH)-O-U^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-T^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (CT-456)

CT-456 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 5.

CT-456 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-456 se muestra en la Figura 6.

(Ejemplo 4)

Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-X-P(=O)(OH)-O-U^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-T^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (CT-446)

CT-446 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 6.

CT-446 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-446 se muestra en la Figura 6.

(Ejemplo 5)

Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-X-P(=O)(OH)-O-U^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-T^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (CT-447)

CT-447 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 7.

CT-447 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-447 se muestra en la Figura 6.

(Ejemplo 6)

Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-X-P(=O) (OH)-O-U^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-T^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (CT-448)

CT-448 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 8.

CT-448 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-448 se muestra en la Figura 6.

(Ejemplo 7)

Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-X-P(=O) (OH)-O-U^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-T^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (CT-449)

CT-449 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 9.

CT-449 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-449 se muestra en la Figura 6.

(Ejemplo 8)

Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-X-P(=O) (OH)-O-U^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-T^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (CT-450)

CT-450 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 10.

CT-450 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-450 se muestra en la Figura 6.

(Ejemplo 9)

Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-X-P(=O) (OH)-Q-U^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-T^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (CT-451)

CT-451 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 11.

CT-451 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-451 se muestra en la Figura 6.

(Ejemplo 10)

Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-X-P(=O) (OH)-O-U^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-T^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (CT-452)

CT-452 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 12.

CT-452 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-452 se muestra en la Figura 6.

(Ejemplo 11)

Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-X-P(=O) (OH)-O-U^{m1p}-

TP-G^{m1p}-TP-G^{m1p}-AP-U^{m1p}-CP-C^{m1p}-AP-U^{m1p}-TP-C^{m1p}-TP-U^{m1p}-GP-U^{m1p}-GP-C^{m1p}-TP-U^{m1t}-H (CT-453)

CT-453 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 13.

- 5 CT-453 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-453 se muestra en la Figura 6.

(Ejemplo 12)

Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-AP-C^{m1p}-AP-A^{m1p}-GP-A^{m1p}-AP-U^{m1p}-GP-G^{m1p}-AP-U^{m1p}-CP-A^{m1p}-CP-A^{m1p}-X-P(=O) (OH)-Q-U^{m1p}-TP-G^{m1p}-TP-G^{m1p}-AP-U^{m1p}-CP-C^{m1p}-AP-U^{m1p}-TP-C^{m1p}-TP-U^{m1p}-GP-U^{m1p}-GP-C^{m1p}-TP-U^{m1t}-H (CT-454)

- 10 CT-454 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 14.

CT-454 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-454 se muestra en la Figura 6.

15 (Ejemplo 13)

Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-AP-C^{m1p}-AP-A^{m1p}-GP-A^{m1p}-AP-U^{m1p}-GP-G^{m1p}-AP-U^{m1p}-CP-A^{m1p}-CP-^{pm1p}-X-P(=O) (OH)-Q-U^{m1p}-TP-G^{m1p}-TP-G^{m1p}-AP-U^{m1p}-CP-C^{m1p}-AP-U^{m1p}-TP-C^{m1p}-TP-U^{m1p}-GP-U^{m1p}-GP-C^{m1p}-TP-U^{m1t}-H (CT-460)

CT-460 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 17.

- 20 CT-460 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-460 se muestra en la Figura 7.

(Ejemplo 14)

- 25 Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-AP-C^{m1p}-AP-A^{m1p}-GP-A^{m1p}-AP-U^{m1p}-GP-G^{m1p}-AP-U^{m1p}-CP-A^{m1p}-CP-A^{m1p}-X-P(=O) (OH)-O-U^{m1p}-TP-G^{m1p}-TP-G^{m1p}-AP-U^{m1p}-CP-C^{m1p}-AP-U^{m1p}-TP-C^{m1p}-TP-U^{m1p}-GP-U^{m1p}-GP-C^{m1p}-TP-U^{m1t}-H (CT-461)

CT-461 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 21.

- 30 CT-461 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-461 se muestra en la Figura 7.

(Ejemplo 15)

Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-AP-C^{m1p}-AP-A^{m1p}-GP-A^{m1p}-AP-U^{m1p}-GP-G^{m1p}-AP-U^{m1p}-CP-A^{m1p}-CP-^{pm1p}-X-P(=O) (OH)-Q-U^{m1p}-TP-G^{m1p}-TP-G^{m1p}-AP-U^{m1p}-CP-C^{m1p}-AP-U^{m1p}-TP-C^{m1p}-TP-U^{m1p}-GP-U^{m1p}-GP-C^{m1p}-TP-U^{m1t}-H (CT-462)

- 35 CT-462 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 22.

CT-462 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-462 se muestra en la Figura 7.

(Ejemplo 16)

- 40 Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-AP-C^{m1p}-AP-A^{m1p}-GP-A^{m1p}-AP-U^{m1p}-GP-G^{m1p}-AP-U^{m1p}-CP-A^{m1p}-CP-A^{m1p}-X-P(=O) (OH)-O-U^{m1p}-TP-G^{m1p}-TP-G^{m1p}-AP-U^{m1p}-CP-C^{m1p}-AP-U^{m1p}-TP-C^{m1p}-TP-U^{m1p}-GP-U^{m1p}-GP-C^{m1p}-TP-U^{m1t}-H (CT-463)

CT-463 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 23.

- 45 CT-463 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-463 se muestra en la Figura 7.

(Ejemplo 17)

Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-X-P(=O) (OH)-O-U^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-T^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (CT-464)

CT-464 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 26.

- 5 CT-464 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-464 se muestra en la Figura 11.

(Ejemplo 18)

10 Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-X-P(=O) (OH)-O-U^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-T^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (CT-465)

CT-465 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 24.

- 15 CT-465 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-465 se muestra en la Figura 11.

(Ejemplo 19)

Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-X-P(=O) (OH)-O-U^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-T^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (CT-466)

- 20 CT-466 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 25.

CT-466 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-466 se muestra en la Figura 11.

(Ejemplo 20)

25 Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-X-P(=O) (OH)-O-U^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-T^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (CT-467)

CT-467 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 27.

- 30 CT-467 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-467 se muestra en la Figura 11.

(Ejemplo 21)

Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-X-P(=O) (OH)-O-U^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-T^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (CT-468)

- 35 CT-468 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 28.

CT-468 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-468 se muestra en la Figura 11.

(Ejemplo 22)

40 Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-X-P(=O) (OH)-O-U^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-T^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (CT-469)

CT-469 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 29.

- 45 CT-469 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-469 se muestra en la Figura 11.

(Ejemplo 23)

Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-X-P(=O) (OH)-O-U^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-T^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (CT-470)

- 5 CT-470 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 30.

CT-470 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-470 se muestra en la Figura 11.

(Ejemplo 24)

- 10 Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-X-P(=O) (OH)-O-U^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-A^p-U^{m1p}-C^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-T^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (CT-471)

CT-471 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 31.

- 15 CT-471 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 2 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-471 se muestra en la Figura 11.

(Ejemplo 25)

Síntesis de HO-G^{rp}-C^{rp}-A^{rp}-C^{rp}-A^{rp}-G^{rp}-A^{rp}-A^{rp}-U^{rp}-G^{rp}-G^{rp}-A^{rp}-U^{rp}-C^{rp}-A^{rp}-C^{rp}-A^{rp}-U^{rp}-U^{rp}-X-P(=O) (OH)-O-U^{rp}-U^{rp}-G^{rp}-U^{rp}-G^{rp}-A^{rp}-U^{rp}-C^{rp}-C^{rp}-A^{rp}-U^{rp}-U^{rp}-C^{rp}-U^{rp}-U^{rp}-G^{rp}-U^{rp}-G^{rp}-C^{rp}-U^{rp}-U^{rt}-H (CT-472)

- 20 CT-472 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 14.

CT-472 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 3 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 4 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-472 se muestra en la Figura 13.

- 25 **(Ejemplo 26)**

Síntesis de HO-G^{rp}-C^{m1p}-A^{rp}-C^{m1p}-A^{rp}-A^{m1p}-G^{rp}-A^{m1p}-A^{rp}-U^{m1p}-G^{rp}-G^{m1p}-A^{rp}-U^{m1p}-C^{rp}-A^{m1p}-C^{rp}-A^{m1p}-A^{rp}-X-P(=O) (OH)-O-U^{m1p}-U^{rp}-G^{m1p}-U^{rp}-G^{m1p}-A^{rp}-U^{m1p}-C^{rp}-C^{m1p}-A^{rp}-U^{m1p}-U^{rp}-C^{m1p}-U^{rp}-U^{m1p}-G^{rp}-U^{m1p}-G^{rp}-C^{m1p}-U^{rp}-U^{rt}-H (CT-473)

CT-473 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 14.

- 30 CT-473 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 5 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 6 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de CT-473 se muestra en la Figura 13.

- 35 Las estructuras de los restos X de los polinucleótidos descritos en los Ejemplos 1 a 16 y los pesos moleculares de estos polinucleótidos se muestran en la Tabla 1. En la tabla, el grupo metileno del extremo de X está unido al extremo 3' del polinucleótido con hebra en sentido directo para formar un enlace fosfodiéster, mientras que el átomo de oxígeno unido al grupo fenilo está unido al extremo 5' del polinucleótido con hebra en sentido contrario para formar un enlace fosfodiéster.

[Tabla 1]

Ejemplo	Nombre	X	Peso molecular	Ejemplo	Nombre	X	Peso molecular
1	CT-437		12746,04	9	CT-451		12786,65
2	CT-455		12773,15	10	CT-452		12759,82
3	CT-456		12801,69	11	CT-453		12786,29
4	CT-446		12729,91	12	CT-454		12814,31
5	CT-447		12759,91	13	CT-460		12831,95
6	CT-448		12787,78	14	CT-461		12901,92
7	CT-449		12730,76	15	CT-462		12903,12
8	CT-450		12759,76	16	CT-463		12889,32

Las estructuras de los restos X de los polinucleótidos descritos en los Ejemplos 17 a 26 y los pesos moleculares de estos polinucleótidos se muestran en la Tabla 2. En la tabla, el grupo metileno del extremo de X está unido al extremo 3' del polinucleótido con hebra en sentido directo para formar un enlace fosfodiéster, mientras que el átomo de oxígeno unido al grupo fenilo está unido al extremo 5' del polinucleótido con hebra en sentido contrario para

4,4'-dimetoxitritilo (237 mg, 0,7 mmol), y la mezcla se agitó durante una noche. La finalización de la reacción se confirmó mediante TLC. A continuación, la solución de reacción se separó en las fases orgánica y acuosa usando cloruro de metileno y agua. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio, y el disolvente se concentró a continuación a presión reducida. El residuo se purificó con una columna de gel de sílice (4 g, cloruro de metileno) para obtener un ácido 8-(4,4'-dimetoxitritilooxi)octanoico amorfo (348 mg). El ácido 8-(4,4'-dimetoxitritilooxi)octanoico obtenido se disolvió en 1 ml de cloruro de metileno. A la solución, se añadieron 4-aminofenol (70,9 mg, 0,64 mmol), EDCI (101,6 mg, 0,88 mmol), HOBT (79 mg, 0,886 mmol), y trietilamina (92 µl), y la mezcla se agitó durante una noche. La finalización de la reacción se confirmó mediante TLC. A continuación, la solución de reacción se purificó con una columna de gel de sílice (5 g, acetato de etilo 30%→50%/n-hexano) para obtener el compuesto amorfo (148 mg).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,52-6,59 (17H, m), 3,79 (6H, s), 3,05-3,01 (2H, m), 2,31-2,27 (2H, m), 1,71-1,58 (4H, m), 1,35-1,24 (6H, m)
FAB-MAS (mNBA+KI): 592 (M+K)⁺

(Ejemplo de Referencia 5)

El ácido 10-(4,4'-dimetoxitritilooxi)decanoico (0,707 g, 1,19 mmol; Tetrahedron Letters, 1994, 35, 2353-2356) se disolvió en 2 ml de cloruro de metileno. A la solución, se añadieron 4-aminofenol (141,8 mg, 1,28 mmol), EDCI (203 mg, 1,76 mmol), HOBT (158 mg, 1,76 mmol), y trietilamina (183 µl), y la mezcla se agitó durante una noche. La finalización de la reacción se confirmó mediante TLC.

A continuación, la solución de reacción se purificó con una columna de gel de sílice (7,5 g, acetato de etilo 30%→50%/n-hexano) para obtener el compuesto amorfo (485 mg).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,52-6,59 (17H, m), 3,78 (6H, s), 3,04-3,01 (2H, m), 2,32-2,29 (2H, m), 1,74-1,56 (4H, m), 1,33-1,24 (10H, m)
FAB-MAS (mNBA): 580 (M-H)⁺

(Ejemplo de Referencia 6)

Una solución de EDC (383 mg, 2 mmol) y HOBT (67,5 mg, 0,5 mmol) disuelto en 3 ml de cloruro de metileno se añadió a 4-amino-1-butanol (160,45 mg, 1,8 mmol) y ácido 4-hidroxibenzoico (207,18 mg, 1,5 mmol). Se añadió más cantidad de trietilamina (260 µl) a lo anterior, y la mezcla se agitó durante la noche. La finalización de la reacción se confirmó mediante TLC. A continuación, la solución de reacción se purificó con una columna de gel de sílice (5 g, elución con cloruro de metileno-acetato de metilo) para obtener un compuesto de amida en forma oleosa (0,20 g). Este compuesto se disolvió en 1,5 ml de piridina. A la solución, se añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (500 mg, 1,5 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La finalización de la reacción se confirmó mediante TLC. A continuación, 0,5 ml de metanol se añadieron a lo anterior, y la solución de reacción se separó en fases orgánica y acuosa usando acetato de etilo y una solución acuosa de bicarbonato de sodio al 5%. El disolvente de la fase orgánica se concentra a presión reducida. El residuo se purificó con una columna de gel de sílice (10 g, acetato de etilo 40%→50%/n-hexano) para obtener el compuesto amorfo (325 mg). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,70-6,78 (17H, m), 6,11 (1H, s a), 5,69 (1H, s), 3,78 (6H, s), 3,44-3,41 (2H, m), 3,13-3,10 (2H, m), 1,70-1,69 (4H, m)
FAB-MAS (mNBA): 511 M⁺

(Ejemplo de Referencia 7)

El compuesto amorfo se obtuvo (445 mg) mediante síntesis de la misma forma que el Ejemplo de referencia 6 usando 6-amino-1-hexanol (210,94 mg, 1,8 mmol) y ácido 4-hidroxibenzoico (207,18 mg, 1,5 mmol). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,67-6,79 (17H, m), 5,97 (1H, s a), 5,56 (1H, s), 3,78 (6H, s), 3,43-3,38 (2H, m), 3,06-3,02 (2H, m), 1,63-1,55 (4H, m), 1,45-1,34 (4H, m)
FAB-MAS (mNBA): 539 M⁺

(Ejemplo de Referencia 8)

El compuesto amorfo se obtuvo (486 mg) mediante síntesis de la misma forma que el Ejemplo de referencia 6 usando 8-amino-1-octanol (261,43 mg, 1,8 mmol) y ácido 4-hidroxibenzoico (207,18 mg, 1,5 mmol). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,68-6,80 (17H, m), 5,98 (1H, s a), 5,54 (1H, s), 3,79 (6H, s), 3,44-3,39 (2H, m), 3,04-3,01 (2H, m), 1,62-1,55 (4H, m), 1,34-1,24 (8H, m)
FAB-MAS (mNBA): 567 M⁺

(Ejemplo de Referencia 9)

El compuesto amorfo se obtuvo (566 mg) mediante síntesis de la misma forma que el Ejemplo de referencia 6 usando 4-amino-1-butanol (160,45 mg, 1,8 mmol) y ácido 3-hidroxibenzoico (207,18 mg, 1,5 mmol). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,52-6,79 (17H, m), 6,25 (1H, s a), 6,06 (1H, s), 3,78 (6H, s), 3,47-3,47-3,42 (2H, m), 3,15-3,12 (2H, m), 1,72-1,66 (4H, m)
FAB-MAS (mNBA): 511 M⁺

(Ejemplo de Referencia 10)

El compuesto amorfo se obtuvo (580 mg) mediante síntesis de la misma forma que el Ejemplo de referencia 6 usando 6-amino-1-hexanol (210,94 mg, 1,8 mmol) y ácido 3-hidroxibenzoico (207,18 mg, 1,5 mmol).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,52-6,80 (17H, m), 6,08 (1H, s a), 6,04 (1H, s), 3,78 (6H, s), 3,45-3,40 (2H, m), 3,06-3,03 (2H, m), 1,65-1,56 (4H, m), 1,45-1,34 (4H, m)

5 FAB-MAS (mNBA): 539 M⁺

(Ejemplo de Referencia 11)

El compuesto amorfo se obtuvo (675 mg) mediante síntesis de la misma forma que el Ejemplo de referencia 6 usando 8-amino-1-octanol (261,43 mg, 1,8 mmol) y ácido 3-hidroxibenzoico (207,18 mg, 1,5 mmol).

10 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,52-6,80 (17H, m), 6,21 (1H, s a), 6,11 (1H, s), 3,78 (6H, s), 3,46-3,41 (2H, m), 3,04-3,01 (2H, m), 1,63-1,58 (4H, m), 1,39-1,33 (8H, m)

FAB-MAS (mNBA): 566 (M-H)⁺

(Ejemplo de Referencia 12)

El compuesto amorfo se obtuvo (540 mg) mediante síntesis de la misma forma que el Ejemplo de referencia 6 usando 4-amino-1-butanol (160,45 mg, 1,8 mmol) y ácido 3-(4-hidroxifenil)propionico (249,26 mg, 1,5 mmol). RMN

15 ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,52-6,68 (17H, m), 5,37 (1H, s a), 4,87 (1H, s), 3,79 (6H, s), 3,21-3,16 (2H, m), 3,06-3,03 (2H, m), 2,86 (2H, t, J = 7,56Hz), 2,35 (2H, t, J = 7,56Hz), 1,54-1,48 (4H, m)

FAB-MAS (mNBA): 540 (M+H)⁺

(Ejemplo de Referencia 13)

El compuesto amorfo se obtuvo (559 mg) mediante síntesis de la misma forma que el Ejemplo de referencia 6 usando 6-amino-1-hexanol (210,94 mg, 1,8 mmol) y ácido 3-(4-hidroxifenil)propionico (249,26 mg, 1,5 mmol). RMN

20 ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,44-6,70 (17H, m), 5,21 (1H, s a), 5,03 (1H, s), 3,79 (6H, s), 3,18-3,13 (2H, m), 3,05-3,02 (2H, m), 2,87 (2H, t, J = 7,33Hz), 2,39 (2H, t, J = 7,56Hz), 1,59-1,13 (8H, m)

FAB-MAS (mNBA): 568 (M+H)⁺

(Ejemplo de Referencia 14)

El compuesto que tenía una consistencia de caramelo masticable se obtuvo (720 mg) mediante síntesis de la misma forma que para el Ejemplo de referencia 6 usando 8-amino-1-octanol (261,43 mg, 1,8 mmol) y ácido 3-(4-hidroxifenil)propionico (249,26 mg, 1,5 mmol).

25 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,52-6,71 (17H, m), 5,26 (1H, s a), 5,10 (1H, s), 3,78 (6H, s), 3,20-3,15 (2H, m), 3,05-3,01 (2H, m), 2,88 (2H, t, J = 7,56Hz), 2,41 (2H, t, J = 7,56Hz), 1,62-1,17 (12H, m)

30 FAB-MAS (mNBA): 594 (M-H)⁺

(Ejemplo de Referencia 15)

Éster etílico de N-(4-metoxitritilo)-L-tirosina

35 Etil L-tirosina (418 mg, 2 mmol) 5 ml de piridina. A la solución, se añadió cloruro de 4-metoxitritilo (741 mg, 2,4 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. La finalización de la reacción se confirmó mediante TLC. A continuación, la solución de reacción se separó en fases orgánica y acuosa usando acetato de etilo y una solución acuosa de bicarbonato de sodio al 5%. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio, y el disolvente se concentró a continuación a presión reducida. El residuo se purificó con una columna de gel de sílice (30 g, acetato de etilo 30%/n-hexano) para obtener el compuesto amorfo (687 mg).

40 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,42-6,72 (18H, m), 4,69 (1H, s), 3,76 (3H, s), 3,53-3,33 (3H, m), 2,94-2,81 (2H, m), 2,58 (1H, d), 0,88-0,85 (3H, m)

FAB-MAS (mNBA): 482 (M+H)⁺

(Ejemplo de Referencia 16)

Ácido 3-(4-metoxitritiloxi)-2-acetilamino-propiónico (Ac-Ser(MMTr)-OH)

45 N-acetil-D,L-serina (1,775 g, 12 mmol) se disolvió en 20 ml de piridina. A la solución, se añadió 4-metoxitritilo (4,1 g, 13,2 mmol), y la mezcla se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. La finalización de la reacción se confirmó mediante TLC. A continuación, la solución de reacción se separó en fases orgánica y acuosa usando acetato de etilo y una solución acuosa de bicarbonato de sodio al 5%. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio, y el disolvente se concentró a continuación a presión reducida. El residuo se purificó con una columna de gel de sílice (120 g, acetona al 30%/n-hexano) para obtener el compuesto amorfo (3,93 g).

50 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,41-6,81 (14H, m), 6,15 (1H, d, J = 7,33Hz), 4,70-4,66 (1H, m), 3,78 (3H, s), 3,77-3,73 (1H, m), 3,42-3,38 (1H, m), 2,02 (3H, s)

FAB-MAS (mNBA): 419 M⁺

(Ejemplo de Referencia 17)

Ac-Ser(MMTr)-Tyr-OEt

El compuesto del Ejemplo de referencia 16 (629 mg, 1,5 mmol Ac-Ser(MMTr)-OH) se disolvió en 3 ml de cloruro de metileno. A la solución, se añadieron etil L-tirosina (334 mg, 1,6 mmol), EDCI (383 mg, 2 mmol), HOBT (67,5 mg, 0,5 mmol), y trietilamina (260 µl), y la mezcla se agitó durante 4 horas. La solución de reacción se purificó con una columna de gel de sílice (15 g, acetato de etilo 40%→50%/n-hexano) para obtener el compuesto amorfo (460 mg).
 5 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,40-6,61 (18H, m), 6,11-6,06 (1H, m), 4,87-4,77 (1H, m), 4,56-4,48 (1H, m), 4,19-4,05 (2H, m), 3,79, 3,78 (3H, ds), 3,73-3,59 (1H, m), 3,19-2,96 (3H, m), 1,93, 1,91 (1H, ds), 1,28-1,22 (3H, m)
 FAB-MAS (mNBA): 611 (M+H)⁺

(Ejemplo de Referencia 18)

10 t-Boc-βAla-Tyr-OEt

El compuesto amorfo se obtuvo (497 mg) mediante síntesis de la misma forma que para el Ejemplo de referencia 17 usando N-t-Boc-β-alanina (283 mg, 1,5 mmol, t-Boc-βAla-OH) y etil L-tirosina (376 mg, 1,8 mmol, H-Tyr-OEt). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 6,97-6,74 (4H, m), 6,03 (1H, s a), 5,11 (1H, s a), 4,80 (1H, c, J = 6,72Hz), 4,22-4,15 (2H, m), 3,37-3,36 (2H, m), 3,10-3,01 (2H, m), 2,38 (2H, m), 1,41 (9H, s), 1,29-1,23 (3H, m)
 15 FAB-MAS (mNBA): 381 (M+H)⁺

(Ejemplo de Referencia 19)

t-Boc-Ala-Tyr-OEt

El compuesto amorfo se obtuvo (490 mg) mediante síntesis de la misma forma que para el Ejemplo de referencia 17 usando N-t-Boc-alanina (283 mg, 1,5 mmol, t-Boc-Ala-OH) y etil L-tirosina (376 mg, 1,8 mmol).
 20 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 6,98-6,71 (4H, m), 6,49 (1H, d), 5,16 (1H, s), 4,95-4,76 (1H, m), 4,20-4,13 (3H, m), 3,11-2,99 (2H, m), 1,41 (9H, s), 1,33, 1,31 (3H, ds), 1,28-1,21 (3H, m)
 FAB-MAS (mNBA): 381 (M+H)⁺

(Ejemplo de Referencia 20)

t-Boc-Gly-Tyr-OEt

El compuesto amorfo se obtuvo (434 mg) mediante síntesis de la misma forma que para el Ejemplo de referencia 17 usando N-t-Boc-glicina (263 mg, 1,5 mmol) y etil L-tirosina (376 mg, 1,8 mmol).
 25 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 6,98-6,72 (4H, m), 6,46 (1H, d), 5,06 (1H, s a), 4,84-4,79 (1H, m), 4,21-4,13 (2H, m), 3,85-3,72 (2H, m), 3,10-3,01 (2H, m), 1,41 (9H, s), 1,29-1,24 (3H, m), 1,28-1,21 (3H, m)
 FAB-MAS (mNBA): 367 (M+H)⁺

30 **(Ejemplo de Referencia 21)**

Ac-Ser(MMTr)-βAla-Tyr-OEt

El compuesto obtenido en el Ejemplo de referencia 18 (490 mg, 1,29 mmol) se disolvió en 4 ml de cloruro de metileno. A la solución, se añadieron 4 ml de TFA, y la mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, el disolvente se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en cloruro de metileno (3 ml) y trietilamina (260 µl). A la solución, se añadieron el compuesto obtenido en el Ejemplo de referencia 16 (544 mg, 1,3 mmol), EDC (383 mg, 2 mmol), HOBT (67,5 mg, 0,5 mmol), y trietilamina (260 µl), y la mezcla se agitó durante una noche. La solución de reacción se purificó con una columna de gel de sílice (20 g, acetato de etilo al 80%/n-hexano→acetato de metilo) para obtener el compuesto amorfo (469 mg).
 35 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,41-6,71 (18H, m), 4,91-4,75 (1H, m), 4,54-4,44 (1H, m), 4,26-4,15 (2H, m), 3,78 (3H, s), 3,46-2,20 (8H, m), 2,02, 1,98 (3H, ds), 1,34-1,24 (3H, m)
 40 FAB-MAS (mNBA): 682 (M+H)⁺

(Ejemplo de Referencia 22)

Ac-Ser(MMTr)-Ala-Tyr-OEt

El compuesto en una forma sólida de color blanco se obtuvo (448 mg) mediante síntesis de la misma forma que para el Ejemplo de referencia 21 usando el compuesto del Ejemplo de referencia 19 (485 mg, 1,26 mmol) y el compuesto obtenido en el Ejemplo de referencia 16 (544 mg, 1,3 mmol).
 45 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,41-6,49 (18H, m), 4,81-4,71 (1H, m), 4,56-4,43 (2H, m), 4,21-4,11 (2H, m), 3,79, 3,78 (3H, ds), 3,46-2,83 (4H, m), 2,01, 1,94 (3H, ds), 1,37-1,17 (6H, m)
 FAB-MAS (mNBA): 682 (M+H)⁺

50 **(Ejemplo de Referencia 23)**

Ac-Ser(MMT r)-Gly-Tyr-OEt

El compuesto en una forma sólida de color blanco se obtuvo (486 mg) mediante síntesis de la misma forma que para el Ejemplo de referencia 21 usando el compuesto obtenido en el Ejemplo de referencia 20 (430 mg, 1,17 mmol) y el compuesto obtenido en el Ejemplo de referencia 16 (544 mg, 1,3 mmol).

- 5 RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) 9,22 (1H, s), 8,41-8,34 (1H, m), 8,24-8,20 (1H, m), 8,08-8,05 (1H, m), 7,38-6,63 (18H, m), 4,62-4,58 (1H, m), 4,39-4,33 (1H, m), 4,04-3,97 (2H, m), 3,92-3,61 (2H, m), 3,74 (3H, s), 3,09-3,08 (1H, m), 2,86-2,50 (1H, m), 1,85 (3H, s), 1,11-1,06 (3H, m)
FAB-MAS (mNBA): 668 (M+H)⁺

(Ejemplo de Referencia 24)

- 10 El compuesto amorfo se obtuvo (568 mg) mediante síntesis de la misma forma que para el Ejemplo de referencia 6 usando 10-amino-1-decanol (260 mg, 1,5 mmol) y ácido 4-hidroxibenzoico (299 mg, 1,8 mmol).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,67-6,80 (17H, m), 6,01-5,99 (2H, m), 3,78 (6H, s), 3,45-3,40 (2H, m), 3,02 (2H, t, J = 6,64 Hz), 1,63-1,24 (14H, m)
FAB-MAS (mNBA): 595 M⁺

(Ejemplo de Referencia 25)

- 15 El compuesto que tenía una consistencia de caramelo masticable se obtuvo (411 mg) mediante síntesis de la misma forma que para el Ejemplo de referencia 6 usando 10-amino-1-decanol (260 mg, 1,5 mmol) y ácido 3-(4-hidroxifenil)propionico (249 mg, 1,8 mmol).

- 20 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,45-6,71 (17H, m), 5,27 (1H, s a), 5,03 (1H, s), 3,79 (6H, s), 3,21-3,16 (2H, m), 3,03 (2H, t, J = 6,64 Hz), 2,88 (2H, t, J = 7,56 Hz), 2,41 (2H, t, J = 7,56 Hz), 1,62-1,17 (14H, m)
FAB-MAS (mNBA): 646 (M+Na)⁺

(Ejemplo de Referencia 26)

El compuesto que tenía una consistencia de caramelo masticable se obtuvo (489 mg) mediante síntesis de la misma forma que para el Ejemplo de referencia 6 usando 8-amino-1-octanol (218 mg, 1,5 mmol) y ácido (4-hidroxifenoxi)acético (303 mg, 1,8 mmol).

- 25 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,45-6,74 (17H, m), 6,56 (1H, s a), 4,95 (1H, s), 4,46 (2H, s), 3,79 (6H, s), 3,34-3,29 (2H, m), 3,03 (2H, t, J = 6,64 Hz), 1,63-1,24 (12H, m)
FAB-MAS (mNBA): 596 (M-H)⁺

(Ejemplo de Referencia 27)

- 30 El compuesto que tenía una consistencia de caramelo masticable se obtuvo (579 mg) mediante síntesis de la misma forma que para el Ejemplo de referencia 6 usando 10-amino-1-decanol (260 mg, 1,5 mmol) y ácido (4-hidroxifenoxi)acético (303 mg, 1,8 mmol).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,45-6,75 (17H, m), 6,56 (1H, s a), 5,02 (1H, s), 4,42 (2H, s), 3,79 (6H, s), 3,35-3,30 (2H, m), 3,03 (2H, t, J = 6,64 Hz), 1,63-1,24 (14H, m)
FAB-MAS (mNBA): 624 (M-H)⁺

- 35 (Ejemplo de Referencia 28)

El compuesto amorfo se obtuvo (520 mg) mediante síntesis de la misma forma que para el Ejemplo de referencia 6 usando (PEO)₃-monoamina (CHEM-IPEX INTERNATIONAL, 224 mg, 1,5 mmol) y ácido 4-hidroxibenzoico (299 mg, 1,8 mmol).

- 40 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,58-6,64 (17H, m), 6,61 (1H, s a), 5,81 (1H, s), 3,78 (6H, s), 3,71-3,60 (10H, m), 3,23 (2H, t, J = 5,27 Hz)
FAB-MAS (mNBA): 571 M⁺

(Ejemplo de Referencia 29)

El compuesto que tiene una consistencia de caramelo masticable se obtuvo (543 mg) mediante síntesis de la misma forma que para el Ejemplo de referencia 6 usando (PEO)₃-monoamina (CHEM-IPEX INTERNATIONAL, 224 mg, 1,5 mmol) y ácido 3-(4-hidroxifenil)propionico (249 mg, 1,8 mmol).

- 45 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,46-6,68 (17H, m), 5,88 (1H, s a), 5,30 (1H, s), 3,77 (6H, s), 3,67-3,64 (4H, m), 3,58-3,56 (2H, m), 3,51-3,47 (2H, m), 3,43-3,38 (2H, m), 3,26-3,23 (2H, m), 2,83-2,81 (2H, m), 2,27 (2H, t, J = 7,79 Hz)
FAB-MAS (mNBA): 622 (M+Na)⁺

(Ejemplo de Referencia 30)

- 50 El compuesto que tiene una consistencia de caramelo masticable se obtuvo (471 mg) mediante síntesis de la misma forma que para el Ejemplo de referencia 6 usando (PEO)₃-monoamina (CHEM-IPEX INTERNATIONAL, 224 mg, 1,5 mmol) y ácido (4-hidroxifenoxi)acético (303 mg, 1,8 mmol).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,52-6,68 (18H, m), 5,05 (1H, s), 4,39 (2H, s), 3,78 (6H, s), 3,67-3,51 (10H, m), 3,23 (2H, t, J = 5,27 Hz)

FAB-MAS (mNBA): 600 (M-H)⁺

(Ejemplo de Referencia 31)

El compuesto amorfo se obtuvo (358 mg) mediante síntesis de la misma forma que para el Ejemplo de referencia 6 usando 8-amino-1-octanol (218 mg, 1,5 mmol) y N-[(9H-fluoreno-9-ilmetoxi)carbonil]-L-tirosina (N-Fmoc-L-tirosina, 726 mg, 1,8 mmol).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,77-6,71 (25H, m), 5,46 (1H, s a), 5,39 (1H, s a), 5,06 (1H, s), 4,43-4,18 (4H, m), 3,78 (6H, s), 3,12-3,02 (6H, m), 1,62-1,12 (12H, m)

FAB-MAS (mNBA): 833 M⁺

(Ejemplo de Referencia 32)

- 10 Síntesis de HO-G^{TP}-C^{TP}-A^{TP}-C^{TP}-A^{TP}-A^{TP}-G^{TP}-A^{TP}-A^{TP}-U^{TP}-G^{TP}-G^{TP}-A^{TP}-U^{TP}-C^{TP}-A^{TP}-C^{TP}-A^{TP}-A^{TP}-U^{TP}-U^{TP}-H (SEQ ID NO: 7 del listado de secuencias) (CT-106)

CT-106 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo de referencia 1. Sin embargo, el análogo de polinucleótido protegido que tiene la secuencia de interés se trató con 2 ml de una solución de amoníaco-agua:etanol (3:1 v/v) a 55°C durante 16 horas para extirpar el oligómero del soporte y eliminar el grupo cianoetilo que actúa como grupo protector del grupo fosfato y el grupo protector de la nucleobase. El CPG se eliminó mediante filtración. Después de lavar con etanol, el filtrado y el lavado se combinaron, y el disolvente se eliminó mediante destilación a presión reducida. Al residuo, se añadieron 0,3 ml de trifluorohidrato de trietilamina y la mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 19 horas, seguido de purificación. La estructura de CT-106 se muestra en la Figura 13.

Peso molecular: valor calculado: 6727,16, valor medido: 6726,73

- 20 Secuencia de nucleótidos: que comprende una secuencia de nucleótidos números 3139-3157 del gen de la β-catenina humana (n.º de registro GenBank NM_001904.3)

(Ejemplo de Referencia 33)

Síntesis de HO-U^{TP}-U^{TP}-G^{TP}-U^{TP}-G^{TP}-A^{TP}-U^{TP}-C^{TP}-C^{TP}-A^{TP}-U^{TP}-U^{TP}-C^{TP}-U^{TP}-U^{TP}-G^{TP}-U^{TP}-G^{TP}-C^{TP}-U^{TP}-U^{TP}-H (SEQ ID NO: 8 del listado de secuencias) (CT-041)

- 25 CT-041 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo de referencia 32. La estructura de CT-041 se muestra en la Figura 13.

Peso molecular: valor calculado: 6565,88, valor medido: 6565,34

Secuencia de nucleótidos: que comprende una secuencia complementaria a los nucleótidos números 3139-3157 del gen de la β-catenina humana (n.º de registro GenBank NM_001904.3)

- 30 **(Ejemplo de referencia 34) CT-001**

Síntesis de HO-G^{TP}-C^{m1p}-A^{TP}-C^{m1p}-A^{TP}-A^{m1p}-G^{TP}-A^{m1p}-A^{TP}-U^{m1p}-G^{TP}-G^{m1p}-A^{TP}-U^{m1p}-C^{TP}-A^{m1p}-C^{TP}-A^{m1p}-A^{TP}-T^p-T^L-H (SEQ ID NO: 9 del listado de secuencias) (CT-001)

CT-001 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo de referencia 32. La estructura de CT-001 se muestra en la Figura 13.

- 35 Peso molecular: valor calculado: 6849,46, valor medido: 6850,8

Secuencia de nucleótidos: que comprende una secuencia de nucleótidos números 3139-3157 del gen de la β-catenina humana (n.º de registro GenBank NM_001904.3)

(Ejemplo de referencia 35) CT-005

Síntesis de HO-

- 40 U^{m1p}-U^{TP}-G^{m1p}-U^{TP}-G^{m1p}-A^{TP}-U^{m1p}-C^{TP}-C^{m1p}-A^{TP}-U^{m1p}-U^{TP}-C^{m1p}-U^{TP}-U^{m1p}-G^{TP}-U^{m1p}-G^{TP}-C^{m1p}-T^p-T^L-H (SEQ ID NO: 10 del listado de secuencias) (CT-005)

CT-005 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo de referencia 32. La estructura de CT-005 se muestra en la Figura 13.

Peso molecular: valor calculado: 6702,20, valor medido: 6702,2

- 45 Secuencia de nucleótidos: que comprende una secuencia complementaria a los nucleótidos números 3139-3157 del gen de la β-catenina humana (n.º de registro GenBank NM_001904.3)

Las estructuras de los compuestos descritos en los Ejemplos de referencia 3 a 14, 17, y 21 a 23 se muestran en la Figura 5. Las estructuras de los compuestos descritos en los Ejemplos de referencia 24 a 31 se muestran en la Figura 10.

(Ejemplo 27) Hibridación para la formación de la estructura bicatenaria

Cada una de las hebras de sentido directo y de sentido contrario se introdujo en las combinaciones de los Ejemplos de referencia 1 y 2 anteriores en un tubo a concentraciones de 300 pmol y se secaron a presión reducida. 30 µl de un tampón de suspensión de ARNip (QIAGEN) se añadieron a lo anterior, y la mezcla se calentó a 65°C durante 1 minuto y a continuación se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos para hibridación de las hebras de sentido directo y de sentido contrario para obtener una solución 10 µM de polinucleótido bicatenario.

Cada polinucleótido bicatenario se puede indicar solamente por la combinación de las hebras de sentido directo y de sentido contrario, es decir, por ejemplo, el polinucleótido bicatenario que consiste en la combinación CT-169/CT-157 se puede denominar simplemente como "CT169/CT157" o "CT169/157".)

Los polinucleótidos bicatenarios y los 3L5-polinucleótidos en los que el extremo 5' de la hebra de sentido contrario y el extremo 3' de la hebra de sentido directo están unidos mediante un enlazador a través de enlaces fosfodiéster se pueden obtener según los presentes procedimientos, como se muestra en las Tablas 6 y 7.

(Ejemplo de ensayo 1)

La intensidad de la actividad inhibidora de la expresión del gen de la β-catenina humana se comparó de la siguiente forma entre polinucleótidos monocatenarios y bicatenarios.

(1) Transfección

Una cepa de células SW480 de cáncer de colon humano (derivada de adenocarcinoma del intestino grueso humano) se ajustó a una concentración de 100000 células/ml en un medio RPMI1640 (fabricado por Invitrogen Corp.) que contenía suero de feto de ternera al 10%. A continuación, la solución se sembró a una concentración de 1 ml/pocillo en una placa de 12 pocillos de fondo plano (fabricada por Corning Inc.) y se cultivó a 37°C durante 1 día con CO₂ gaseoso al 5,0%. 7,5 µl de un reactivo de lipofección Lipofectamine RNAiMAX (fabricado por Invitrogen Corp.) y una solución de polinucleótido monocatenario o bicatenario a una concentración final de 0,3, 0,03, o 0,003 nM se mezclaron en un medio OPTI-MEM y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 20 minutos. La mezcla se añadió a cada pocillo, y el cultivo se continuó durante 3 días más.

(2) PCR en tiempo real

Tras la transfección, el sobrenadante del cultivo se retiró de cada pocillo, y se extrajo el ARNm usando el kit RNeasy Mini (fabricado por QIAGEN). El ADNc se preparó a partir de 0,5 µg de ARN usando el ARNm obtenido y el kit Script (TM) cDNA Synthesis (fabricado por QIAGEN) de acuerdo con la descripción de las instrucciones. A continuación, el ARNm se cuantificó mediante PCR en tiempo real de la siguiente forma usando cebadores de la PCR para el gen de la β-catenina humana (ID conjunto de cebadores: HA135664, fabricado por TAKARA BIO INC.), cebadores de PCR para el gen GAPDH humano (ID conjunto de cebadores: HA067812, fabricado por TAKARA BIO INC.) como patrón interno, y un kit de PCR en tiempo real (fabricado por Qiagen) que contiene los reactivos necesarios para la PCR.

ID del gen de la β-catenina: HA135664

Cebador directo 5'-TCTGAGGACAAGCCACAAGATTACA-3' (SEQ ID NO: 11)

Cebador inverso 5'-TGGGCACCAATATCAAGTCCAA-3' (SEQ ID NO: 12)

ID del gen GAPDH: HA067812

Cebador directo 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' (SEQ ID NO: 13)

Cebador inverso 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3' (SEQ ID NO: 14)

25 µl de 2xQuantiTect SYBR GREEN PCR Master Mix incluida en el kit de la PCR en tiempo real, 18 µl de agua exenta de ARNasa, 5 µl de cada cebador de la PCR (concentración final: 0,3 µM), y 2 µl de la solución de ADNc preparada por pocillo de una placa de PCR de 96 pocillos (fabricada por Applied Biosystems) se añadieron para llevar la solución al volumen total de 50 µl. La placa se cargó en un Mx3000P (fabricado por STRATAGENE), seguido por PCR en las siguientes condiciones:

activación inicial de la PCR a 95°C durante 15 minutos

PCR a 94°C durante 15 segundos

56°C durante 30 segundos

72°C durante 30 segundos

Este ciclo de PCR se repitió 40 veces. Se preparó una curva de calibración usando diluciones en serie de 5 veces de ADNc preparado a partir del ARNm procedente de células (= NC) tratadas solamente con el reactivo de lipofección. Basándose en la curva de calibración, se cuantificó la β-catenina humana y el GAPDH humano en cada transfectante, y la cantidad relativa determinada dividiendo la cantidad del gen de la catenina humana por la cantidad del GAPDH humano se representó gráficamente en una gráfica. La PCR en tiempo real se realizó en N=2, y el promedio de la misma se muestra en las gráficas (las estructuras y las secuencias de nucleótidos de los

polinucleótidos se muestran en las Figuras 6 y 7).

(3) Análisis de la PCR en tiempo real

(a) Análisis de la actividad inhibidora del gen - 1 -

5 CT-169/CT-157, CT-437, CT-455, CT-456, CT-446, CT-447, CT-448, CT-449, CT-450, CT-451, CT-452, CT-453, CT-454, y, CT-461 (para sus estructuras, véanse las Figuras 6 y 7) se analizaron para determinar sus actividades inhibidora de la expresión del gen de la β -catenina humana.

10 Como se muestra en la Figura 8, CT-437, CT-455, CT-456, CT-446, CT-447, CT-448, CT-449, CT-450, CT-451, CT-452, CT-453, CT-454, y, CT-461 inhibió la expresión del gen de la β -catenina a un nivel equivalente a CT-169/CT-157. CT-448 y CT-454 mostró una actividad más intensa que la de CT-169/CT-157. Esto muestra que un polinucleótido monocatenario en el que el extremo 5' de la hebra de sentido contrario y el extremo 3' de la hebra de sentido directo están unidos mediante grupos fosfatos usando un grupo fenilo modificado tiene una intensa actividad inhibidora de la expresión génica.

(Ejemplo de ensayo 2)

15 La intensidad de la actividad inhibidora de la expresión del gen de la β -catenina humana se comparó entre polinucleótidos monocatenarios y bicatenarios de la misma forma que para el Ejemplo de ensayo 1.

Análisis de la PCR en tiempo real

a) Análisis de la actividad inhibidora del gen - 1 -

CT-169/CT-157, CT-460, CT-461, CT-462, y CT-463 (para sus estructuras, véase la Figura 7) se analizaron para determinar sus actividades inhibidora de la expresión del gen de la β -catenina humana.

20 Como se muestra en la Figura 9, CT-460, CT-461, CT-462, y CT-463 inhibieron más intensamente la expresión del gen de la β -catenina que CT-169/CT-157. Esto muestra que un polinucleótido monocatenario en el que el extremo 5' de la hebra de sentido contrario y el extremo 3' de la hebra de sentido directo están unidos mediante grupos fosfatos usando un grupo fenilo modificado tiene una intensa actividad inhibidora de la expresión génica.

(Ejemplo de ensayo 3)

25 La intensidad de la actividad inhibidora de la expresión del gen de la β -catenina humana se comparó entre polinucleótidos monocatenarios y bicatenarios.

(1) Transfección

30 Una cepa de células SW480 de cáncer de colon humano (derivada de adenocarcinoma del intestino grueso humano) se ajustó a una concentración de 100000 células/ml en un medio RPMI1640 (fabricado por Invitrogen Corp.) que contenía suero de feto de ternera al 10%. A continuación, la solución se sembró a una concentración de 1 ml/pocillo en una placa de 12 pocillos de fondo plano (fabricada por Corning Inc.). A continuación, 7,5 μ l de un reactivo de lipofección Lipofectamine RNAiMAX (fabricado por Invitrogen Corp.) y una solución de polinucleótido monocatenario o bicatenario a una concentración final de 0,3, 0,03, o 0,003 nM se mezclaron en un medio OPTI-MEM y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 20 minutos. La mezcla se añadió a cada pocillo, y el cultivo se continuó a 37°C durante 3 días bajo CO₂ gaseoso al 5,0%.

(2) PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se llevó a cabo de la misma forma que para el Ejemplo de ensayo 1.

(3) Análisis de la PCR en tiempo real

a) Análisis de la actividad inhibidora del gen - 1 -

40 CT-169/CT-157, CT-448, CT-454, CT-464, CT-465, CT-466, CT-467, CT-468, CT-469, CT-470, y, CT-471 (para sus estructuras, véase las Figura 11) se analizaron para determinar sus actividades inhibidora de la expresión del gen de la β -catenina humana.

45 Como se muestra en la Figura 12, CT-470 inhibió la expresión del gen de la β -catenina a un nivel equivalente a CT-169/CT-157. CT-448, CT-454, CT-464, CT-465, CT-466, CT-467, CT-468, CT-469, y, CT-471 mostraron una actividad más intensa que la de CT-169/CT-157. Esto muestra que un polinucleótido monocatenario en el que el extremo 5' de la hebra de sentido contrario y el extremo 3' de la hebra de sentido directo están unidos mediante grupos fosfatos usando un grupo fenilo modificado tiene una intensa actividad inhibidora de la expresión génica.

b) Análisis de la actividad inhibidora del gen - 2 -

CT-106/CT-041 y CT-472 (para sus estructuras, véase la Figura 13) se analizaron para determinar sus actividades inhibidora de la expresión del gen de la β -catenina humana.

- 5 Como se muestra en la Figura 14, CT-472 inhibió la expresión del gen de la β -catenina a un nivel equivalente a CT-106/CT-041. Esto muestra que un polinucleótido monocatenario en el que el extremo 5' de la hebra de sentido contrario y el extremo 3' de la hebra de sentido directo están unidos mediante grupos fosfatos usando un grupo fenilo modificado tiene una intensa actividad inhibidora de la expresión génica.

c) Análisis c la actividad inhibidora del gen - 3 -

CT-001/CT-005 y CT-473 (para sus estructuras, véase la Figura 13) se analizaron para determinar sus actividades inhibidora de la expresión del gen de la β -catenina humana.

- 10 Como se muestra en la Figura 14, CT-473 inhibió más intensamente la expresión del gen de la β -catenina que CT-001/CT-005. Esto muestra que un polinucleótido monocatenario en el que el extremo 5' de la hebra de sentido contrario y el extremo 3' de la hebra de sentido directo están unidos mediante grupos fosfatos usando un grupo fenilo modificado tiene una intensa actividad inhibidora de la expresión génica.

(Ejemplo 27)

- 15 Síntesis de HO-G^p-C^{m1p}-T^p-C^{m1p}-G^p-U^{m1p}-C^p-U^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-A^p-G^{m1p}-T^p-A^{m1p}-X-P (=O) (OH) -O-U^{m1p}-T^p-A^{m1p}-C^p-U^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-A^p-G^{m1p}-A^p-C^{m1p}-G^p-A^{m1p}-G^p-C^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (PK-009)

PK-009 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 14.

- 20 PK-009 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 17 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 18 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de PK-009 se muestra en la Figura 15.

(Ejemplo 28)

Síntesis de HO-C^p-G^{m1p}-A^p-G^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-G^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-T^p-A^{m1p}-X-P(=O)(OH)-O-U^{m1p}-T^p-A^{m1p}-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-C^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-C^p-U^{m1p}-C^p-G^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (HS-005)

- 25 HS-005 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 14.

HS-005 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 23 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 24 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de HS-005 se muestra en la Figura 16.

(Ejemplo 29)

Síntesis de HO-C^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-T^p-G^{m1p}-G^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-C^p-U^{m1p}-A^p-U^{m1p}-X-P(=O)(OH)-O-U^{m1p}-A^p-U^{m1p}-A^p-G^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-C^{m1p}-C^p-A^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (HS-006)

HS-006 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 14.

- 35 HS-006 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 25 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 26 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de HS-006 se muestra en la Figura 16.

(Ejemplo 30)

- 40 Síntesis de HO-C^p-G^{m1p}-A^p-G^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-G^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-C^{m1p}-T^p-A^{m1p}-X-P(=O)(OH)-O-U^{m1p}-T^p-A^{m1p}-G^p-C^{m1p}-A^p-C^{m1p}-C^p-C^{m1p}-A^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-C^p-U^{m1p}-C^p-G^{m1p}-T^p-U^{m1t}-H (HS-005s)

HS-005 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 14. El resto del enlace de fosforotioato en el presente polinucleótido se preparó por tratamiento con una solución de disulfuro fenilacético 0,2 M en piridina-acetonitrilo (1:1 v/v) durante 3 minutos.

- 45 HS-005s es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 27 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 28 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de HS-005s se muestra en la Figura 16.

(Ejemplo 31)

Síntesis de HO-C^p-A^{m1p}-G^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-A^{m1p}-T^p-G^{m1p}-G^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-C^p-U^{m1p}-A^p-U^{m1p}-X-P(=O)(OH)-O-U^{m1p}-A^p-U^{m1p}-A^p-G^{m1p}-C^p-A^{m1p}-C^p-C^{m1p}-C^p-A^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^p-C^{m1p}-T^p-G^{m1p}-T^s-U^{m1t}-H (HS-006s)

HS-006s se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 14. El resto del enlace de fosforotioato en el presente polinucleótido se preparó por tratamiento con una solución de disulfuro fenilacético 0,2 M en piridina-acetonitrilo (1:1 v/v) durante 3 minutos.

HS-006s es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 29 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 30 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de HS-006s se muestra en la Figura 16.

(Ejemplo 32)

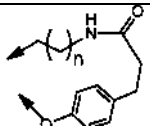
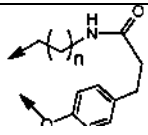
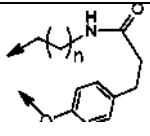
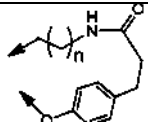
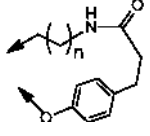
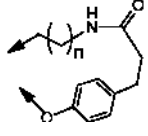
Síntesis de HO-C^p-G^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-G^{m1p}-G^p-C^{m1p}-C^p-U^{m1p}-C^p-U^{m1p}-A^p-C^{m1p}-A^p-A^{m1p}-C^p-U^{m1p}-X-P(=O)(OH)-O-U^{m1p}-A^p-G^{m1p}-T^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-A^p-G^{m1p}-A^p-G^{m1p}-G^p-C^{m1p}-C^p-U^{m1p}-G^p-U^{m1p}-C^p-G^{m1p}-T^p-U^{m1p}-H (HS-012)

HS-012 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo 1. El reactivo de amidita del resto X en el presente polinucleótido se preparó usando el compuesto (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 14.

HS-012 es un polinucleótido en el que el nucleótido del extremo 3' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 33 del Listado de secuencias está unido al nucleótido del extremo 5' del polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 34 mediante enlaces fosfodiéster con X. La estructura de HS-012 se muestra en la Figura 19.

Las estructuras de los restos X de los polinucleótidos descritos en los Ejemplos 27 a 32 y los pesos moleculares de estos polinucleótidos se muestran en la Tabla 3. En la tabla, el grupo metileno del extremo de X está unido al extremo 3' del polinucleótido con hebra en sentido directo para formar un enlace fosfodiéster, mientras que el átomo de oxígeno unido al grupo fenilo está unido al extremo 5' del polinucleótido con hebra en sentido contrario para formar un enlace fosfodiéster.

[Tabla 3]

Ejemplo	Nombre	X	Peso molecular	Ejemplo	Nombre	X	Peso molecular
27	PK-009	 n=7	12829,88	30	HS-005s	 n=7	12834,64
28	HS-005	 n=7	12817,68	31	HS-006s	 n=7	12875,57
29	HS-006	 n=7	12859,22	32	HS-012	 n=7	12803,87

(Ejemplo de Referencia 36)

Síntesis de HO-G^{rp}-C^{rp}-U^{rp}-C^{rp}-G^{rp}-U^{rp}-C^{rp}-U^{rp}-A^{rp}-U^{rp}-G^{rp}-A^{rp}-C^{rp}-A^{rp}-A^{rp}-G^{rp}-U^{rp}-A^{rp}-A^{rp}-U^{rp}-U^{rp}-H (SEQ ID NO: 15 del listado de secuencias) (PK-001)

PK-001 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo de referencia 32. La estructura de PK-001 se muestra en la Figura 15.

Peso molecular: valor calculado: 6658,04, valor medido: 6658,23

Secuencia de nucleótidos: que comprende una secuencia de nucleótidos números 743-762 del gen de la proteína quinasa dependiente de ARN (n.º de registro GenBank NM_011163)

(Ejemplo de Referencia 37)

Síntesis de HO-U^{TP}-U^{TP}-A^{TP}-C^{TP}-U^{TP}-U^{TP}-G^{TP}-U^{TP}-C^{TP}-A^{TP}-U^{TP}-A^{TP}-G^{TP}-A^{TP}-C^{TP}-G^{TP}-A^{TP}-G^{TP}-C^{TP}-U^{TP}-G^L-H (SEQ ID NO: 16 del listado de secuencias) (PK-002)

- 5 PK-002 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo de referencia 32. La estructura de PK-002 se muestra en la Figura 15.

Peso molecular: valor calculado: 6674,04, valor medido: 6673,91

Secuencia de nucleótidos: que comprende una secuencia complementaria de los nucleótidos números 743-762 del gen de la proteína quinasa dependiente de ARN (n.º de registro GenBank NM_011163)

(Ejemplo de Referencia 38)

- 10 Síntesis de HO-U^{TP}-G^{TP}-A^{TP}-G^{TP}-A^{TP}-C^{TP}-A^{TP}-C^{TP}-A^{TP}-U^{TP}-G^{TP}-G^{TP}-G^{TP}-U^{TP}-G^{TP}-C^{TP}-U^{TP}-A^{TP}-U^{TP}-T^P-T^L-H (SEQ ID NO: 19 del Listado de secuencias) (hebra de sentido directo de HS-001)

La hebra de sentido directo de HS-001 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo de referencia 32. La estructura de la hebra de sentido directo de HS-001 se muestra en la Figura 16.

Peso molecular: valor calculado: 6710,12, valor medido: 6710,37

- 15 Secuencia de nucleótidos: que comprende una secuencia de nucleótidos números 1601-1619 del gen de la proteína del choque térmico 47 (n.º de registro GenBank NM_001235)

(Ejemplo de Referencia 39)

Síntesis de HO-A^{TP}-U^{TP}-A^{TP}-G^{TP}-C^{TP}-A^{TP}-C^{TP}-C^{TP}-A^{TP}-U^{TP}-G^{TP}-U^{TP}-G^{TP}-U^{TP}-C^{TP}-U^{TP}-C^{TP}-A^{TP}-T^P-T^L-H (SEQ ID NO: 20 del Listado de Secuencias) (Hebra de sentido contrario de HS-001)

- 20 La hebra de sentido directo de HS-001 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo de referencia 32. La estructura de la hebra de sentido contrario de HS-001 se muestra en la Figura 16.

Peso molecular: valor calculado: 6590,04, valor medido: 6589,88

Secuencia de nucleótidos: que comprende una secuencia complementaria de los nucleótidos números 1601-1619 del gen de la proteína de choque térmico 47 (n.º de registro GenBank NM_001235)

- 25 **(Ejemplo de Referencia 40)**

Síntesis de HO-G^{TP}-A^{TP}-G^{TP}-A^{TP}-C^{TP}-A^{TP}-C^{TP}-A^{TP}-U^{TP}-G^{TP}-G^{TP}-G^{TP}-U^{TP}-G^{TP}-C^{TP}-U^{TP}-A^{TP}-U^{TP}-A^{TP}-T^P-T^L-H (SEQ ID NO: 21 del Listado de secuencias) (hebra de sentido directo de HS-002)

La hebra de sentido directo de HS-002 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo de referencia 32. La estructura de la hebra de sentido directo de HS-002 se muestra en la Figura 16.

- 30 Peso molecular: valor calculado: 6733,16, valor medido: 6733,22

Secuencia de nucleótidos: que comprende una secuencia de nucleótidos números 1602-1619 del gen de la proteína del choque térmico 47 (n.º de registro GenBank NM_001235)

(Ejemplo de Referencia 41)

- 35 Síntesis de HO-U^{TP}-A^{TP}-U^{TP}-A^{TP}-G^{TP}-C^{TP}-A^{TP}-C^{TP}-C^{TP}-A^{TP}-U^{TP}-G^{TP}-U^{TP}-G^{TP}-U^{TP}-C^{TP}-U^{TP}-C^{TP}-T^P-T^L-H (SEQ ID NO: 22 del Listado de Secuencias) (Hebra de sentido contrario de HS-002)

La hebra de sentido directo de HS-002 se sintetizó de la misma forma que en el Ejemplo de referencia 32. La estructura de la hebra de sentido contrario de HS-002 se muestra en la Figura 16.

Peso molecular: valor calculado: 6567,00, valor medido: 6566,99

- 40 Secuencia de nucleótidos: que comprende una secuencia complementaria de los nucleótidos números 1602-1619 de la proteína del choque térmico 47 (n.º de registro GenBank NM_001235)

(Ejemplo de ensayo 4)

Se explicará a continuación un procedimiento para determinar las actividades inhibidora de la expresión génica de PKR (Eif2ak2) de ratón de polinucleótidos monocatenarios y bicatenarios.

- 45 Los polinucleótidos monocatenarios y bicatenarios descritos en la Figura 15 se pueden introducir por separado en fibroblastos embrionarios de ratón usando un reactivo de lipofección Lipofectamine RNAiMAX (fabricado por Invitrogen Corp.).

- 50 De 24 a 48 horas después de la transfección, el ARN total se extrajo de cada célula usando el kit RNeasy Mini (fabricado por QIAGEN). El ARNm se transcribió de forma inversa a ADNc usando SuperScript III First-Strand Synthesis Super Mix para qRT-PCR (fabricado por Invitrogen Corp.). Los niveles de expresión del gen de la PKR y un patrón interno del gen 36B4 se midieron con un sistema de PCR cuantitativa (Applied Biosystems) usando SYBR Green. Los cebadores 5'-AAAACAAGGTGGATTGTACACG-3' y 5'-GTTGGGCTCACACTGTTTCATAAT-3' para

PKR y 5'-CACTGGTCTAGGACCCGAGAA-3' y 5'-AGGGGGAGATGTTTCAGCATGT-3' para 36B4 se usaron de acuerdo con la referencia (Nakamura T, y col., Cell, 140, 338-348 (2010)). El nivel de ARNm de PKR para cada muestra se puede dividir por el nivel de ARNm de 36B4 de esta muestra para su corrección para determinar de esta forma la intensidad relativa del silenciamiento génico realizado por cada polinucleótido monocatenario o bicatenario.

5 (Ejemplo de ensayo 5)

Las actividades inhibitoras de la expresión génica de Hsp47 (Serpinh1) de rata de los polinucleótidos monocatenarios y bicatenarios se determinaron de la siguiente forma:

(1) Transfección

200 µl de un medio OPTI-MEM (fabricado por Invitrogen Corp) y una solución de polinucleótido monocatenario o bicatenario (concentración final: 1 y 0,1 nM) se añadieron a cada pocillo de una placa de 12 pocillos de fondo plano (fabricada por Sumitomo Bakelite Co., Ltd.). El ARNip de control negativo AllStars adquirido de Qiagen se usó como control negativo. 1,2 µl de un reactivo de lipofección Lipofectamine RNAiMAX (fabricado por Invitrogen Corp.) se añadió y se mezcló a cada pocillo, y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante de 10 a 20 minutos. Mientras tanto, una cepa NRK-52E de rata se ajustó a una concentración de 62500 células/ml en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (fabricado por Invitrogen Corp.) que contenía suero de feto de ternera al 10%. A continuación, las células se sembraron a una concentración de 1 ml/pocillo en la placa que contenía el reactivo de lipofección diluido-solución de polinucleótido y se cultivó a 37°C en condiciones de CO₂ al 5,0%.

(2) PCR en tiempo real

27 horas después de la transfección, el ARN total se extrajo de cada célula usando el kit RNeasy Mini (fabricado por QIAGEN). Después de la transcripción inversa a ADNc usando Superscript III First-Strand Synthesis Super Mix para qRT-PCR (fabricado por Invitrogen Corp.), el nivel de ARNm de Hsp47 se midió mediante PCR cuantitativa usando una sonda TaqMan. Los cebadores y la sonda incluidos en el TaqMan Gene Expression Assay (fabricado por Applied Biosystems, ID Ensayo Rn00567777_m1) se usaron para el gen Hsp47. La reacción TaqMan se llevó a cabo usando el sistema de detección ABI Prism 7900HT Sequence (fabricado por Applied Biosystems). El nivel de la expresión del ARN ribosómico (ARNr) de la misma muestra se midió como patrón interno. TaqMan Ribosomal RNA Control Reagents VIC(TM) Probe (fabricado por Applied Biosystems, n.º de catálogo: 4308329) se usó como los cebadores y sonda del ensayo ARNr.

El nivel de ARNm de Hsp47 de cada muestra se dividió por el nivel de ARNr de esta muestra. Un valor relativo se representa gráficamente en la Figura 17 con el valor de la célula suplementada solamente con reactivo de transfección y sin polinucleótido como 1 (en el diagrama, el ip negativo se indicó cuando se usó el AllStars Negative Control siRNA (n.º de catálogo: 1027280)). La Figura 17 muestra un promedio de resultados de tres experimentos independientes y su valor S.D. (la estructura y la secuencia de nucleótidos de cada polinucleótido se muestra en la Figura 16).

(2) Análisis de la PCR en tiempo real

35 (a) Análisis de la actividad inhibitora del gen - 1 -

El polinucleótido bicatenario HS-001, el polinucleótido bicatenario HS-002, el polinucleótido monocatenario HS-005, y el polinucleótido monocatenario HS-006 (para sus estructuras, véase la Figura 16) se estudiaron para determinar sus actividades inhibitoras de la expresión génica de Hsp47.

Como se muestra en la Figura 17, HS-005 inhibió más intensamente la expresión del gen de Hsp47 de rata que HS-001. HS-006 inhibió más intensamente la expresión del gen de Hsp47 de rata que HS-002. En este ensayo, AllStars Negative Control siRNA no mostró actividad inhibitora de la expresión génica de Hsp47. Esto muestra que un polinucleótido monocatenario en el que el extremo 5' de la hebra de sentido contrario y el extremo 3' de la hebra de sentido directo están unidos mediante grupos fosfatos usando un grupo fenilo modificado tiene una actividad inhibitora de la expresión génica más intensa que el polinucleótido bicatenario.

45 (Ejemplo de ensayo 6)

Se determinaron las actividades inhibitoras de la expresión génica de Hsp47 (Serpinh1) de rata de los polinucleótidos monocatenarios y bicatenarios.

(1) Transfección

La transfección se llevó a cabo de la misma forma que para el Ejemplo de ensayo 5 usando los polinucleótidos bicatenarios HS-001 y HS-002 y los polinucleótidos monocatenarios HS-005s y HS-006s (para sus estructuras, véase la Figura 16). Sin embargo, cada ácido nucleico se introdujo, en la mitad de la cantidad del Ejemplo de ensayo 5, en células NRK-52E en un sistema que utiliza una placa de 24 pocillos de fondo plano (fabricada por Sumitomo Bakelite Co., Ltd.).

(2) PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se llevó a cabo de la misma forma que para el Ejemplo de ensayo 5.

(a) Análisis de la actividad inhibidora del gen - 1 -

5 Los polinucleótidos bicatenarios HS-001 y HS-002 y los polinucleótidos monocatenarios HS-005s y HS-006s se estudiaron para determinar sus actividades inhibidoras de la expresión génica de Hsp47 de rata.

10 Como se muestra en la Figura 18, HS-005s y HS-006s inhibieron intensamente la expresión del gen Hsp47 de rata a un nivel equivalente o superior al de HS-001 y HS-002. Esto muestra que un polinucleótido monocatenario en el que el extremo 5' de la hebra de sentido contrario y el extremo 3' de la hebra de sentido directo están unidos mediante grupos fosfatos usando un grupo fenilo modificado tiene una actividad inhibidora de la expresión génica más intensa que el polinucleótido bicatenario.

(Ejemplo de ensayo 7)

Se determinaron las actividades inhibidoras de la expresión génica de Hsp47 (Serpinh1) de rata de los polinucleótidos monocatenarios y bicatenarios.

(1) Transfección

15 La transfección se llevó a cabo de la misma forma que para el Ejemplo de ensayo 6 usando el polinucleótido bicatenario siHSP47C (SEQ ID NOs: 31 y 32 del Listado de secuencias; para su estructura, véase la Figura 19) descritas en la publicación internacional n.º WO 2011/072082 y el polinucleótido monocatenario HS-012 (para su estructura, véase la Figura 19).

20 hebra de sentido directo de siHSP47C: 5'-GGACAGGCCUCUACAACUATT-3' (SEQ ID NO: 31)
hebra de sentido contrario de siHSP47C: 5'-UAGUUGUAGAGGCCUGUCCTT-3' (SEQ ID NO: 32)

(2) PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se llevó a cabo de la misma forma que para el Ejemplo de ensayo 5.

(a) Análisis de la actividad inhibidora del gen - 1 -

25 El polinucleótido bicatenario siHSP47C y el polinucleótido monocatenario HS-012 se estudiaron para determinar sus actividades inhibidoras de la expresión génica de Hsp47 de rata.

30 Como se muestra en la Figura 20, HS-HS-012 inhibió intensamente la expresión del gen Hsp47 de rata a un nivel equivalente o superior al de siHSP47C. Esto muestra que un polinucleótido monocatenario en el que el extremo 5' de la hebra de sentido contrario y el extremo 3' de la hebra de sentido directo están unidos mediante grupos fosfatos usando un grupo fenilo modificado tiene una actividad inhibidora de la expresión génica más intensa que el polinucleótido bicatenario.

Aplicabilidad industrial

35 La presente invención podría proporcionar un polinucleótido monocatenario que tiene un efecto interferencia de ARN y/o un efecto inhibidor de la expresión génica. La presente invención también podría proporcionar un polinucleótido monocatenario que sea resistente a ARNasa y que tenga un efecto de interferencia de ARN y/o un efecto inhibidor de la expresión génica.

El polinucleótido monocatenario se puede usar en el análisis funcional de genes, composiciones farmacéuticas, etc. Sin embargo, el campo industrial del presente polinucleótido monocatenario no está limitado a condición de que se use como en el presente documento.

Texto libre del Listado de secuencias

40 SEQ ID NO: 1: CT-169 SEQ ID NO: 2: CT-157
SEQ ID NO: 3: Región de la hebra de sentido directo de CT-472
SEQ ID NO: 4: Región de la hebra de sentido contrario de CT-472
SEQ ID NO: 5: Región de la hebra de sentido directo de CT-473
SEQ ID NO: 6: Región de la hebra de sentido contrario de CT-473
45 SEQ ID NO: 7: CT-106
SEQ ID NO: 8: CT-041
SEQ ID NO: 9: CT-001
SEQ ID NO: 10: CT-005
SEQ ID NO: 11: Cebador directo del gen de la β -catenina
50 SEQ ID NO: 12: Cebador inverso del gen de la β -catenina
SEQ ID NO: 13: Cebador directo del gen GAPDH

SEQ ID NO: 14: Cebador inverso del gen GAPDH
 SEQ ID NO: 15: PK-001
 SEQ ID NO: 16: PK-002
 5 SEQ ID NO: 17: Región de la hebra de sentido directo de PK-009
 SEQ ID NO: 18: Región de la hebra de sentido contrario de PK-009
 SEQ ID NO: 19: Hebra de sentido directo de HS-001
 SEQ ID NO: 20: Hebra de sentido contrario de HS-001
 SEQ ID NO: 21: Hebra de sentido directo de HS-002
 10 SEQ ID NO: 22: Hebra de sentido contrario de HS-002
 SEQ ID NO: 23: Región de la hebra de sentido directo de HS-005
 SEQ ID NO: 24: Región de la hebra de sentido contrario de HS-005
 SEQ ID NO: 25: Región de la hebra de sentido directo de HS-006
 SEQ ID NO: 26: Región de la hebra de sentido contrario de HS-006
 15 SEQ ID NO: 27: Región de la hebra de sentido directo de HS-005s
 SEQ ID NO: 28: Región de la hebra de sentido contrario de HS-005s
 SEQ ID NO: 29: Región de la hebra de sentido directo de HS-006s
 SEQ ID NO: 30: Región de la hebra de sentido contrario de HS-006s
 SEQ ID NO: 31: Hebra de sentido directo de siHSP47C
 20 SEQ ID NO: 32: Hebra de sentido contrario de siHSP47C
 SEQ ID NO: 33: Región de la hebra de sentido directo de HS-012
 SEQ ID NO: 34: Región de la hebra de sentido contrario de HS-012

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LTD.
 <120> polinucleótidos monocatenarios modificados
 25 <130> FP1145
 <150> JP2010-269498
 <151> 02/12/2010
 <150> JP2011-100159
 <151> 27/04/2011
 30 <160> 34
 <170> PatentIn versión 3.4
 <210> 1
 <211> 18
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> hebra de sentido directo
 <220>
 <221> base modificada
 40 <222> (2)..(2)
 <223> cm
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (4)..(4)
 45 <223> cm
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-metiladenosina
 50 <220>
 <221> base modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-metiladenosina
 <220>

	<221> base_modificada	
	<222> (10)..(10)	
	<223> um	
5	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (12)..(12)	
	<223> gm	
10	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (14)..(14)	
	<223> um	
15	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (16)..(16)	
	<223> 2'-O-metiladenosina	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (18)..(18)	
	<223> 2'-O-metiladenosina	
20	<400> 1	
	gcacaagaau ggaucaca	18
	<210> 2	
	<211> 21	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> hebra de sentido contrario	
30	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (1)..(1)	
	<223> um	
35	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (3)..(3)	
	<223> gm	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (5)..(5)	
	<223> gm	
40	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (7)..(7)	
	<223> um	
45	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (9)..(9)	
	<223> cm	
50	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (11)..(11)	
	<223> um	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (13)..(13)	

<223> cm
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)..(15)
 5 <223> um
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)..(17)
 <223> um
 10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (19)..(19)
 <223> cm
 <220>
 15 <221> base_modificada
 <222> (21)..(21)
 <223> um
 <400> 2
 utgtgaucca utctugugct u 21
 20 <210> 3
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> región de la hebra de sentido directo de CT-472
 <400> 3
 gcacaagaau ggaucacaau u 21
 <210> 4
 30 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> región de la hebra de sentido contrario de CT-472
 <400> 4
 35 uugugaucca uucuugugcu u 21
 <210> 5
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> región de la hebra de sentido directo de CT-473
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (2)..(2)
 45 <223> cm
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)..(4)
 <223> cm
 50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-metiladenosina

	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (8)..(8)	
	<223> 2'-O-metiladenosina	
5	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (10)..(10)	
	<223> um	
10	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (12)..(12)	
	<223> gm	
15	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (14)..(14)	
	<223> um	
20	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (16)..(16)	
	<223> 2'-O-metiladenosina	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (18)..(18)	
	<223> 2'-O-metiladenosina	
25	<400> 5	
	gcacaagaau ggaucacaa	19
	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> región de la hebra de sentido contrario de CT-473	
	<220>	
35	<221> base_modificada	
	<222> (1)..(1)	
	<223> um	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (3)..(3)	
40	<223> gm	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (5)..(5)	
	<223> gm	
45	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (7)..(7)	
	<223> um	
	<220>	
50	<221> base_modificada	
	<222> (9)..(9)	
	<223> cm	
	<220>	
	<221> base_modificada	

	<222> (11)..(11) <223> um	
5	<220> <221> base_modificada <222> (13)..(13) <223> cm	
10	<220> <221> base_modificada <222> (15)..(15) <223> um	
15	<220> <221> base_modificada <222> (17)..(17) <223> um	
20	<400> 6 uugugaucca uucuugugcu u	21
	<210> 7 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> CT-106	
	<400> 7 gcacaagaau ggaucacaau u	21
30	<210> 8 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> CT-041	
35	<400> 8 uugugaucca uucuugugcu u	21
	<210> 9 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> CT-001	
	<220> <221> base_modificada <222> (2)..(2) <223> cm	
45	<220> <221> base_modificada <222> (4)..(4) <223> cm	
50	<220> <221> base_modificada <222> (6)..(6)	

<223> 2'-O-metiladenosina
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)..(8)
 5 <223> 2'-O-metiladenosina
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)..(10)
 <223> um
 10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)..(12)
 <223> gm
 15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (14)..(14)
 <223> um
 20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-metiladenosina
 25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (18)..(18)
 <223> 2'-O-metiladenosina
 <400> 9
 gcacaagaau ggaucacaat t 21
 <210> 10
 <211> 21
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CT-005
 35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> um
 40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> gm
 45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (5)..(5)
 <223> gm
 50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(7)
 <223> um
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (9)..(9)
 <223> cm
 <220>

<221> base_modificada
 <222> (11)..(11)
 <223> um

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(13)
 <223> cm

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)..(15)
 <223> um

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)..(17)
 <223> um

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (19).. (19)
 <223> cm

20 <400> 10
 uugugaucca uucuugugct t 21

25 <210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador directo de la beta-catenina

30 <400> 11
 tctgaggaca agccacaaga ttaca 25

30 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> cebador inverso de la beta-catenina

40 <400> 12
 tgggcaccaa tatcaagtcc aa 22

40 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador directo de GAPDH

45 <400> 13
 gcaccgtcaa ggctgagaac 20

50 <210> 14
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador inverso de GAPDH

<400> 14

	tggtgaagac gccagtga	19
	<210> 15	
	<211> 21	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> PK-001	
	<400> 15	
	gcucgucua u gacaaguaa u	21
10	<210> 16	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> PK-002	
	<400> 16	
	uuacuuguca uagacgagcu g	21
	<210> 17	
	<211> 18	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> región de la hebra de sentido directo de PK-009	
	<220>	
25	<221> base_modificada	
	<222> (2)..(2)	
	<223> cm	
	<220>	
	<221> base_modificada	
30	<222> (4)..(4)	
	<223> cm	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (6)..(6)	
35	<223> um	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (8)..(8)	
	<223> um	
40	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (10)..(10)	
	<223> um	
	<220>	
45	<221> base_modificada	
	<222> (12)..(12)	
	<223> 2'-O-metiladenosina	
	<220>	
	<221> base_modificada	
50	<222> (14)..(14)	
	<223> 2'-O-metiladenosina	
	<220>	
	<221> base_modificada	

	<222> (16)..(16)	
	<223> gm	
5	<220> <221> base_modificada <222> (18).. 18 <223> 2'-O-metiladenosina	
	<400> 17 gctcgucuaugacaagta	18
10	<210> 18 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> región de la hebra de sentido contrario de PK-009	
15	<220> <221> base_modificada <222> (1)..(1) <223> um	
20	<220> <221> base_modificada <222> (3)..(3) <223> 2'-O-metiladenosina	
25	<220> <221> base_modificada <222> (5)..(5) <223> um	
30	<220> <221> base_modificada <222> (7)..(7) <223> gm	
	<220> <221> base_modificada <222> (9)..(9) <223> cm	
35	<220> <221> base_modificada <222> (11)..(11) <223> um	
40	<220> <221> base_modificada <222> (13)..(13) <223> gm	
45	<220> <221> base_modificada <222> (15)..(15) <223> cm	
50	<220> <221> base_modificada <222> (17)..(17) <223> 2'-O-metiladenosina	
	<220> <221> base_modificada <222> (19).. (19) <223> cm	

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (21)..(21)
 <223> um

5 <400> 18
 utacutgtca uagacgagct u 21

<210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hebra de sentido directo de HS-001

<400> 19
 ugagacacau gggugcuaut t 21

15 <210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> hebra de sentido contrario de HS-001

<400> 20
 auagcaccca ugugucuat t 21

<210> 21
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hebra de sentido directo de HS-002

<400> 21
 30 gagacacaug ggugcuauat t 21

<210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> hebra de sentido contrario de HS-002

<400> 22
 uauagcaccc augugucuct t 21

<210> 23
 <211> 18
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región de la hebra de sentido directo de HS-005

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> gm

<220>
 50 <221> base_modificada
 <222> (4)..(4)
 <223> gm

	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (6)..(6)	
	<223> cm	
5	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (8)..(8)	
	<223> cm	
10	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (10)..(10)	
	<223> um	
15	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (12)..(12)	
	<223> gm	
20	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (14)..(14)	
	<223> um	
25	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (18)..(18)	
	<223> 2'-O-metiladenosina	
30	<400> 23	
	cgagacacau gggugcta	18
	<210> 24	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> región de la hebra de sentido contrario de HS-005	
40	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (1)..(1)	
	<223> um	
45	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (3)..(3)	
	<223> 2'-O-metiladenosina	
50	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (5)..(5)	
	<223> cm	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (7)..(7)	
	<223> cm	
	<220>	
	<221> base_modificada	

<222> (9)..(9)
 <223> cm

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (11)..(11)
 <223> um

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(13)
 <223> um

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)..(15)
 <223> um

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)..(17)
 <223> um

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (19)..(19)
 <223> gm

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (21)..(21)
 <223> um

 <400> 24
 utagcaccca ugugucucgt u 21

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

 <220>
 <223> región de la hebra de sentido directo de HS-006

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-metiladenosina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-metiladenosina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-metiladenosina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-metiladenosina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)..(10)
 <223> gm

	<220> <221> base_modificada <222> (12)..(12) <223> gm	
5	<220> <221> base_modificada <222> (14)..(14) <223> gm	
10	<220> <221> base_modificada <222> (16)..(16) <223> um	
15	<220> <221> base_modificada <222> (18)..(18) <223> um	
	<400> 25 cagacacatg ggtgcuaau	18
20	<210> 26 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> región de la hebra de sentido contrario de HS-006	
25	<220> <221> base_modificada <222> (1)..(1) <223> um	
30	<220> <221> base_modificada <222> (3)..(3) <223> um	
35	<220> <221> base_modificada <222> (5)..(5) <223> gm	
40	<220> <221> base_modificada <222> (7)..(7) <223> 2'-O-metiladenosina	
	<220> <221> base_modificada <222> (9)..(9) <223> cm	
45	<220> <221> base_modificada <222> (11)..(11) <223> 2'-O-metiladenosina	
50	<220> <221> base_modificada <222> (13)..(13) <223> gm	
	<220> <221> base_modificada	

	<222> (15)..(15)	
	<223> gm	
5	<220> <221> base_modificada <222> (17)..(17) <223> cm	
10	<220> <221> base_modificada <222> (19).. (19) <223> gm	
15	<220> <221> base_modificada <222> (21).. (21) <223> um	
	<400> 26 uauagcacc atgtgtctgt u	21
20	<210> 27 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> región de la hebra de sentido directo de HS-005s	
25	<220> <221> base_modificada <222> (2)..(2) <223> gm	
30	<220> <221> base_modificada <222> (4)..(4) <223> gm	
35	<220> <221> base_modificada <222> (6).. (6) <223> cm	
40	<220> <221> base_modificada <222> (8)..(8) <223> cm	
45	<220> <221> base_modificada <222> (10)..(10) <223> um	
50	<220> <221> base_modificada <222> (12)..(12) <223> gm	
	<220> <221> base_modificada <222> (14)..(14) <223> um	
	<220> <221> base_modificada <222> (16)..(16) <223> cm	

	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (18)..(18)	
	<223> 2'-O-metiladenosina	
5	<400> 27	
	cgagacacau gggugcta	18
	<210> 28	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> región de la hebra de sentido contrario de HS-005s	
	<220>	
	<221> base_modificada	
15	<222> (1)..(1)	
	<223> um	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (3)..(3)	
20	<223> 2'-O-metiladenosina	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (5)..(5)	
	<223> cm	
25	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (7)..(7)	
	<223> cm	
	<220>	
30	<221> base_modificada	
	<222> (9)..(9)	
	<223> cm	
	<220>	
	<221> base_modificada	
35	<222> (11)..(11)	
	<223> um	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (13)..(13)	
40	<223> um	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (15)..(15)	
	<223> um	
45	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (17)..(17)	
	<223> um	
	<220>	
50	<221> base_modificada	
	<222> (19)..(19)	
	<223> gm	
	<220>	
	<221> base_modificada	

<222> (21).. (21)
 <223> um

 <400> 28
 utagcaccca ugugucucgt u 21

 5 <210> 29
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> región de la hebra de sentido directo de HS-006s

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-metiladenosina

 15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-metiladenosina

 20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-metiladenosina

 25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-metiladenosina

 30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)..(10)
 <223> gm

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)..(12)
 <223> gm

 35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (14)..(14)
 <223> gm

 40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (16)..(16)
 <223> um

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (18)..(18)
 <223> um

 45 <400> 29
 cagacacatg ggtgcua 18

 50 <210> 30
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> región de la hebra de sentido contrario de HS-006s

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> um

5

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> um

10

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (5)..(5)
 <223> gm

15

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-O-metiladenosina

20

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (9)..(9)
 <223> cm

25

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-O-metiladenosina

30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(13)
 <223> gm

35

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)..(15)
 <223> gm

40

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)..(17)
 <223> cm

45

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (19)..(19)
 <223> gm

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (21)..(21)
 <223> um

<400> 30
 uauagcacc atgtgtctgt u 21

50

<210> 31
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hebra de sentido directo de siHSP47C

<400> 31
 ggacaggccu cuacaacuat t 21

<210> 32
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> hebra de sentido contrario de siHSP47C

<400> 32
 uaguuguaga ggccugucct t 21

10 <210> 33
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región de la hebra de sentido directo de HS-012

15 <220>
 <221> base modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> gm

20 <220>
 <221> base modificada
 <222> (4)..(4)
 <223> cm

25 <220>
 <221> base modificada
 <222> (6)..(6)
 <223> gm

30 <220>
 <221> base modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> cm

<220>
 <221> base modificada
 <222> (10)..(10)
 <223> um

35 <220>
 <221> base modificada
 <222> (12)..(12)
 <223> um

40 <220>
 <221> base modificada
 <222> (14)..(14)
 <223> cm

45 <220>
 <221> base modificada
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-metiladenosina

<220>
 <221> base modificada
 <222> (18)..(18)
 <223> um

50 <400> 33
 cgacaggccuacaacu 18

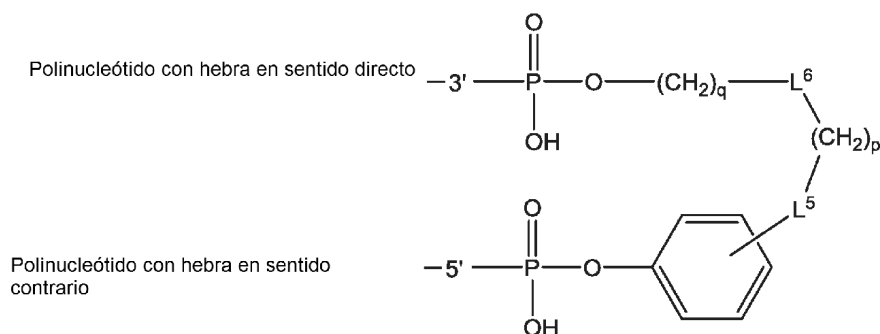
<210> 34
 <211> 21

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> región de la hebra de sentido contrario de HS-012	
5	<220>	
	<221> base modificada	
	<222> (1)..(1)	
	<223> um	
10	<220>	
	<221> base modificada	
	<222> (3)..(3)	
	<223> gm	
15	<220>	
	<221> base modificada	
	<222> (5)..(5)	
	<223> um	
20	<220>	
	<221> base modificada	
	<222> (7)..(7)	
	<223> um	
	<220>	
	<221> base modificada	
	<222> (9)..(9)	
	<223> gm	
25	<220>	
	<221> base modificada	
	<222> (11)..(11)	
	<223> gm	
30	<220>	
	<221> base modificada	
	<222> (13)..(13)	
	<223> cm	
35	<220>	
	<221> base modificada	
	<222> (15)..(15)	
	<223> um	
40	<220>	
	<221> base modificada	
	<222> (17)..(17)	
	<223> um	
	<220>	
	<221> base modificada	
	<222> (19)..(19)	
	<223> gm	
45	<220>	
	<221> base modificada	
	<222> (21)..(21)	
	<223> um	
50	<400> 34	
	uagtuguaga ggccugucgt u	21

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido o sal del mismo, comprendiendo el polinucleótido un polinucleótido con una hebra de sentido directo correspondiente a un gen diana, y un polinucleótido con una hebra de sentido contrario que tiene una secuencia de polinucleótidos complementaria de la del polinucleótido con hebra de sentido directo y que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula, en la que el extremo 5' del polinucleótido con hebra en sentido contrario y el extremo 3' del polinucleótido con hebra en sentido directo están unidos mediante un enlazador a través de enlaces fosfodiéster:

[Fórmula 2]

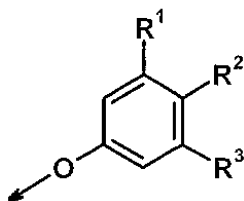


10 en la que

- p representa un número entero de 0 a 4,
 q representa un número entero de 4 a 10,
 L⁵ representa un enlace simple o -O-,
 L⁶ representa -(C=O)-NH- o -NH-(C=O)- partiendo del enlace con (CH₂)_p,
 15 L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición meta o para, y
 a condición de que si L⁵ es -O-, entonces, p representa un número entero de 1 a 4.

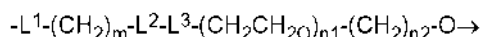
2. El polinucleótido o la sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la suma de p y q es un número entero igual a 4 o mayor, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para, preferentemente en el que la suma de p y q es un número entero igual a 8 o mayor.
- 20 3. El polinucleótido o la sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que p es 0 o 2, q es un número entero igual a 6 o mayor, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para, preferentemente en el que q es 6 u 8, más preferentemente en el que q es 8.
4. El polinucleótido o la sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que p es 2, q es 8, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para.
- 25 5. Un polinucleótido o sal del mismo, comprendiendo el polinucleótido un polinucleótido con una hebra de sentido directo que correspondiente a un gen diana, y un polinucleótido con una hebra de sentido contrario que tiene una secuencia de polinucleótidos complementaria de la del polinucleótido con hebra de sentido directo, en el que el extremo 5' del polinucleótido con hebra en sentido contrario y el extremo 3' del polinucleótido con hebra en sentido directo están unidos mediante un enlazador para formar una estructura fosfodiéster en cualquiera de dichos extremos, teniendo el enlazador una estructura representada por la siguiente fórmula:
- 30

[Fórmula 1]



en la que

- el átomo de oxígeno unido al grupo fenilo está unido al extremo 5' de la hebra de sentido contrario para formar una estructura fosfodiéster;
 35 uno cualquiera de R¹, R², y R³ representa una estructura representada mediante la siguiente fórmula:



en la que

m representa un número entero de 0 a 4,

n1 representa un número entero de 0 a 4,

n2 representa 0 o un número entero de 2 a 10,

L¹ representa un enlace simple o -O-,

L² representa un enlace simple o -CH(-NH-L⁴-R)-,

L³ representa un enlace simple, -(C=O)-NH-, o -NH-(C=O)- partiendo del enlace con L²,

a condición de que si L³ no es un enlace simple, entonces n2 representa un número entero de 2 a 10,

a condición de que si se cada uno de L¹ y L² sea un enlace simple, m es 1, y cada uno de n1 y n2 es 0, entonces

L³-O→ representa -CH(COOH)NH-(resto de aminoácido)-Ser,

-CH(COOH)NH-(resto de aminoácido)-Thr,

-CH(NH₂)CO-(resto de aminoácido)-Ser, o

-CH(NH₂)CO-(resto de aminoácido)-Thr, en la que

el resto del grupo hidroxilo de esta serina o treonina está unido al grupo fosfato del extremo 3' del polinucleótido con hebra en sentido directo, y el grupo amino de la serina o treonina puede estar adicionalmente sustituido por un grupo acilo, j representa un número entero de 0 a 2,

L⁴ representa un enlace simple, un grupo metileno, un grupo polimetileno que tiene de 2 a 4 átomos de carbono,

o la estructura -(C=O)-CH₂-CH₂-(C=O)-O- en la que un grupo carbonilo de la estructura -(C=O)-CH₂-CH₂-(C=O)-

O- está unido al grupo amino del extremo izquierdo de la fórmula estructural para formar la estructura -NH-(C=O)-

-CH₂-CH₂-(C=O)-O-, y

R representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, un grupo de hidrocarburo saturado o insaturado-carbonilo que tiene de 2 a 30 átomos de carbono, o un grupo hidrocarbonoxycarbonilo saturado o insaturado que tiene de 2 a 30 átomos de carbono; y

los dos restantes de R¹, R², y R³ representan, cada uno de ellos independientemente, un grupo seleccionado entre el grupo que consiste en un átomo de hidrógeno,

un grupo alquilo que tiene de 1 a 8 átomos de carbono que puede tener un sustituyente,

un grupo alcoxi que tiene de 1 a 8 átomos de carbono que puede tener un sustituyente,

un átomo de halógeno,

un grupo alquilcarbonilamino que tiene un grupo alquilo que tiene de 1 a 9 átomos de carbono, y

un grupo alquilcarbonilo que contiene un grupo alquilo que tiene de 1 a 8 átomos de carbono que puede tener un sustituyente.

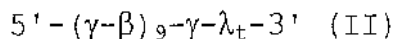
6. El polinucleótido o la sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 5, en el que cada R¹ y R³ es un átomo de hidrógeno.

7. El polinucleótido o la sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que cada L¹ y L² es un enlace simple, L³ es -(C=O)-NH-, y la suma de m y n2 es un número entero igual a 3 o mayor, preferentemente 8 o mayor.

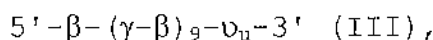
8. El polinucleótido o la sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que cada L¹ y L² es un enlace simple, L³ es -(C=O)-NH-, m es 0 o 2, y n2 es un número entero igual a 6 o mayor, preferentemente 6 u 8, más preferentemente 8.

9. El polinucleótido o la sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 5, en el que cada R¹ y R³ es un átomo de hidrógeno, cada L¹ y L² es un enlace simple, L³ es -(C=O)-NH-, m es 2, y n2 es 8.

10. El polinucleótido o sal del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el polinucleótido con hebra en sentido directo consiste en un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (II), el polinucleótido con hebra en sentido contrario consiste de un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (III), y el polinucleótido tiene además las siguientes características de (a) a (d):



y



(a) γ representa un ARN, β representa un 2'-OMeARN, y cada λ y u representa un ADN;

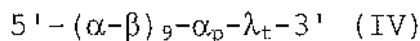
(b) t y u representan, de forma idéntica o diferente, cualquier número entero de 0 a 5;

(c) $(\gamma-\beta)_9-\gamma$ en el polinucleótido representado mediante la fórmula (II) tiene una secuencia de nucleótidos idéntica a la del gen diana; y

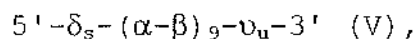
(d) $(\gamma-\beta)_9-\gamma$ en la fórmula (II) y $\beta-(\gamma-\beta)_9$ en la fórmula (III) tienen secuencias de nucleótidos complementarias entre

sí.

11. El polinucleótido o sal del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el polinucleótido con hebra en sentido directo consiste de un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (IV), el polinucleótido con hebra en sentido contrario consiste de un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (V), y el polinucleótido tiene además las siguientes características de (a) a (d):

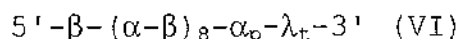


y

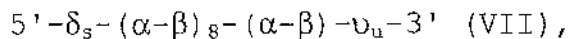


- (a) α y β representan, de forma diferente, un ADN o un 2'-OMeARN, δ y λ representan, de forma idéntica o diferente, un ADN o un 2'-OMeARN, y u representa, de manera idéntica o diferente, cualquier nucleótido seleccionado entre un ADN, un ARN, y un 2'-OMeARN;
- (b) p representa un número entero de 0 o 1, t es 0 cuando p es 0 y representa cualquier número entero de 0 a 5 cuando p es 1, s representa cualquier número entero de 0 o 1, y u representa cualquier número entero de 0 a 5;
- (c) $(\alpha - \beta)_9 - \alpha_p$ en el polinucleótido representado mediante la fórmula (IV) tiene una secuencia de nucleótidos idéntica a la del gen diana; y
- (d) $(\alpha - \beta)_9$ en la fórmula (IV) y $(\alpha - \beta)_9$ en la fórmula (V) tienen secuencia de nucleótidos complementarias entre sí.

12. El polinucleótido o sal del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el polinucleótido con hebra en sentido directo consiste de un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (VI), el polinucleótido con hebra en sentido contrario consiste de un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (VII), y el polinucleótido tiene además las siguientes características de (a) a (d):



y



- (a) α y β representan, de forma diferente, un ADN o un 2'-OMeARN, δ y λ representan, de forma idéntica o diferente, un ADN o un 2'-OMeARN, y u representa, de manera idéntica o diferente, cualquier nucleótido seleccionado entre un ADN, un ARN, y un 2'-OMeARN;
- (b) p representa un número entero de 0 o 1, t es 0 cuando p es 0 y representa cualquier número entero de 0 a 5 cuando p es 1, s representa cualquier número entero de 0 o 1, y u representa cualquier número entero de 0 a 5;
- (c) $\beta - (\alpha - \beta)_8 - \alpha_p$ en el polinucleótido representado mediante la fórmula (VI) tiene una secuencia de nucleótidos idéntica a la del gen diana; y
- (d) $(\alpha - \beta)_8$ en la fórmula (VI) y $(\alpha - \beta)_8$ en la fórmula (VII) tienen secuencias de nucleótidos complementarias entre sí.

13. El polinucleótido o la sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en el que α es un ADN, y β es un 2'-OMeARN.

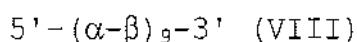
14. El polinucleótido o sal del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que λ_t y u_u son, de manera idéntica o diferente, cualquiera de: ADN que tienen una base timina, una base adenina, o una base guanina; o 2'-OMeARN que tienen una base uracilo, una base adenina, o una base guanina.

15. El polinucleótido o sal del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en el que t es 0, y u es 2.

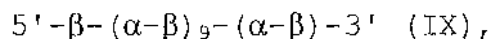
16. El polinucleótido o sal del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que p y t son 0, s es 1, y u es 2.

17. El polinucleótido o sal del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que p y t son 0, s es 0 o 1, u es 2, y u_2 es un ADN o un 2'-OMeARN.

18. El polinucleótido o sal del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el polinucleótido con hebra en sentido directo consiste de un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (VIII), el polinucleótido con hebra en sentido contrario consiste de un polinucleótido representado mediante la siguiente fórmula (IX), y el polinucleótido tiene además las siguientes características de (a) a (c):



y



(a) α es un ADN, y β es un 2'-OMeARN;

(b) $\beta - (\alpha - \beta)_9$ en el polinucleótido representado mediante la fórmula (IX) tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la del gen diana; y

(c) $(\alpha - \beta)_9$ en la fórmula (VIII) y $(\alpha - \beta)_9$ en la fórmula (IX) tienen secuencias de nucleótidos complementarias entre sí.

19. El polinucleótido o sal del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, en el que cualquiera o todos los 1 a 4 restos 2'-OMeARN están sustituidos por un ENA o una 2',4'-BNA/LNA.

20. El polinucleótido o sal del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19, en el que cualquiera o todos los de 1 a 4 restos de ADN están sustituidos por un ARN, un ENA o un 2',4'-BNA/LNA.

21. El polinucleótido o sal del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que los nucleótidos están unidos entre sí mediante un enlace fosfodiéster o fosforotioato.

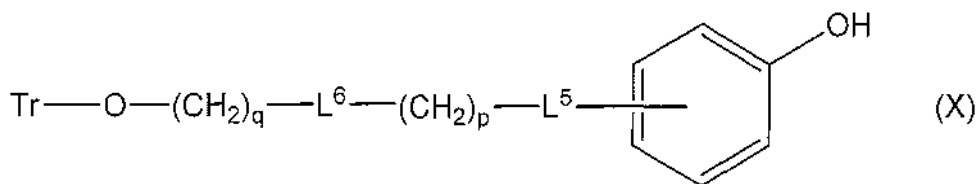
22. Una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 como principio activo.

23. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 22, en el que la composición farmacéutica está dirigida al tratamiento de una enfermedad derivada de la expresión génica.

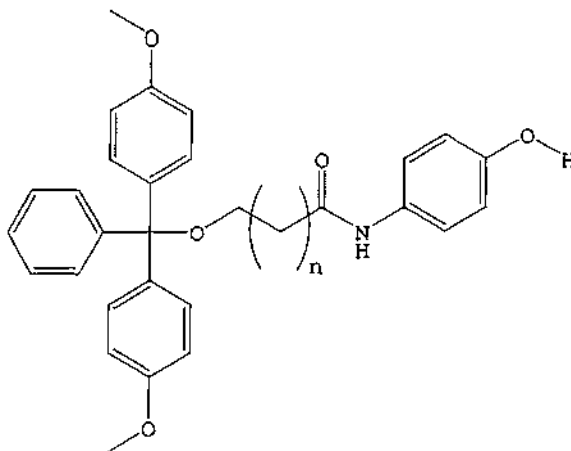
24. Un polinucleótido o sal del mismo seleccionado de las reivindicaciones 1 a 21 para su uso en la inhibición de la expresión de un gen diana en un mamífero.

25. Un compuesto representado por la fórmula (X) o una sal del mismo:

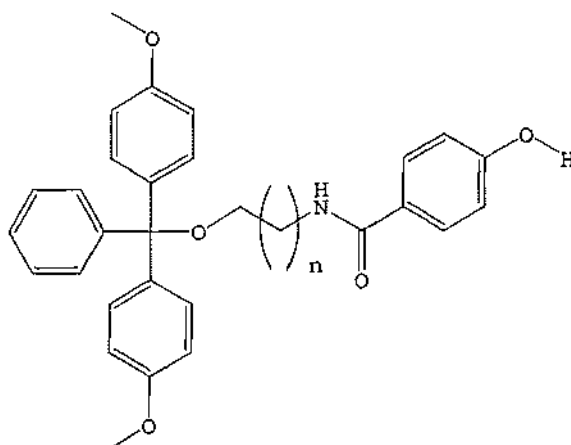
[Fórmula 3]



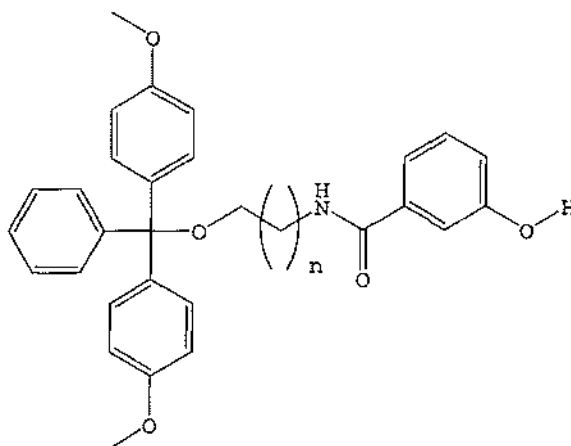
en la que Tr representa un grupo protector del grupo hidroxilo; p representa un número entero de 0 a 4; q representa un número entero de 4 a 10; L^5 representa un enlace simple o -O-; L^6 representa -(C=O)-NH- o -NH-(C=O)- partiendo del enlace con $(\text{CH}_2)_p$; y L^5 está unido al anillo de benceno en la posición meta o para; y se caracteriza en que el compuesto no es:



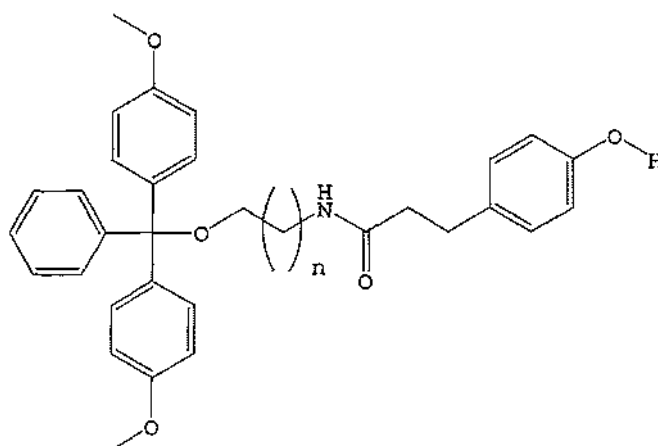
en la que n es 4, 6 u 8;



en la que n es 3, 5 o 7;



en la que n es 3, 5 o 7; o



5

en la que n es 3, 5 o 7.

26. El compuesto o sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 25, en el que Tr es un grupo 4-metoxitritilo, un grupo 4,4'-dimetoxitritilo, un grupo pixilo, un grupo tritilo, un grupo levulinilo, o un grupo bis(trimetilsililo)(ciclohexilo)sililo.

10 27. El compuesto o sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 25, en el que Tr es un grupo 4-metoxitritilo o un grupo 4,4'-dimetoxitritilo, la suma de p y q es un número entero igual a 4 o mayor, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para, preferentemente en el que la suma de p y q es un número entero igual a 8 o mayor.

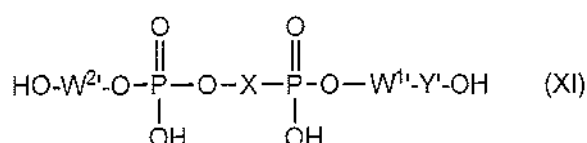
28. El compuesto o sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 25, en el que Tr es un grupo 4-metoxitritilo o un

grupo 4,4'-dimetoxitritilo, p es 0 o 2, q es un número entero igual a 6 o mayor, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para, preferentemente en el que q es 6 u 8.

29. El compuesto o sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 25, en el que Tr es un grupo 4-metoxitritilo o un grupo 4,4'-dimetoxitritilo, p es 0 o 2, q es 8, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para, preferentemente en el que Tr es un grupo 4-metoxitritilo.

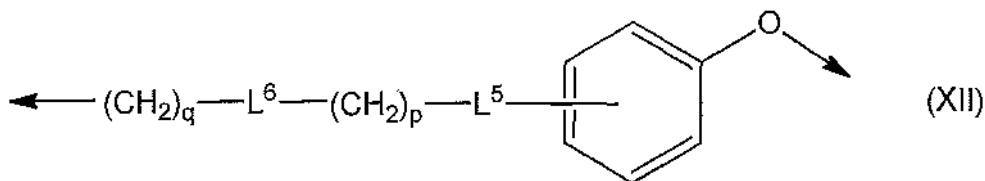
30. Un procedimiento de producción de un compuesto representado mediante la fórmula (XI), siendo el compuesto un polinucleótido que comprende un polinucleótido con una hebra de sentido directo que correspondiente a un gen diana, y un polinucleótido con una hebra de sentido contrario que tiene una secuencia de polinucleótidos complementaria de la del polinucleótido con hebra de sentido directo, en la que el extremo 5' del polinucleótido con hebra en sentido contrario y el extremo 3' del polinucleótido con hebra en sentido directo están unidos mediante X por enlaces fosfodiéster:

[Fórmula 4]



en la que W^{2'} representa un polinucleótido con hebra en sentido directo sin grupos hidroxilo en el extremo 5' y el extremo 3'; W^{1'}-Y' representa un polinucleótido con hebra en sentido contrario sin grupos hidroxilo en el extremo 5' y el extremo 3'; y X representa la fórmula (XII):

[Fórmula 5]

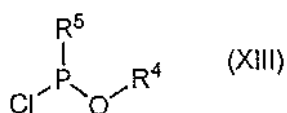


en la que p representa un número entero de 0 a 4; q representa un número entero de 4 a 10; L⁵ representa un enlace simple o -O-; L⁶ representa -(C=O)-NH- o -NH-(C=O)- partiendo del enlace con (CH₂)_p; L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición meta o para; a condición de que si L⁵ es -O-, entonces, p representa un número entero de 1 a 4; y el grupo metileno del extremo está unido al extremo 3' del polinucleótido con hebra en sentido directo para formar un enlace fosfodiéster; y el átomo de oxígeno unido al grupo fenilo está unido al extremo 5' del polinucleótido con hebra en sentido contrario para formar un enlace fosfodiéster,

comprendiendo el procedimiento las etapas de:

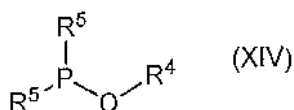
(i) hacer reaccionar el grupo hidroxilo de un compuesto representado por la fórmula Tr-O-X-H [en la que Tr representa un grupo protector del grupo hidroxilo, -(CH₂)_q- en X está unido a Tr-O- y el átomo de oxígeno unido al grupo fenilo está unido al hidrógeno] con un compuesto representada por la fórmula (XIII):

[Fórmula 6]



o la fórmula (XIV):

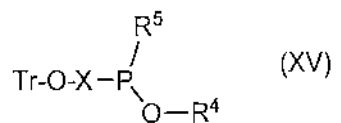
[Fórmula 7]



[en la que R⁴ representa un grupo a 2-cianoetilo, un grupo metilo, un grupo metanosulfonietilo, un grupo 2,2,2-tricloroetilo, o un grupo 4-clorofenilmetilo, y R⁵ representa un grupo morfolino, un grupo diisopropilamino, un

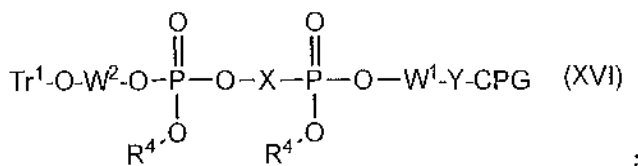
grupo dietilamino, o un grupo dimetilamino] para producir un compuesto representado por la fórmula (XV):

[Fórmula 8]



(ii) hacer reaccionar el compuesto obtenido en la etapa (i) con un compuesto representado por la fórmula HO-W¹-Y-CPG [en la que W¹-Y representa un polinucleótido con hebra en sentido contrario protegido sin grupos hidroxilo en el extremo 5' y el extremo 3', y CPG representa un soporte polimérico que tiene un enlazador capaz de unirse al polinucleótido] según un procedimiento de fosforamidita y posteriormente producir un resto representado por la fórmula Tr¹-O-W²-O-P(=O)(OR⁴)-O-[en la que Tr¹ representa un grupo protector del grupo hidroxilo, y W² representa un polinucleótido con hebra en sentido directo protegido sin grupos hidroxilo en el extremo 5' y el extremo 3'] según un procedimiento de fosforamidita para producir un compuesto representado por la fórmula (XVI):

[Fórmula 9]



y

(iii) escindir el compuesto obtenido en la etapa (ii) del CPG y eliminar el grupo protector.

31. El procedimiento según la reivindicación 30, en el que Tr y Tr¹ son, de manera idéntica o diferente, un grupo 4-metoxitritilo, un grupo 4,4'-dimetoxitritilo, un grupo pixilo, un grupo tritilo, un grupo levulinilo, o un grupo bis(trimetilsililo)(ciclohexilo)sililo.

32. El procedimiento según la reivindicación 30, en el que Tr y Tr¹ son, de manera idéntica o diferente, un grupo 4-metoxitritilo o un grupo 4,4'-dimetoxitritilo, la suma de p y q es un número entero igual a 4 o mayor, L⁶ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para, preferentemente en el que la suma de p y q es un número entero igual a 8 o mayor.

33. El procedimiento según la reivindicación 30, en el que Tr y Tr¹ son, de manera idéntica o diferente, un grupo 4-metoxitritilo o un grupo 4,4'-dimetoxitritilo, p es 0 o 2, q es un número entero igual a 6 o mayor, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para, preferentemente en el que q es 6 u 8, más preferentemente en la que q es 8.

34. El procedimiento según la reivindicación 30, en el que Tr y Tr¹ son, de manera idéntica o diferente, un grupo 4-metoxitritilo o un grupo 4,4'-dimetoxitritilo, p es 2, q es 8, L⁵ es un enlace simple, L⁶ es -(C=O)-NH-, y L⁵ está unido al anillo de benceno en la posición para, preferentemente en el que cada Tr y Tr¹ es un grupo 4,4'-dimetoxitritilo.

35. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 30 a 34, en el que R⁴ es un grupo 2-cianoetilo, un grupo metilo, un grupo metanosulfoniletilo, un grupo 2,2,2-tricloroetilo, o un grupo 4-clorofenilmetilo, y R⁵ es un grupo morfolino, un grupo diisopropilamino, un grupo dietilamino, o un grupo dimetilamino, preferentemente en el que R⁴ es un grupo 2-cianoetilo o un grupo metilo, y R⁵ es un grupo morfolino o un grupo diisopropilamino.

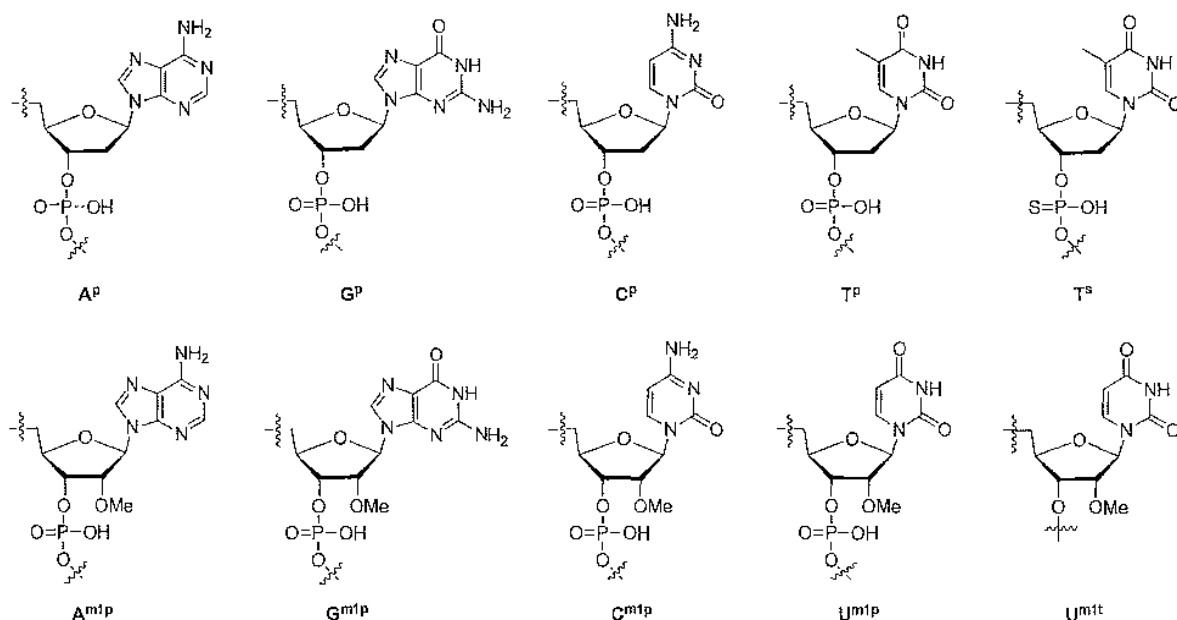
36. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 30 a 34, en el que el compuesto representado por la fórmula (XIII) es cloro(morfolino)metoxifosfina, cloro(morfolino)cianoetoxifosfina, cloro(diisopropilamino)metoxifosfina, o cloro(diisopropilamino)cianoetoxifosfina.

37. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 30 a 34, en el que el compuesto representado por la fórmula (XIV) es bis (diisopropilamino)cianoetoxifosfina.

38. Un polinucleótido seleccionado entre los siguientes, o una sal del mismo: HO-Cp-G^{m1p}-Ap-G^{m1p}-Ap-C^{m1p}-Ap-C^{m1p}-Ap-U^{m1p}-Gp-G^{m1p}-Gp-U^{m1p}-Gp-C^{m1p}-Tp-A^{m1p}-X-P(=O) (OH)-O-U^{m1p}-Tp-A^{m1p}-Gp-C^{m1p}-Ap-C^{m1p}-Cp-C^{m1p}-Ap-U^{m1p}-Gp-U^{m1p}-Gp-U^{m1p}-Cp-U^{m1p}-Cp-G^{m1p}-Tp-U^{m1t}-H (HS-005), HO-Cp-A^{m1p}-Gp-A^{m1p}-Cp-A^{m1p}-Cp-A^{m1p}-Tp-G^{m1p}-Gp-G^{m1p}-Tp-G^{m1p}-Cp-U^{m1p}-Ap-U^{m1p}-X-P(=O) (OH)-O-U^{m1p}-Ap-U^{m1p}-Ap-G^{m1p}-Cp-A^{m1p}-Cp-C^{m1p}-Cp-A^{m1p}-Tp-G^{m1p}-Tp-G^{m1p}-Tp-G^{m1p}-Tp-U^{m1t}-H (HS-006), HO-Cp-G^{m1p}-Ap-G^{m1p}-Ap-C^{m1p}-Ap-C^{m1p}-Ap-C^{m1p}-Ap-U^{m1p}-Gp-U^{m1p}-Gp-C^{m1p}-Tp-A^{m1p}-X-P(=O) (OH)-O-U^{m1p}-Tp-A^{m1p}-Gp-C^{m1p}-Ap-C^{m1p}-Cp-C^{m1p}-Ap-U^{m1p}-Gp-U^{m1p}-Gp-U^{m1p}-Cp-U^{m1p}-Cp-G^{m1p}-Ts-U^{m1t}-H (HS-005s), o, HO-Cp-A^{m1p}-Gp-A^{m1p}-Cp-A^{m1p}-Cp-A^{m1p}-Tp-G^{m1p}-Gp-G^{m1p}-Tp-G^{m1p}-Cp-U^{m1p}-Ap-U^{m1p}-X-P(=O) (OH)-O-U^{m1p}-Ap-U^{m1p}-Ap-G^{m1p}-Cp-

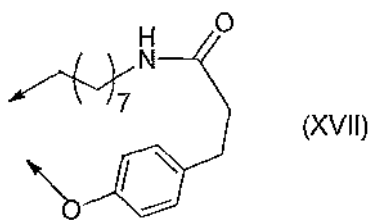
A^{m1p} -, C^p -, C^{m1p} -, C^p -, A^{m1p} -, T^p -, G^{m1p} -, T^p -, G^{m1p} -, T^p -, C^{m1p} -, T^p -, G^{m1p} -, T^p -, G^{m1t} -, T^s -, U^{m1t} -, H (HS-006s), en el que cada A^p , G^p , C^p , T^p , T^s , A^{m1p} , G^{m1p} , C^{m1p} , U^{m1p} , y U^{m1t} representa un nucleósido o un nucleótido que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 10]



la secuencia en dirección cadena arriba de X representa un polinucleótido con hebra en sentido directo correspondiente a un gen diana; la secuencia en dirección cadena abajo de X representa un polinucleótido que tiene un polinucleótido con hebra en sentido contrario que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria de la del polinucleótido con hebra en sentido directo; X representa un enlazador que tiene una estructura representada por la fórmula (XVII):

[Fórmula 11]



el grupo metileno del extremo está unido al extremo 3' del polinucleótido con hebra en sentido directo para formar un enlace fosfodiéster; y el átomo de oxígeno unido al grupo fenilo está unido al extremo 5' del polinucleótido con hebra en sentido contrario para formar un enlace fosfodiéster.

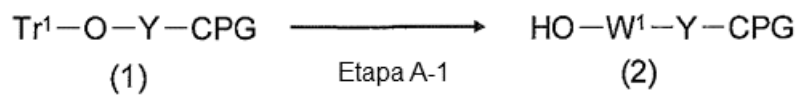
39. Una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido o sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 38 como principio activo.

40. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 39, en la que la composición farmacéutica es para el tratamiento de una enfermedad derivada de la expresión del gen Hsp47, preferentemente fibrosis.

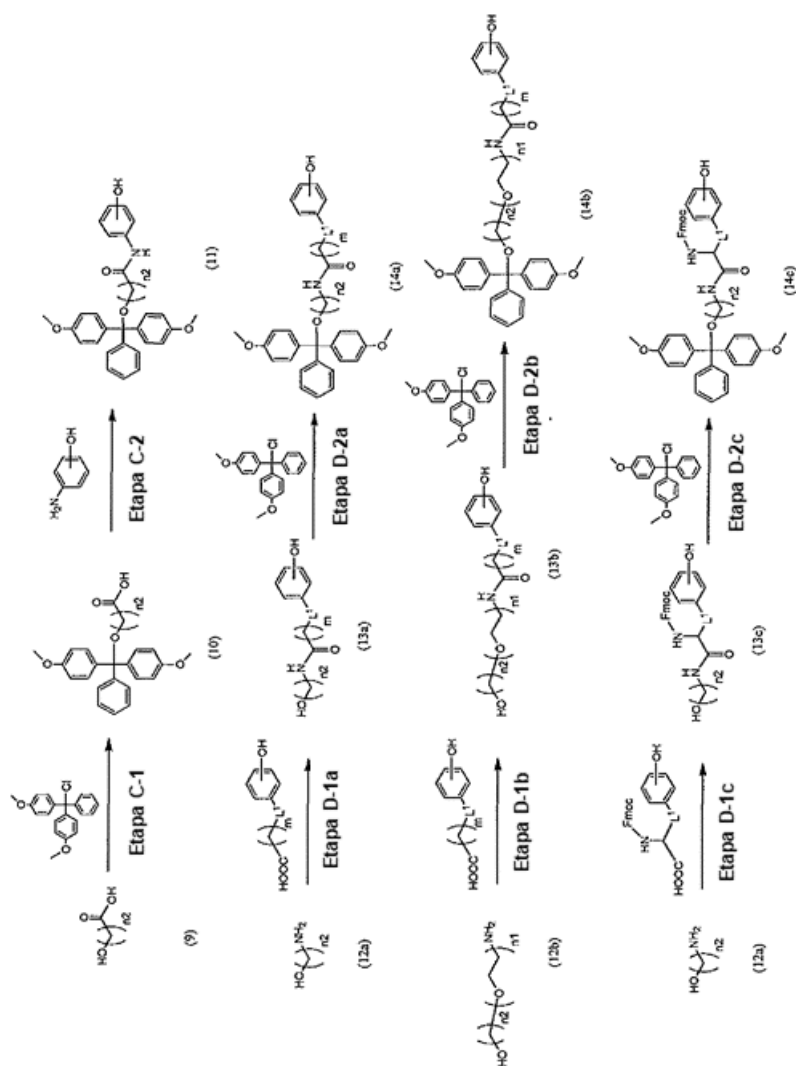
41. Un polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 38 para su uso en la inhibición de la expresión del gen Hsp47, en un mamífero.

42. Un reactivo que comprende un polinucleótido o una sal del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 o 38.

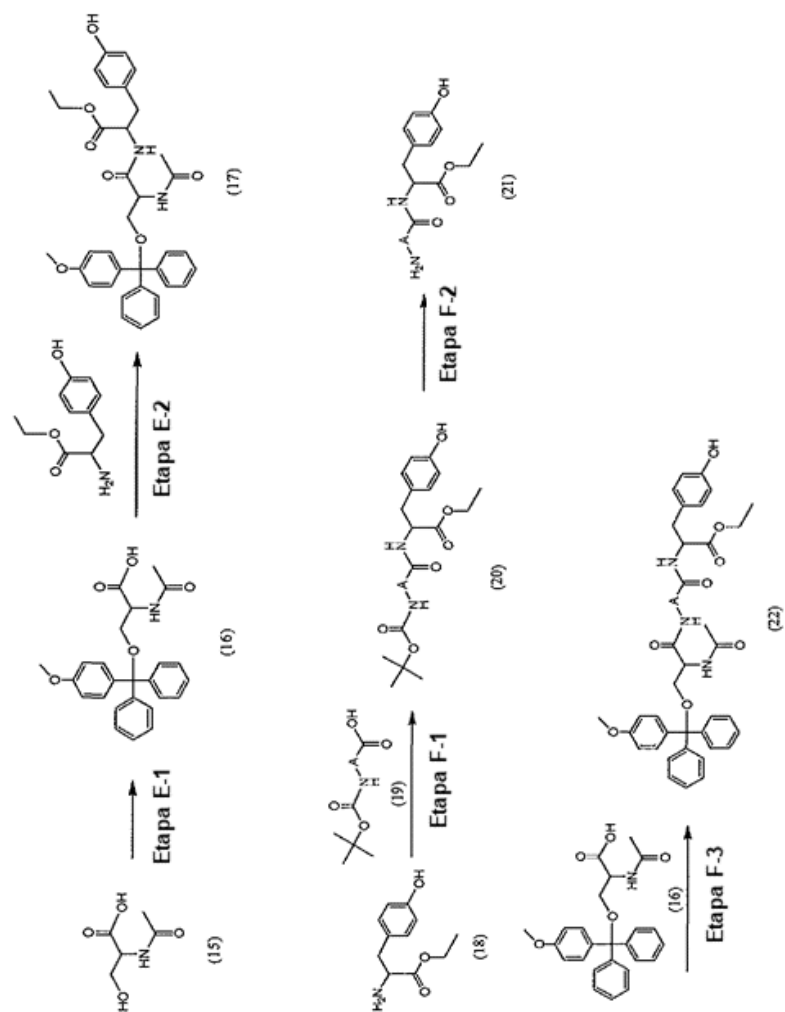
[Figura 1]



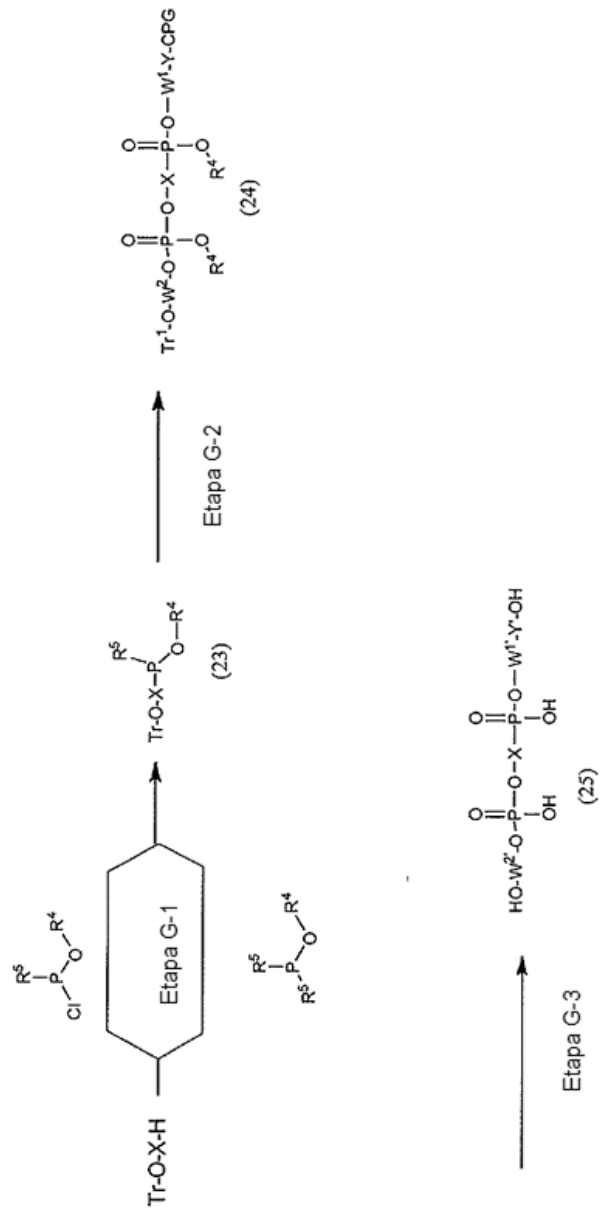
[Figura 2]



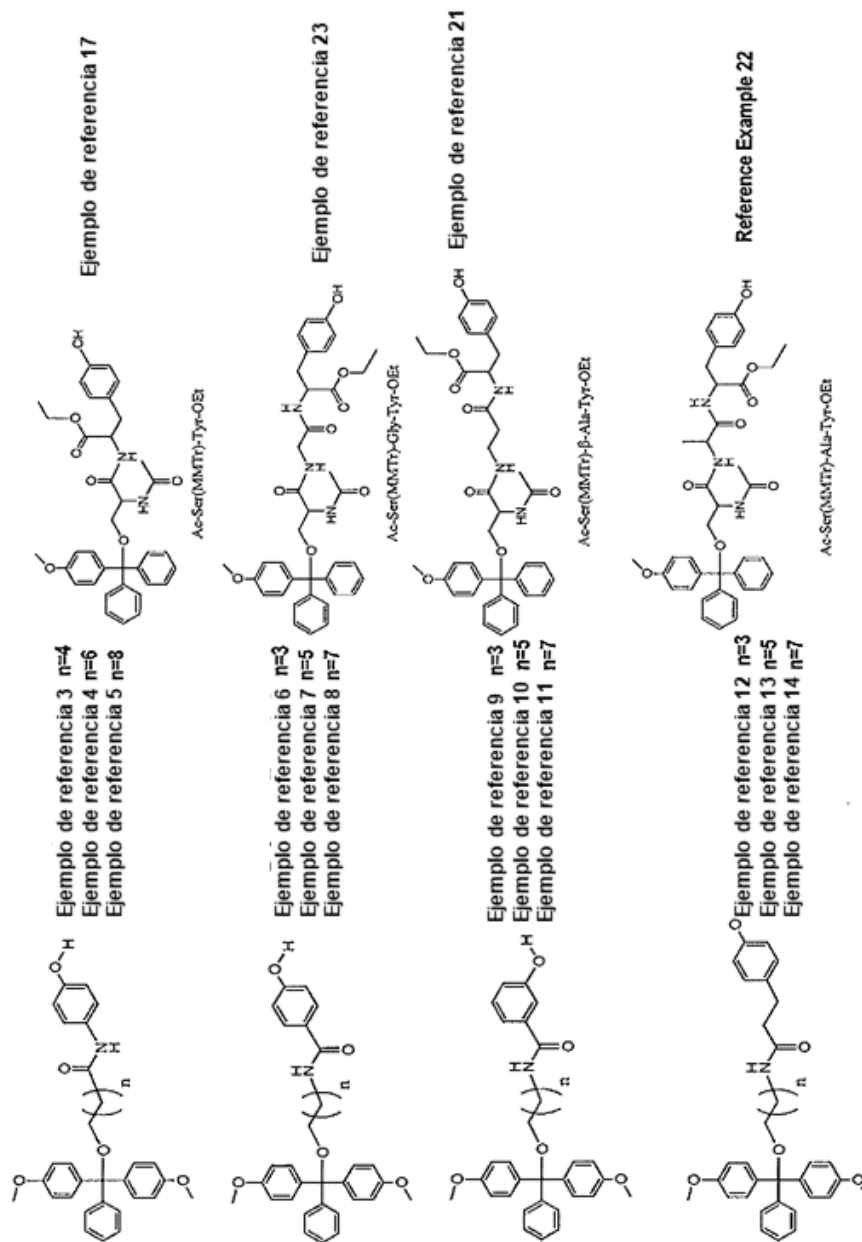
[Figura 3]



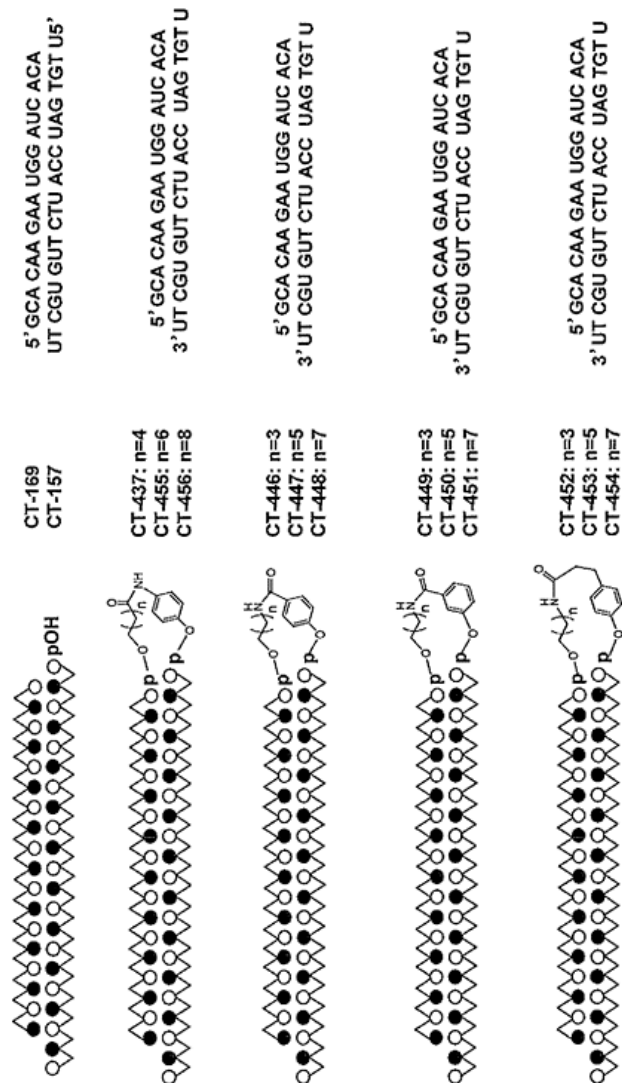
[Figura 4]



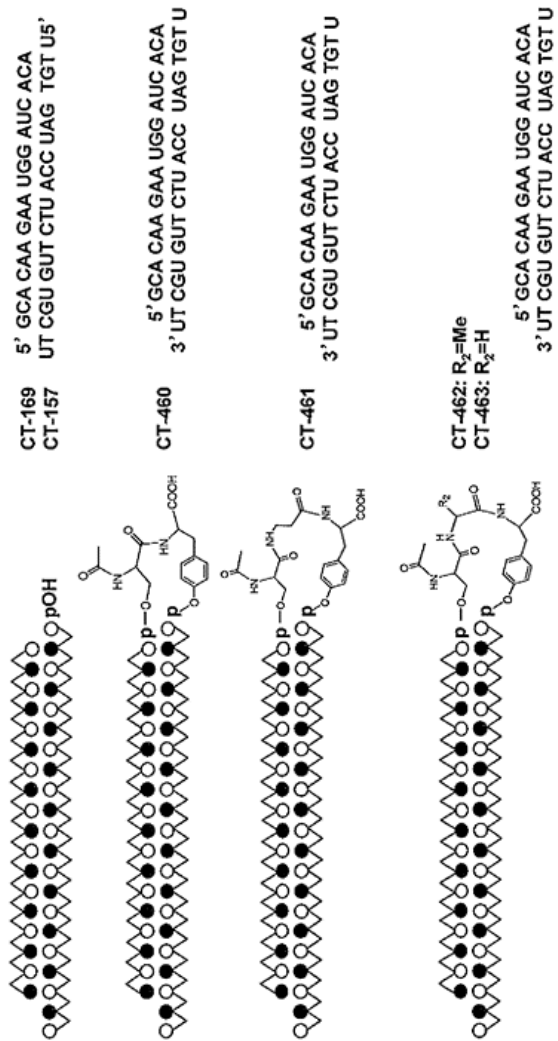
[Figura 5]



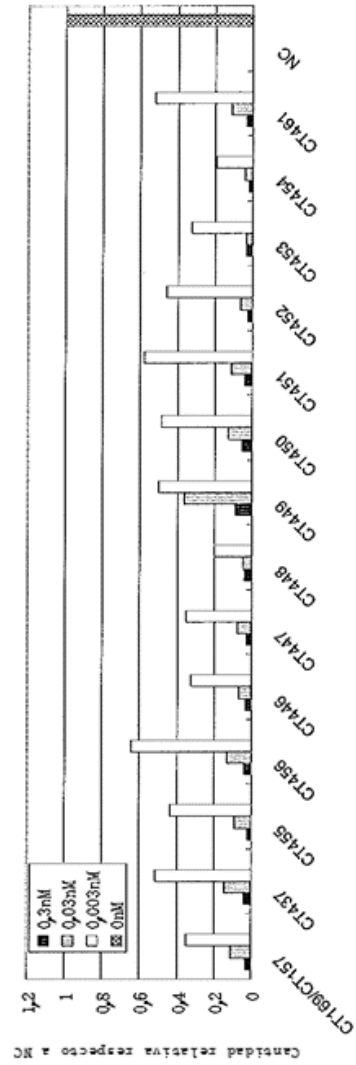
[Figura 6]



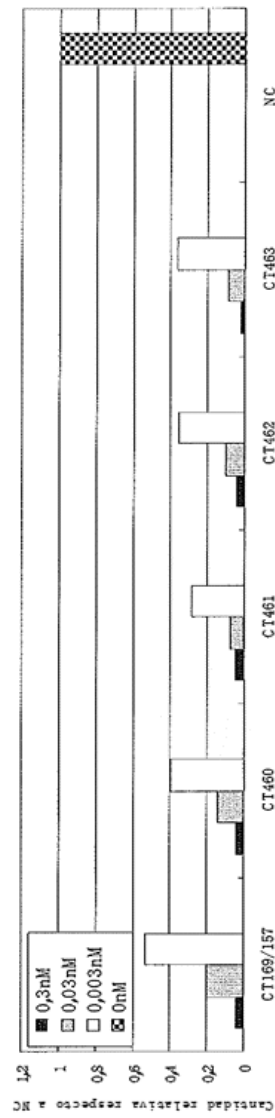
[Figura 7]



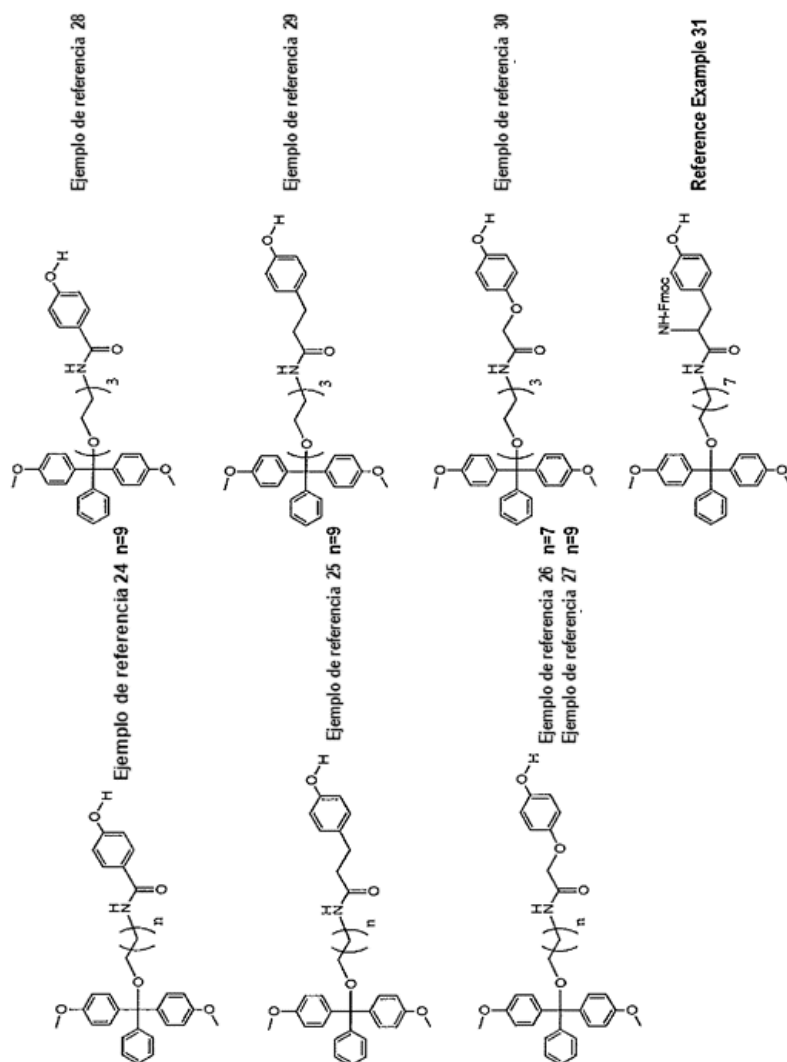
[Figura 8]



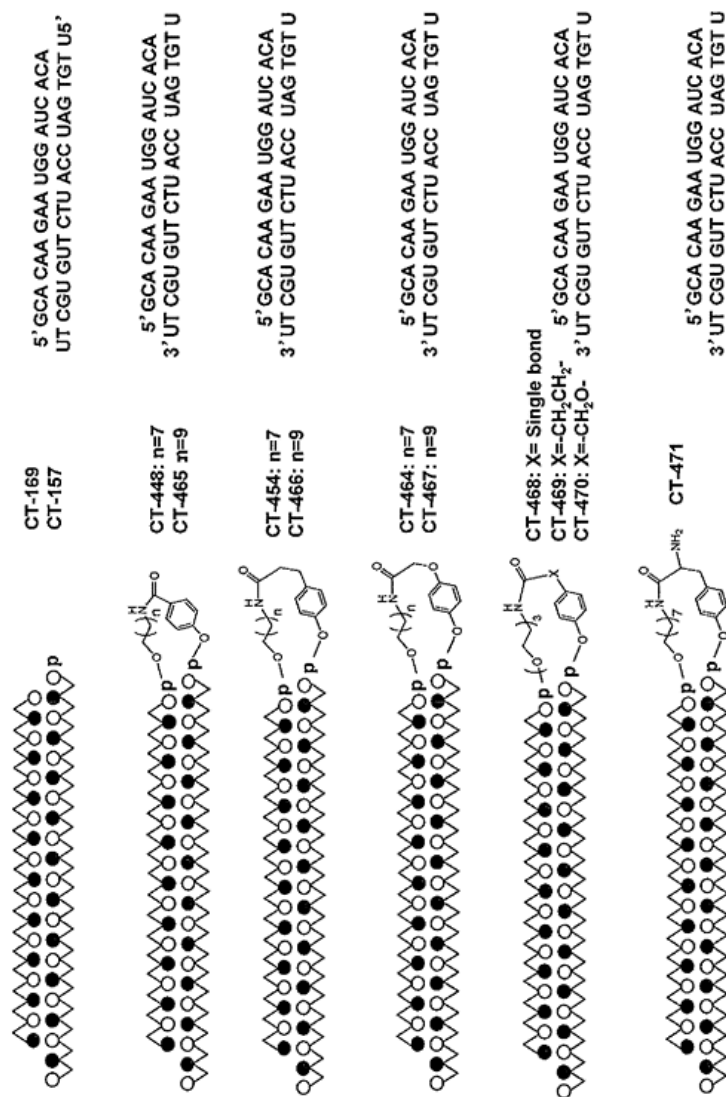
[Figura 9]



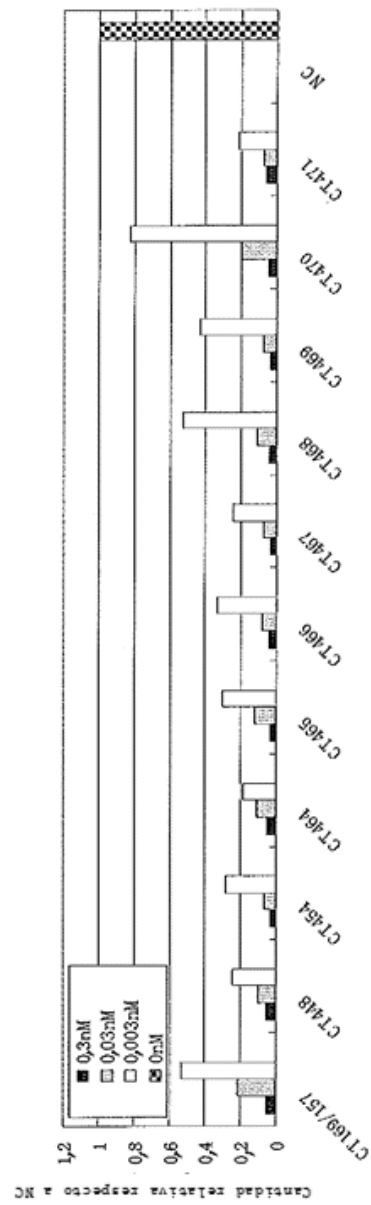
[Figura 10]



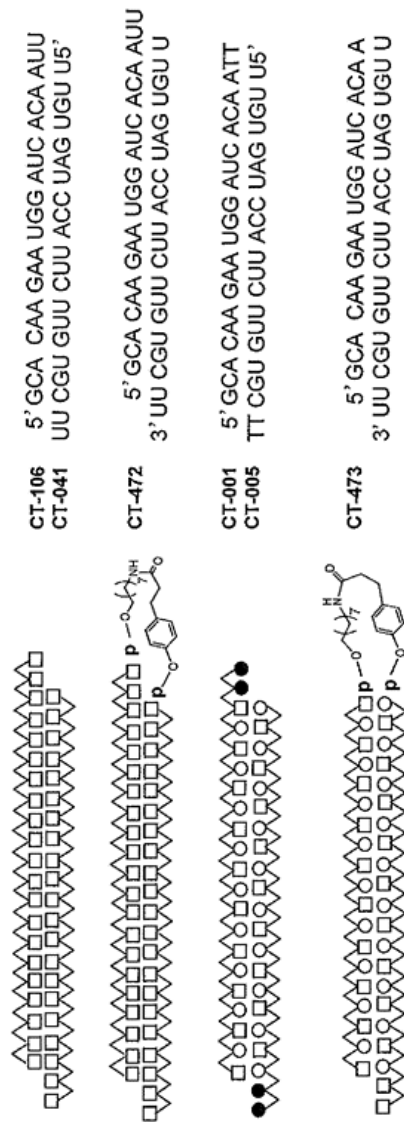
[Figura 11]



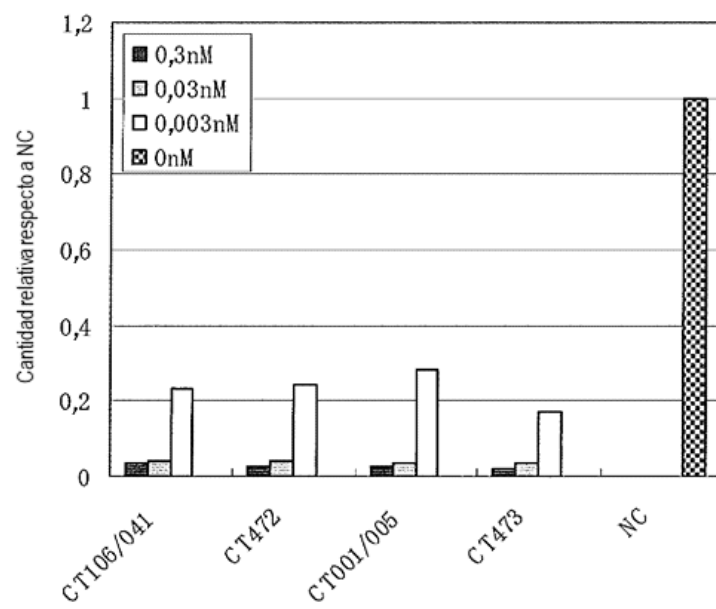
[Figura 12]



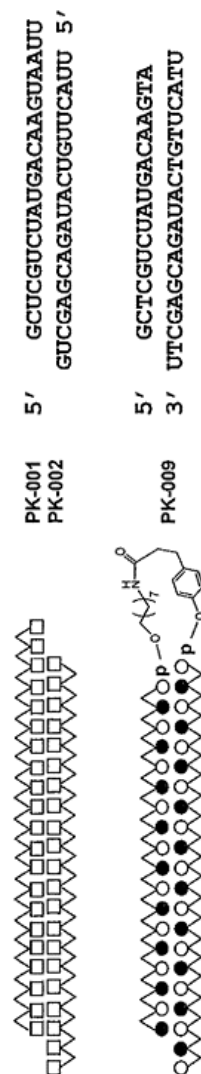
[Figura 13]



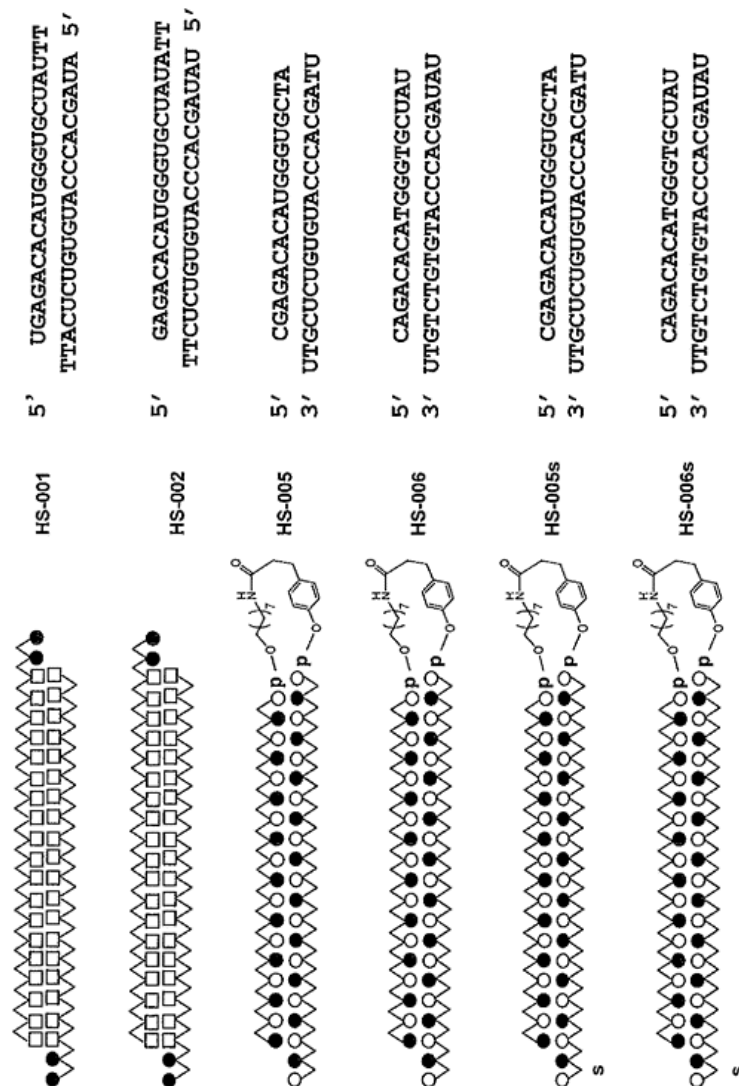
[Figura 14]



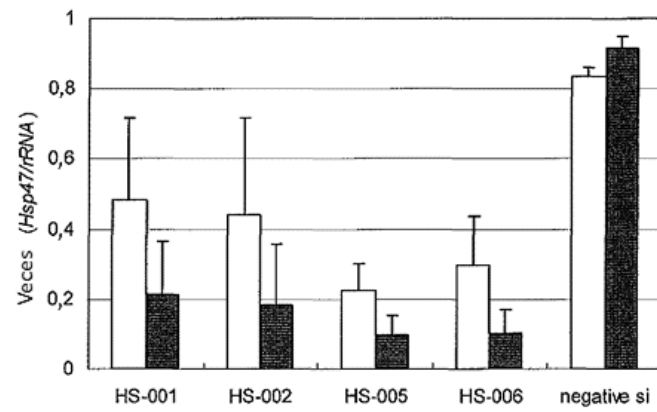
[Figura 15]



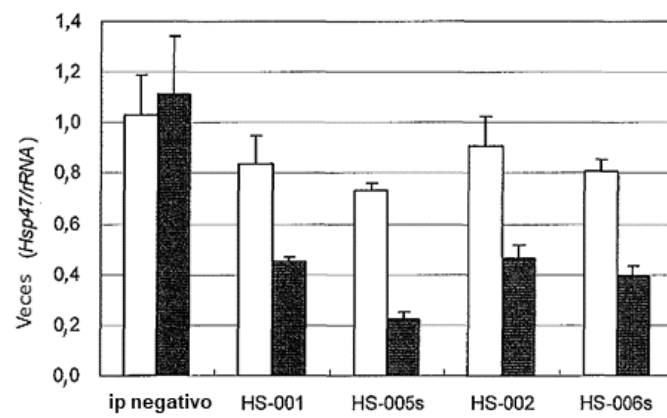
[Figura 16]



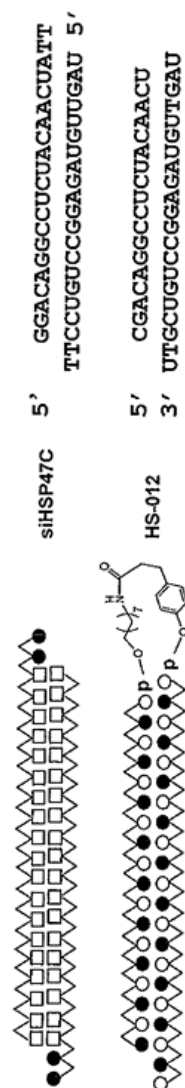
[Figura 17]



[Figura 18]



[Figura 19]



[Figura 20]

