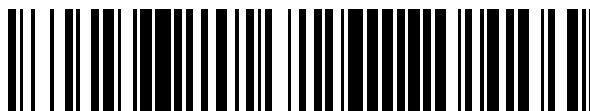


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 017**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2011** **E 15169933 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018** **EP 2933333**

54 Título: **Molécula de ácido nucleico de cadena simple para el control de la expresión de genes**

30 Prioridad:

08.07.2010 JP 2010156122

03.08.2010 JP 2010174915

13.10.2010 JP 2010230808

13.10.2010 JP 2010230806

02.12.2010 JP 2010269824

02.12.2010 JP 2010269823

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 670 017 T3

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

DESCRIPCIÓN

Molécula de ácido nucleico de cadena simple para el control de la expresión de genes

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico de cadena simple que inhibe la expresión de genes, a una composición que contiene la molécula de ácido nucleico de cadena simple y al uso de la molécula de ácido nucleico de cadena simple.

Técnica anterior

- 10 Como técnica para inhibir la expresión de genes, se conoce la interferencia por ARN (ARNi), por ejemplo (Fire *et al*, Nature, vol. 391, 806-811, 1998). La inhibición de la expresión de genes por interferencia con ARN en general se realiza por administración de una molécula de ARN pequeño de cadena doble a una célula o similar, por ejemplo. La molécula de ARN bicatenario en general es llamada ARNpi (ARN pequeño de interferencia). Se ha descrito que no sólo el ARNpi sino también una molécula de ARN circular que se torna parcialmente bicatenaria por renaturalización intermolecular también puede inhibir la expresión de genes (JP 2008-278784 A). Sin embargo, las moléculas de ARN usadas en estas técnicas para inducir la inhibición de la expresión de genes tienen los siguientes problemas.

- 15 En primer lugar, con el objetivo de producir el ARNpi, es necesario sintetizar una cadena sentido y una cadena antisentido por separado e hibridar estas cadenas al final del proceso. Por lo tanto, existe el problema de la baja eficacia de fabricación. Asimismo, cuando el ARNpi se administra a una célula, es necesario administrar el ARNpi a la célula a la vez que se reprime la disociación a ARN monocatenarios, lo que requiere una tarea laboriosa para ajustar las condiciones de manipuleo del ARNpi. Por otra parte, la molécula de ARN circular tiene como problema que su síntesis es difícil.

Los documentos EP2256191 A y EP2233573 A describen ARNpi circulares y composiciones que comprenden los ARNpi circulares para inhibir la expresión de un gen diana.

El documento WO 2006/074108 describe un ARN monocatenario que comprende una secuencia inhibidora de la expresión y dos estructuras replegadas en los extremos.

- 25 Los documentos WO 2004/015075, WO 2004/015107 y WO 2006/088490 describen moléculas de ARN de horquilla corta.

Breve descripción de la invención

Con lo anterior en mente, es un objeto de la presente invención dar a conocer una nueva molécula de ARN que pueda inhibir la expresión de genes y que también se pueda producir fácil y eficazmente.

- 30 Con el fin de lograr el objeto anterior, la presente invención da a conocer una molécula de ARN de cadena simple que comprende solamente una secuencia inhibidora de expresión que inhibe la expresión de un gen diana, en donde:

– el extremo 5' y el extremo 3' no están unidos uno al otro,

- 35 – la molécula de ARN de cadena simple comprende, en secuencia desde un lateral 5' a un lateral 3': una región lateral 5' (Xc); una región interna (Z) que comprende la secuencia inhibidora de expresión; y una región lateral 3' (Yc),

– la región interna (Z) está compuesta por una región lateral interna 5' (X) y una región lateral interna 3' (Y) que están unidas una a la otra,

- 40 – la región lateral 5' (Xc) es complementaria a la región lateral interna 5' (X) y se forma una doble cadena por repliegue de la región (Xc) hacia la región (X) y auto-renaturalización de las regiones (Xc) y (X),

– la región lateral 3' (Yc) es complementaria a la región lateral 3' (Y) y se forma una doble cadena por repliegue de la región (Yc) hacia la región (Y) y auto-renaturalización de las regiones (Yc) y (Y),

– una región conectora (Lx) está presente entre la región lateral 5' (Xc) y la región lateral interna 5' (X),

- 45 – la región lateral 5' (Xc) y la región lateral interna 5' (X) están unidas una a la otra mediante la región conectora (Lx),

– la región conectora (Lx) comprende un resto no nucleotídico,

– una región conectora (Ly) está presente entre la región lateral 3' (Yc) y la región lateral interna 3' (Y),

– la región lateral 3' (Yc) y la región lateral interna 3' (Y) están unidas una a la otra mediante la región conectora (Ly) y

– el número de bases (Z) en la región interna (Z), el número de bases (X) en la región lateral interna 5' (X), el número de bases (Y) en la región lateral interna 3' (Y), el número de bases (Xc) en la región lateral 5' (Xc) y el número de bases (Yc) en la región lateral 3' (Yc) satisfacen las condiciones (a) a (d):

(a) Se satisfacen las condiciones de expresiones (1) y (2):

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

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

(b) $Z = 19$ a 30 ;

(c) $Xc = 1$ a 7 o $Yc = 1$ a 9 ; y

(d) $Z - (Xc + Yc) = 0$ o 1 a 10 .

La presente invención también da a conocer una composición para inhibir la expresión de un gen diana. La composición contiene la molécula de ARN de cadena simple de acuerdo a la presente invención.

10 La presente invención también da a conocer una composición farmacéutica que contiene la molécula de ARN de cadena simple de acuerdo a la presente invención.

La presente invención también da a conocer:

– un método *in vitro* para inhibir la expresión de un gen diana, en donde la molécula de ARN de cadena simple de acuerdo a la presente invención se usa y administra a una célula, un tejido o un órgano; y

15 – un método *in vitro* para inducir la interferencia del ARN que inhibe la expresión de un gen diana, en donde el método comprende usar la molécula de ARN de cadena simple de acuerdo con la presente invención.

La presente invención también da a conocer una molécula de ácido nucleico para uso en un método para tratar una enfermedad, en donde:

– la molécula de ácido nucleico es una molécula de ARN de cadena simple de acuerdo con la presente invención y

20 – la molécula de ARN de cadena simple incluye, como secuencia inhibidora de expresión, una secuencia que inhibe la expresión de un gen que provoca la enfermedad.

Con el uso de la molécula de ARN de cadena simple de la presente invención, es posible inhibir la expresión génica. Asimismo, dado que la molécula de ARN de cadena simple no es circular, se puede sintetizar fácilmente. Además, dado que es una cadena simple, no es necesaria la etapa de renaturalización requerida para la producción de una doble cadena, de modo que puede ser producida eficazmente.

25 Los inventores de la presente invención fueron los primeros en descubrir que la expresión de genes se puede inhibir de acuerdo a la estructura de la molécula de ARN de cadena simple de la presente invención. Se especula que el efecto de inhibición de genes de la molécula de ARN de cadena simple de la presente invención se produce por un fenómeno similar a la interferencia por ARN. Se debe destacar, sin embargo, que la inhibición de la expresión de genes en la presente invención no se limita ni restringe a la interferencia de ARN.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La Figura 1 muestra vistas esquemáticas que ilustran un ejemplo de la molécula de ARN de cadena simple (no de la presente invención).

35 [Figura 2] La Figura 2 muestra vistas esquemáticas que ilustran otro ejemplo de la molécula de ARN de cadena simple de la presente invención.

[Figura 3] La Figura 3 muestra vistas esquemáticas que ilustran otros ejemplos de la molécula de ARN de cadena simple de la presente invención.

[Figura 4] La Figura 4 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen de GAPDH en un ejemplo de la presente invención.

40 [Figura 5] La Figura 5 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen de GAPDH en otro ejemplo de la presente invención.

[Figura 6] La Figura 6 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen de GAPDH en células A549 en otro ejemplo de la presente invención.

[Figura 7] La Figura 7 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen de GAPDH en células 293 en el ejemplo de la presente invención.

5 [Figura 8] La Figura 8 es un gráfico que muestra el nivel de expresión del gen TGF- β 1 en otro ejemplo de la presente invención.

[Figura 9] La Figura 9 es un gráfico que muestra el nivel de expresión de TGF- β 1 por unidad de peso de pulmón en cada grupo de administración en otro ejemplo de la presente invención.

10 [Figura 10] La Figura 10 es un gráfico que muestra el número de células en una muestra de FLBA en cada grupo de administración en el ejemplo de la presente invención.

[Figura 11] La Figura 11 es un gráfico que muestra el número de neutrófilos en una muestra de FLBA en cada grupo de administración en el ejemplo de la presente invención.

15 [Figura 12] La Figura 12 muestra fotografías que exponen cada una el resultado de la tinción de Giemsa de células en una muestra de FLBA en el ejemplo de la presente invención. La Figura 12A muestra el resultado obtenido respecto al grupo de administración 4 (LPS (+)/ARN(-)). La Figura 12B muestra el resultado obtenido respecto al grupo de administración 6 (LPS (+)/control negativo NK-0035 (+)). La Figura 12C muestra el resultado obtenido respecto al grupo de administración 5 (LPS (+)/NK-0033 (+)).

20 [Figura 13] La Figura 13 muestra fotografías que exponen cada el resultado de la tinción con HE del tejido de pulmón en el ejemplo de la presente invención. La Figura 13A muestra el resultado obtenido respecto al grupo de administración 4 (LPS (+)/ARN(-)). La Figura 13B muestra el resultado obtenido respecto al grupo de administración 6 (LPS (+)/control negativo NK-0035 (+)). La Figura 13C muestra el resultado obtenido respecto al grupo de administración 5 (LPS (+)/NK-0033 (+)).

25 [Figura 14] La Figura 14A muestra el resultado de la medición del nivel de expresión del gen de TGF- β 1 en otro ejemplo de la presente invención. La Figura 14B muestra el resultado de la medición del nivel de expresión del gen de IFN- α en el ejemplo de la presente invención. La Figura 14C muestra el resultado de la medición del nivel de expresión del gen de IFN- β en el ejemplo de la presente invención.

[Figura 15] La Figura 15 es un gráfico que muestra el valor relativo del nivel de expresión del gen de TGF- β 1 en otro ejemplo de la presente invención.

30 [Figura 16] La Figura 16 es un gráfico que muestra el valor relativo del nivel de expresión del gen de TGF- β 1 en el ejemplo de la presente invención.

[Figura 17] La Figura 17 es un gráfico que muestra el nivel de expresión del gen de TGF- β 1 por unidad de peso de pulmón en cada grupo de administración en otro ejemplo de la presente invención.

35 [Figura 18] La Figura 18A es un gráfico que muestra la cantidad de TNF- α en una muestra de FLBA en cada grupo de administración en el ejemplo de la presente invención. La Figura 18B es un gráfico que muestra la cantidad de IFN- β en una muestra de FLBA en cada grupo de administración en el ejemplo de la presente invención.

[Figura 19] La Figura 19 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen LAMA1 en células 293 en otro ejemplo de la presente invención.

40 [Figura 20] La Figura 20 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen LMNA en células A549 en otro ejemplo de la presente invención.

[Figura 21] La Figura 21 muestra el ARNcs (ARN de cadena simple) usado en otro ejemplo de la presente invención.

[Figura 22] La Figura 22 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen de GAPDH en el ejemplo de la presente invención.

45 [Figura 23] La Figura 23 muestra el ARNcs usado en otro ejemplo de la presente invención.

[Figura 24] La Figura 24 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen de GAPDH en el ejemplo de la presente invención.

[Figura 25] La Figura 25 muestra el ARNcs usado en otro ejemplo de la presente invención.

[Figura 26] La Figura 26 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen de GAPDH en el ejemplo

de la presente invención.

[Figura 27] La Figura 27 muestra el ARNcs usado en otro ejemplo de la presente invención.

[Figura 28] La Figura 28 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen de GAPDH en el ejemplo de la presente invención.

5 [Figura 29] La Figura 29 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen de GAPDH en otro ejemplo de la presente invención.

[Figura 30] La Figura 30 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen de GAPDH en células HCT116 en otro ejemplo de la presente invención.

10 [Figura 31] La Figura 31 es un electroferograma que muestra resistencia a ribonucleasa en otro ejemplo de la presente invención.

[Figura 32] La Figura 32 es un electroferograma que muestra resistencia a nucleasa S7 en otro ejemplo de la presente invención.

Modo de realización de la invención

15 Los términos usados en la presente memoria descriptiva tienen cada uno el significado usado en general en la técnica, a menos que se especifique de otro modo.

1. Molécula Nccs

La molécula de ARN de cadena simple de la presente invención es, como se describió anteriormente, una molécula de ARN de cadena simple que incluye una secuencia inhibidora de expresión que inhibe la expresión de un gen diana. La molécula de ARN de cadena simple incluye, en secuencia del lateral 5' al lateral 3': una región lateral 5' (Xc); una región interna (Z); y una región lateral 3' (Yc). La región interna (Z) está compuesta por una región lateral interna 5' (X) y una región lateral interna 3' (Y) que están unidas entre sí. La región lateral 5' (Xc) es complementaria a la región lateral interna 5' (X). La región lateral 3' (Yc) es complementaria a la región lateral interna 3' (Y). La de región interna (Z) incluye la secuencia inhibidora de expresión.

En la presente invención, "inhibición de la expresión de un gen diana" hace referencia a alterar la expresión del gen diana, por ejemplo. El mecanismo por el cual se obtiene la inhibición no está particularmente limitado y puede ser por disminución de la expresión o silenciamiento, por ejemplo. La inhibición de la expresión del gen diana se puede verificar por: una disminución en la cantidad de un producto de transcripción derivado del gen diana; una disminución en la actividad del producto de transcripción; una disminución en la cantidad de un producto de traducción generado del gen diana; una disminución en la actividad del producto de traducción; o similar, por ejemplo. Las proteínas pueden ser proteínas maduras, proteínas precursoras antes de ser sometidas a procesamiento o modificación postraducción, o similar, por ejemplo.

La molécula de ARN de cadena simple de la presente invención de aquí en lo sucesivo también se puede denominar "molécula Nccs" de la presente invención. La molécula Nccs de la presente invención se puede usar para inhibir la expresión de un gen diana *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo, de modo que puede ser denominada "molécula Nccs para inhibir la expresión de un gen diana" o "inhibidor de la expresión de un gen diana". Adicionalmente, la molécula Nccs de la presente invención puede inhibir la expresión de un gen diana, por ejemplo, mediante interferencia por ARN, de modo que puede denominarse "molécula Nccs para interferencia por ARN", "molécula que induce la interferencia por ARN", "agente de interferencia por ARN", o "agente inductor de interferencia por ARN". La molécula Nccs de la presente invención también puede inhibir un efecto secundario tal como inducción de interferones, por ejemplo.

En la molécula Nccs de la presente invención, el extremo 5' y el extremo 3' no están ligados entre sí. Por lo tanto, la molécula Nccs de la presente invención también puede denominarse "molécula lineal de ácido nucleico de cadena simple". La molécula Nccs de la presente invención se configura de modo que, por ejemplo, en la región interna (Z), la región lateral interna 5' (X) y la región lateral interna 3' (Y) están unidas directamente entre sí.

En la molécula Nccs de la presente invención, la región lateral 5' (Xc) es complementaria a la región lateral interna 5' (X) y la región lateral 3' (Yc) es complementaria a la región lateral interna 3' (Y). En el lateral 5', se forma una doble cadena por repliegue de la región (Xc) hacia la región (X) y auto-renaturalización de las regiones (Xc) y (X). En el lateral 3', se forma una doble cadena por repliegue de la región (Yc) hacia la región (Y) y auto-renaturalización de las regiones (Yc) e (Y). La molécula Nccs de la presente invención puede formar una doble cadena en forma intramolecular como se describió anteriormente. Por lo tanto, la estructura de la molécula Nccs es totalmente diferente de la estructura de un ARN bicatenario obtenido por renaturalización de dos ARN de cadena simple separados, tal como ARNpi convencionalmente usado en interferencia por ARN, por ejemplo.

En la molécula Nccs de la presente invención, la secuencia inhibidora de expresión es una secuencia que exhibe una actividad de inhibición de la expresión de un gen diana cuando la molécula Nccs de la presente invención es introducida dentro de una célula *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo. La secuencia inhibidora de expresión no está

particularmente limitada y se puede establecer como apropiada dependiendo del tipo de gen diana cuya expresión va a ser inhibida. Como secuencia inhibidora de expresión, se puede usar como apropiada una secuencia involucrada en la interferencia por ARN producida por ARNpi, por ejemplo. En general, la interferencia por ARN es un fenómeno en el cual un ARN bicatenario largo (ARNcd) es escindido en una célula por *Dicer* para producir un ARN de cadena doble (ARNpi: ARN pequeño de interferencia) compuesto por aproximadamente 19 a 21 pares de bases y que tiene un extremo 3' que sobresale y uno de los ARN de cadena simple que componen el ARNpi se une al ARNm diana para degradar el ARNm, de manera que se inhibe la traducción del ARN. Como secuencia del ARN de cadena simple del ARNpi que se une al ARNm diana, se han descrito diferentes tipos de secuencias para diferentes tipos de genes diana, por ejemplo. En la presente invención, por ejemplo, la secuencia del ARN de cadena simple del ARNpi se puede usar como la secuencia inhibidora de expresión.

Se debe destacar que el punto de la presente invención no es la información de secuencia de la secuencia inhibidora de expresión para el gen diana. En realidad, la presente invención se refiere a la estructura de una molécula ácido nucleico para permitir una actividad inhibidora del gen diana efectuada por la secuencia inhibidora de expresión para funcionar en una célula, por ejemplo. Por lo tanto, en la presente invención, como secuencia inhibidora de expresión se pueden usar no solamente las secuencias del ARN de cadena simple del ARNpi conocidas al momento de la presentación de la presente solicitud sino también secuencias que podrían ser identificadas en el futuro, por ejemplo.

La secuencia inhibidora de expresión preferentemente es al menos 90% complementaria, más preferentemente 95% complementaria, aún más preferentemente 98% complementaria y particularmente preferentemente 100% complementaria a una región predeterminada del gen diana, por ejemplo. Cuando la secuencia inhibidora de expresión satisface la complementariedad descrita anteriormente, se puede reducir suficientemente un efecto no diana, por ejemplo.

Los ejemplos específicos de la secuencia inhibidora de expresión son como sigue: cuando el gen diana es el gen de GAPDH, se puede usar una secuencia 19-mero mostrada en la SEC ID NÚM: 1, por ejemplo; cuando el gen diana es el gen de TGF- β 1, se puede usar una secuencia 21-mer mostrada en la SEC ID NÚM: 16, por ejemplo; cuando el gen diana es el gen LAMA1, se puede usar una secuencia 19-mer mostrada en la SEC ID NÚM: 5, por ejemplo; y cuando el gen diana es el gen de LMNA, se puede usar una secuencia 19-mer mostrada en la SEC ID NÚM: 6, por ejemplo.

5'-GUUGUCAUACUUCUCAUGG-3' (SEC ID NÚM: 1)

5'-AAAGUCAUGUACAGCUGCUU-3' (SEC ID NÚM: 16)

5'-AUUGUAACGAGACAAACAC-3' (SEC ID NÚM: 5)

5'-UUGCGCUUUUUGGUGACGC-3' (SEC ID NÚM: 6)

Se especula que la inhibición de la expresión de un gen diana por la molécula Nccs de la presente invención se logra por interferencia por ARN o por un fenómeno similar a la interferencia por ARN (fenómeno similar a interferencia por ARN) provocado por la estructura de la molécula Nccs en la cual la secuencia inhibidora de expresión se incluye en al menos una de la región interna (Z), la región lateral 5' (Xc) y la región lateral 3' (Yc), por ejemplo. Se debe destacar, sin embargo, que la presente invención no está limitada por este mecanismo. A diferencia del llamado ARNpi, la molécula Nccs de la presente invención no se introduce a una célula o similar en la forma de ARNcd compuesta por dos ARN de cadena simple y no siempre es necesaria para eliminar por escisión la secuencia inhibidora de expresión en la célula, por ejemplo. Por lo tanto, se puede decir que la molécula Nccs de la presente invención exhibe una función similar a la interferencia por ARN, por ejemplo.

En la molécula Nccs de la presente invención, la secuencia inhibidora de expresión se incluye en la región interna (Z), como se describió anteriormente. La molécula Nccs de la presente invención incluye una secuencia inhibidora de expresión.

Como se describió anteriormente, la región interna (Z) está compuesta por la región lateral interna 5' (X) y la región lateral interna 3' (Y) que están unidas entre sí. Las regiones (X) e (Y) están unidas directamente una con la otra sin intervención de una secuencia entre ellas, por ejemplo. La región interna (Z) se describe como "compuesta por la región lateral interna 5' (X) y la región lateral interna 3' (Y) que están unidas entre sí" exclusivamente para indicar la secuencia contexto entre la región lateral 5' (Xc) y la región lateral 3' (Yc). La secuencia inhibidora de expresión puede ser dispuesta de modo de extenderse a lo largo de las regiones (X) e (Y) en la región interna (Z).

En la molécula Nccs de la presente invención, la región lateral 5' (Xc) es complementaria a la región lateral interna 5' (X). Sólo es necesario que la región (Xc) tenga una secuencia complementaria a la región entera o parte de la región (X). Específicamente, por ejemplo, es preferible que la región (Xc) incluya o esté compuesta por una secuencia complementaria a la región entera o parte de la región (X). La región (Xc) puede ser perfectamente complementaria a la región entera o parte de la región (X), o una o más bases en la región (Xc) pueden no ser complementarias a la misma, por ejemplo. Preferentemente, la región (Xc) es perfectamente complementaria a la misma. En la molécula Nccs de la presente invención, la región lateral 3' (Yc) es complementaria a la región lateral interna 3' (Y). Sólo es necesario que la región (Yc) tenga una secuencia complementaria a la región entera o parte de la región (Y).

Específicamente, por ejemplo, es preferible que la región (Yc) incluya o esté compuesta por una secuencia complementaria a la región entera o parte de la región (Y). La región (Yc) puede ser perfectamente complementaria a la región entera o parte de la región (Y), o una o más bases en la región (Yc) pueden no ser complementarias a la misma, por ejemplo. Preferentemente, la región (Yc) es perfectamente complementaria a la misma. La expresión

5 “una o más bases” hace referencia, por ejemplo, a entre 1 y 3 bases, preferentemente 1 base o 2 bases.

En la molécula Nccs de la presente invención, la región lateral 5' (Xc) y la región lateral interna 5' (X) están unidas entre sí por medio de una región conectora (Lx).

En la molécula Nccs de la presente invención, la región lateral 3' (Yc) y la región lateral interna 3' (Y) estén unidas por medio de una región conectora (Ly).

10 La molécula Nccs de la presente invención tiene las dos regiones conectoras (Lx) y (Ly).

Las regiones conectoras (Lx) y (Ly) tienen, cada una, una estructura tal que la auto-renaturalización no se produce dentro de ellas mismas.

La Figura 1 muestra vistas esquemáticas que ilustran un ejemplo de la molécula Nccs no de acuerdo con la presente invención, que no incluye región conectora. La Figura 1A es una vista esquemática que muestra el orden de las regiones respectivas del kadi 5' al lado 3' en la molécula Nccs. La Figura 1B es una vista esquemática que muestra el estado cuando se forman cadenas dobles en la molécula Nccs. Como se muestra en la Figura 1B, en la molécula Nccs, la región lateral 5' (Xc) se repliega, mediante lo cual se forma una cadena doble entre la región lateral 5' (Xc) y la región lateral interna 5' (X) y la región lateral 3' (Yc) se repliega, mediante lo cual se forma una cadena doble entre la región lateral 3' (Yc) y la región lateral interna 3' (Y). Las vistas esquemáticas mostradas en la Figura 1 ilustran

20 exclusivamente el orden en el cual están unidas las regiones respectivas entre sí y la relación posicional de las regiones respectivas que forman las cadenas dobles y no limitan la longitud y el estilo de cada región, por ejemplo.

La Figura 2 muestra vistas esquemáticas que ilustran un ejemplo de la molécula Nccs de la presente invención, que incluye las regiones conectoras. La Figura 2A es una vista esquemática que muestra el orden de las regiones respectivas del lateral 5' al lateral 3' en la molécula Nccs, como un ejemplo ilustrativo. La Figura 2B es una vista esquemática que muestra el estado cuando se forman las cadenas dobles en la molécula Nccs. Como se muestra en la Figura 2B, en la molécula Nccs, se forman las cadenas dobles entre la región lateral 5' (Xc) y la región lateral interna 5' (X) y entre la región lateral interna 3' (Y) y la región lateral 3' (Yc), respectivamente y la Lx región y la región Ly son una estructura en bucle cada una. Las vistas esquemáticas mostradas en la Figura 2 ilustran

25 exclusivamente el orden en el cual están unidas las regiones respectivas y la relación posicional de las regiones respectivas que forman las cadenas dobles y no limitan la longitud ni el estilo de cada región, por ejemplo.

En la molécula Nccs de la presente invención, el número de bases en cada una de la región lateral 5' (Xc), la región lateral interna 5' (X), la región lateral interna 3' (Y) y la región lateral 3' (Yc) no está particularmente limitado y puede ser como a continuación, por ejemplo. En la presente invención, “el número de bases” hace referencia a la “longitud”, por ejemplo y también puede ser referido como la “longitud de bases”.

35 Como se describió anteriormente, la región lateral 5' (Xc) puede ser complementaria con la región entera de la región lateral interna 5' (X), por ejemplo. En este caso, se prefiere que, por ejemplo, la región (Xc) tenga la misma longitud de bases que la región (X) y esté compuesta por una secuencia de bases complementaria a la región entera que se extiende entre el extremo 5' y el extremo 3' de la región (X). Es más preferible que la región (Xc) tenga la misma longitud de bases que la región (X) y que todas las bases en la región (Xc) sean complementarias a todas las bases en la región (X), es decir, la región (Xc) es perfectamente complementaria a la región (X), por ejemplo. Se debe destacar, sin embargo, que la configuración de la región (Xc) no se limita a la misma y una o unas pocas bases en la región (Xc) pueden no ser complementarias a las bases correspondientes en la región (X), por ejemplo, como se describió anteriormente.

Adicionalmente, como se describió anteriormente, la región lateral 5' (Xc) puede ser complementaria a parte de la región lateral interna 5' (X), por ejemplo. En este caso, se prefiere que, por ejemplo, la región (Xc) tenga la misma longitud de bases que la parte de la región (X), es decir, que la región (Xc) esté compuesta por una secuencia de bases cuya longitud de bases sea más corta que la longitud de bases de la región (X) por una o más bases. Es más preferible que la región (Xc) tenga la misma longitud de bases que la parte de la región (X) y que todas las bases en la región (Xc) sean complementarias a todas las bases en la parte de la región (X), es decir, la región (Xc) sea perfectamente complementaria a la parte de la región (X), por ejemplo. La parte de la región (X) preferentemente es una región (segmento) que tiene una secuencia de bases compuesta por bases sucesivas comenzando desde la base en el extremo 5' (la 1ª base) en la región (X), por ejemplo.

Como se describió anteriormente, la región lateral 3' (Yc) puede ser complementaria a la región entera de la región lateral interna 3' (Y), por ejemplo. En este caso, se prefiere que, por ejemplo, la región (Yc) tenga la misma longitud de bases que la región (Y) y que esté compuesta por una secuencia de bases complementaria a la región entera que se extiende desde el extremo 5' al extremo 3' de la región (Y). Es más preferible que la región (Yc) tenga la misma longitud de bases que la región (Y) y que todas las bases en la región (Yc) sean complementarias a todas las bases en la región (Y), es decir, que la región (Yc) sea perfectamente complementaria a la región (Y), por ejemplo. Se debe

destacar, sin embargo, que la configuración de la región (Yc) no se limita a la misma y que una o unas pocas bases en la región (Yc) pueden no ser complementarias a las bases correspondientes en la región (Y), por ejemplo, como se describió anteriormente.

Adicionalmente, como se describió anteriormente, la región lateral 3' (Yc) puede ser complementaria a parte de la región lateral interna 3' (Y), por ejemplo. En este caso, se prefiere que, por ejemplo, la región (Yc) tenga la misma longitud de bases que la parte de la región (Y), es decir, que la región (Yc) esté compuesta por una secuencia de bases cuya longitud de bases sea más corta que la longitud de bases de la región (Y) por una o más bases. Es más preferible que la región (Yc) tenga la misma longitud de bases que la parte de la región (Y) y que todas las bases en la región (Yc) sean complementarias a todas las bases en la parte de la región (Y), es decir, que la región (Yc) sea perfectamente complementaria a la parte de la región (Y), por ejemplo. La parte de la región (Y) preferentemente es una región (segmento) que tiene una secuencia de bases compuesta por bases sucesivas que comienzan de la base en el extremo 3' (la 1ª base) en la región (Y), por ejemplo.

En la molécula Nccs de la presente invención, la relación del número de bases (Z) en la región interna (Z) con el número de bases (X) en la región lateral interna 5' (X) y el número de bases (Y) en la región lateral interna 3' (Y) y la relación del número de bases (Z) en la región interna (Z) con el número de bases (X) en la región lateral interna 5' (X) y el número de bases (Xc) en la región lateral 5' (Xc) satisfacen las condiciones de las expresiones (1) y (2), por ejemplo.

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

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

En la molécula Nccs de la presente invención, la relación de longitudes entre el número de bases (X) en la región lateral interna 5' (X) y el número de bases (Y) en la región lateral interna 3' (Y) no está particularmente limitado y puede satisfacer cualquiera de las condiciones de las siguientes expresiones, por ejemplo.

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

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

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

En la molécula Nccs de la presente invención, la relación entre el número de bases (X) en la región interna del extremo 5' (X) y el número de bases (Xc) en la región del extremo 5' (Xc) y la relación entre el número de bases (Y) en la región interna del extremo 3' (Y) y el número de bases (Yc) en la región del extremo 3' (Yc) satisfacen cualquiera de las siguientes condiciones (a) a (d), por ejemplo.

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

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

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

(b) Las condiciones de las expresiones (5) y (6) se satisfacen.

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

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

(c) Las condiciones de las expresiones (7) y (8) se satisfacen.

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

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

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

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

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

En las condiciones (a) a (d) descritas anteriormente, la diferencia entre el número de bases (X) en la región lateral interna 5' (X) y el número de bases (Xc) en la región lateral 5' (Xc) y la diferencia entre el número de bases (Y) en la región lateral interna 3' (Y) y el número de bases (Yc) en la región lateral 3' (Yc) preferentemente satisfacen las siguientes condiciones (a) a (d), por ejemplo.

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

$X - X_c = 1$ a 10, preferentemente 1, 2, 3 ó 4,

y más preferentemente 1, 2 o 3 ... (11)

$Y - Y_c = 0$... (12)

5 (b) Las condiciones de las expresiones (13) y (14) se satisfacen.

$X - X_c = 0$... (13)

$Y - Y_c = 1$ a 10, preferentemente 1, 2, 3 o 4,

y más preferentemente 1, 2 o 3 ... (14)

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

10 $X - X_c = 1$ a 10, preferentemente 1, 2 o 3,

y más preferentemente 1 o 2 ... (15)

$Y - Y_c = 0$... (16)

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

$X - X_c = 0$... (17)

15 $Y - Y_c = 0$... (18)

Respecto a las moléculas Nccs que satisfacen las condiciones (a) a (d), los ejemplos de sus estructuras se muestran respectivamente en las vistas esquemáticas de la Figura 3. La Figura 3 muestra las moléculas Nccs que incluyen las regiones conectoras (Lx) y (Ly). La Figura 3A muestra un ejemplo de la molécula Nccs que satisface la condición (a); la Figura 3B muestra un ejemplo de la molécula Nccs que satisface la condición (b); la Figura 3C muestra un ejemplo de la molécula Nccs que satisface la condición (c); y la Figura 3D muestra un ejemplo de la molécula Nccs que satisface la condición (d). En la Figura 3, las líneas punteadas indican un estado en el cual las cadenas dobles están formadas por auto-renaturalización. Las moléculas Nccs mostradas en la Figura 3 están todas dirigidas a los ejemplos en los cuales la relación entre el número de bases (X) en la región lateral interna 5' (X) y el número de bases (Y) en la región lateral interna 3' (Y) satisface " $X < Y$ " de la Expresión (20). Se debe destacar, sin embargo, que la relación no se limita al mismo y " $X = Y$ " de la Expresión (19) o " $X > Y$ " de la Expresión (21) se pueden satisfacer. Las vistas esquemáticas mostradas en la Figura 3 ilustran exclusivamente la relación entre la región lateral interna 5' (X) y la región lateral 5' (Xc) y la relación entre la región lateral interna 3' (Y) y la región lateral 3' (Yc) y no limitan la longitud, la forma, ni el estilo de cada región, ni tampoco la presencia o ausencia de las regiones conectoras (Lx) y (Ly), por ejemplo.

30 Cada una de las moléculas Nccs que satisfacen las condiciones (a) a (c) está configurada para que, por ejemplo, cuando las cadenas dobles son formadas por la región lateral 5' (Xc) y la región lateral interna 5' (X) y por la región lateral 3' (Yc) y la región lateral interna 3' (Y), respectivamente, la región interna (Z) incluya al menos una base que no se pueda alinear con la de la región lateral 5' (Xc) y la región lateral 3' (Yc). En la región interna (Z), la base que no se puede alinear (una base que no forma la cadena doble) en lo sucesivo también se denomina "base desapareada". En la Figura 3, una región compuesta por base(s) desapareada(s) se muestra como "F". El número de bases en la región (F) no está particularmente limitado. El número de bases (F) en la región (F) es como sigue, por ejemplo: " $X_c - X$ " en el caso de la molécula Nccs que satisface la condición (a); " $Y - Y_c$ " en el caso de la molécula Nccs que satisface la condición (b); y el total de " $X_c - X$ " e " $Y - Y_c$ " en el caso de la molécula Nccs que satisface la condición (c).

40 Por el contrario, la molécula Nccs que satisface la condición (d) está configurada para que, por ejemplo, la región entera de la región interna (Z) esté alineada con la región lateral 5' (Xc) y la región lateral 3' (Yc), en otras palabras, la región entera de la región interna (Z) forma una cadena doble. En la molécula Nccs que satisface la condición (d), el extremo 5' de la región lateral 5' (Xc) y el extremo 3' de la región lateral 3' (Yc) no están unidos entre sí.

45 Los ejemplos de las longitudes de las regiones respectivas en la molécula Nccs de la presente invención se exponen a continuación. Se debe destacar, no obstante, que la presente invención no se encuentra de ningún modo limitada. En la presente invención, por ejemplo, el intervalo numérico respecto al número de bases describe todos los números enteros positivos que caen dentro de ese intervalo. Por ejemplo, la descripción entre "1 y 4 bases" describe todas de "1, 2, 3 y 4 bases" (lo mismo aplica de aquí en adelante).

50 El número total de las bases en la región lateral 5' (Xc), las bases en la región lateral 3' (Yc) y las bases desapareadas (F) en la región interna (Z) es igual al número de las bases en la región interna (Z), por ejemplo. Por lo

tanto, la longitud de la región lateral 5' (Xc) y la longitud de la región lateral 3' (Yc) se pueden determinar como apropiadas dependiendo de la longitud de la región interna (Z), el número de las bases desapareadas (F) y las posiciones de las bases desapareadas, por ejemplo.

5 El número de las bases en la región interna (Z) es 19 o más. El límite inferior del número de las bases es 19, preferentemente 20 y más preferentemente 21. El límite superior del número de las bases es 30. Un ejemplo específico del número de las bases en la región interna (Z) es 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30.

10 La región interna (Z) puede ser una región compuesta por la secuencia inhibidora de expresión solamente o una región que incluya la secuencia inhibidora de expresión, por ejemplo. El número de bases de la secuencia inhibidora de expresión es, por ejemplo, entre 19 y 30, preferentemente 19, 20 o 21. La secuencia inhibidora de expresión además puede tener una secuencia adicional en su lateral 5' y/o en su lateral 3'. El número de bases en la secuencia adicional oscila preferentemente entre 1 y 21, más preferentemente entre 1 y 11 e incluso más preferentemente entre 1 y 7.

El número de bases en la región lateral 5' (Xc) oscila entre 1 y 7, preferentemente entre 1 y 4 y particular y preferentemente 1, 2 o 3.

15 El número de bases en la región lateral 3' (Yc) oscila preferentemente entre 1 y 7, más preferentemente entre 1 y 4 y particular y preferentemente 1, 2, o 3.

20 Como se describió anteriormente, la relación entre el número de bases en la región interna (Z), el número de bases en la región lateral 5' (Xc) y el número de bases en la región lateral 3' (Yc) se puede expresar con la Expresión (2): " $Z \geq Xc + Yc$ ", por ejemplo. Específicamente, el número de bases representado por " $Xc + Yc$ " es igual al número de bases en la región interna (Z), o menor que el número de bases en la región interna (Z), por ejemplo. En el último caso, " $Z - (Xc + Yc)$ " oscila entre 1 y 10, preferentemente entre 1 y 4 y más preferentemente 1, 2 o 3. " $Z - (Xc + Yc)$ " corresponde al número de bases (F) en la región de bases desapareadas (F) en la región interna (Z), por ejemplo.

25 En la molécula Nccs de la presente invención, las longitudes de las regiones conectoras (Lx) y (Ly) no están particularmente limitadas. La longitud de la región conectora (Lx) preferentemente es tal que, por ejemplo, la región lateral interna 5' (X) y la región lateral 5' (Xc) pueden formar una cadena doble. La longitud de la región conectora (Ly) preferentemente es tal que, por ejemplo, la región lateral interna 3' (Y) y la región lateral 3' (Yc) pueden formar una cadena doble. Cuando los componentes (bloques de construcción) de las regiones conectoras (Lx) y (Ly) incluyen bases, el número de bases en la región conectora (Lx) puede ser igual o diferente del número de bases en la región conectora (Ly). Además, sus secuencias de bases pueden ser las mismas o diferentes. El límite inferior del número de bases en cada una de las regiones conectoras (Lx) y (Ly) es, por ejemplo, 1, preferentemente 2 y más preferentemente 3 y el límite superior del mismo es, por ejemplo, 100, preferentemente 80 y más preferentemente 50. El número de bases en cada una de las regiones conectoras específicamente es entre 1 y 50, entre 1 y 30, entre 1 y 20, entre 1 y 10, entre 1 y 7 o entre 1 y 4, por ejemplo, pero no se limita a estos ejemplos.

35 La longitud total de la molécula Nccs de la presente invención no está particularmente limitada. En la molécula Nccs de la presente invención, el límite inferior del número total de bases (el número de bases en la molécula Nccs de longitud total), es, por ejemplo, 38, preferentemente 42, más preferentemente 50, incluso más preferentemente 51 y particularmente preferentemente 52 y el límite superior del mismo es, por ejemplo, 300, preferentemente 200, más preferentemente 150, incluso más preferentemente 100 y particular y preferentemente 80. En la molécula Nccs de la presente invención, el límite inferior del número total de bases excluyendo aquellas en las regiones conectoras (Lx) y (Ly) es, por ejemplo, 38, preferentemente 42, más preferentemente 50, incluso más preferentemente 51 y particular y preferentemente 52 y el límite superior del mismo es, por ejemplo, 300, preferentemente 200, más preferentemente 150, incluso más preferentemente 100 y particular y preferentemente 80.

45 Los componentes de la molécula Nccs de la presente invención no están particularmente limitados y los ejemplos de los mismos incluyen restos de nucleótidos. Los ejemplos de los restos de nucleótidos incluyen un resto de ribonucleótido y un resto de desoxirribonucleótido. El resto nucleotídico puede ser el que no está modificado (resto nucleotídico no modificado) o el que ha sido modificado (resto nucleotídico modificado), por ejemplo. Para configurar la molécula Nccs de la presente invención de modo que incluya un resto nucleotídico modificado, por ejemplo, se puede mejorar la resistencia de la molécula Nccs a nucleasas, permitiendo de este modo que se mejore la estabilidad de la molécula Nccs. Adicionalmente, la molécula Nccs de la presente invención además puede incluir, por ejemplo, un resto no nucleotídico además del resto de nucleótido. Los detalles del resto nucleotídico y del resto no nucleotídico se describirán más adelante.

En la molécula Nccs de la presente invención, se prefiere al resto nucleotídico como el componente de cada una de la región interna (Z), la región lateral 5' (Xc) y la región lateral 3' (Yc). Cada una de las regiones está compuesta por cualquiera de los siguientes restos (1) a (3), por ejemplo.

55 (1) uno o más restos de nucleótidos no modificados

(2) uno o más restos de nucleótidos modificados

(3) uno o más restos de nucleótidos no modificados y uno o más restos de nucleótidos modificados

En la molécula Nccs de la presente invención, los componentes de las regiones conectoras (Lx) y (Ly) no están particularmente limitados y los ejemplos de los mismos incluyen los restos nucleotídicos y los restos no nucleotídicos descritos anteriormente. Cada una de las regiones conectoras puede estar compuesta por el o los restos nucleotídicos solamente, los restos no nucleotídicos solamente, o los restos nucleotídicos y los restos no nucleotídicos. Cada una de las regiones conectoras puede estar compuesta por cualquiera de los siguientes restos (1) a (7), por ejemplo.

(1) uno o más restos de nucleótidos no modificados

(2) uno o más restos de nucleótidos modificados

(3) uno o más restos de nucleótidos no modificados y uno o más restos de nucleótidos modificados

(4) uno o más restos no nucleotídicos

(5) uno o más restos no nucleotídicos y uno o más restos nucleotídicos no modificados

(6) uno o más restos no nucleotídicos y uno o más restos nucleotídicos modificados

(7) uno o más restos no nucleotídicos, uno o más restos nucleotídicos no modificados y uno o más restos nucleotídicos modificados

Los componentes de ambas regiones (Lx) y (Ly) pueden ser los mismos o diferentes, por ejemplo. Los ejemplos específicos son tales que: los componentes de ambas regiones son los restos de nucleótidos; los componentes de ambas regiones son los restos no nucleotídicos; y el componente de una de las regiones es el resto nucleotídico mientras el componente de la otra región conectora es el resto no nucleotídico.

Los ejemplos de la molécula Nccs de la presente invención incluyen: moléculas compuestas por los restos de nucleótidos solamente; y moléculas que incluyen el o los restos no nucleotídicos además de los restos de nucleótidos. En la molécula Nccs de la presente invención, los restos de nucleótidos pueden ser los restos de nucleótidos no modificados solamente; los restos de nucleótidos modificados solamente; o el o los restos de nucleótidos no modificados y los restos de nucleótidos modificados, como se describió anteriormente, por ejemplo. Cuando la molécula Nccs incluye el o los restos de nucleótidos no modificados y el o los restos de nucleótidos modificados, el número de restos de nucleótidos modificados no está particularmente limitado y es, por ejemplo, "uno o más", específicamente, por ejemplo, entre 1 y 5, preferentemente entre 1 y 4, más preferentemente entre 1 y 3 y lo más preferentemente 1 o 2. Cuando la molécula Nccs de la presente invención incluye el o los restos no nucleotídicos, el número de restos no nucleotídicos no está particularmente limitado y es, por ejemplo, "uno o más", específicamente, por ejemplo, entre 1 y 8, entre 1 y 6, entre 1 y 4, o 1, 2 o 3.

En la molécula Nccs de la presente invención, el resto nucleotídico preferentemente es un resto de ribonucleótido. En este caso, también se hace referencia a la molécula Nccs de la presente invención como a una "molécula de ARN" o "molécula de ARNcs", por ejemplo. Los ejemplos de las moléculas de ARNcs incluyen: moléculas compuestas por restos de ribonucleótidos solamente; y una molécula que incluye el o los restos no nucleotídicos, además de los restos de ribonucleótidos. Como se describió anteriormente, como los restos de ribonucleótidos, la molécula de ARNcs puede incluir: los restos de ribonucleótidos no modificados solamente; restos de ribonucleótidos modificados solamente; o el o los restos de ribonucleótidos no modificados y el o los restos de ribonucleótidos modificados, por ejemplo.

Cuando la molécula de ARNcs incluye el o los restos de ribonucleótidos modificados además de los restos de ribonucleótidos no modificados, por ejemplo, el número de los restos de ribonucleótidos modificados no está particularmente limitado y es, por ejemplo, "uno o más", específicamente, por ejemplo, entre 1 y 5, preferentemente entre 1 y 4, más preferentemente entre 1 y 3 y lo más preferentemente 1 o 2. El resto de ribonucleótido modificado en contraste con el resto de ribonucleótido no modificado puede ser el resto de desoxirribonucleótido obtenido por sustitución de un resto de ribosa por uno de desoxirribosa, por ejemplo. Cuando la molécula de ARNcs incluye el o los restos de desoxirribonucleótidos además de los restos de ribonucleótidos no modificados, por ejemplo, el número de restos de desoxirribonucleótidos no está particularmente limitado y es, por ejemplo, "uno o más", específicamente, por ejemplo, entre 1 y 5, preferentemente entre 1 y 4, más preferentemente entre 1 y 3 y lo más preferentemente 1 o 2.

La molécula Nccs de la presente invención puede incluir una sustancia marcadora (marcador) y se puede marcar con la sustancia marcadora, por ejemplo. La sustancia marcadora no está particularmente limitada y puede ser una sustancia fluorescente, un indicador, un isótopo, o similar, por ejemplo. Los ejemplos de la sustancia fluorescente incluyen: fluoróforos tales como pireno, TAMRA, fluoresceína, un indicador Cy3 y un indicador Cy5. Los ejemplos de indicadores incluyen indicadores Alexa tal como Alexa 488. Los ejemplos de los isótopos incluyen isótopos estables y radioisótopos. Entre ellos, se prefieren los isótopos estables. Los isótopos estables tienen un menor riesgo de exposición a la radiación y no requieren de instalaciones específicas, por ejemplo. Por lo tanto, los isótopos estables

son excelentes para ser manejados y pueden contribuir a reducir los costes. A su vez, un isótopo estable no cambia las propiedades físicas de un compuesto marcado con el mismo, por ejemplo y por lo tanto tiene una propiedad excelente como marcador. El isótopo estable no está particularmente limitado y sus ejemplos incluyen ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{33}S , ^{34}S y ^{36}S .

- 5 Como se describió previamente, la molécula Nccs de la presente invención puede inhibir la expresión de un gen diana. Por lo tanto, la molécula Nccs de la presente invención se puede usar como un agente terapéutico para tratar una enfermedad provocada por un gen, por ejemplo. Cuando la molécula Nccs incluye, como secuencia inhibidora de expresión, una secuencia que inhibe la expresión de un gen que provoca la enfermedad, por ejemplo, es posible tratar la enfermedad por inhibición de la expresión del gen diana. En la presente invención, el término "tratamiento"
- 10 abarca: prevención de enfermedades; mejora de enfermedades; y mejora del pronóstico, por ejemplo y puede significar cualquiera de ellos.

El método que usa la molécula Nccs de la presente invención no está particularmente limitado. Por ejemplo, la molécula Nccs se puede administrar a un sujeto que tiene el gen diana.

- 15 Los ejemplos del sujeto al cual se administra la molécula Nccs de la presente invención incluyen células, tejidos y órganos. Los ejemplos del sujeto también incluyen seres humanos y animales no humanos tal como mamíferos no humanos, es decir, mamíferos excluyendo seres humanos. La administración se puede realizar *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo. Las células no están particularmente limitadas y los ejemplos de las mismas incluyen: diferentes células cultivadas como células HeLa, células 293, células NIH3T3 y células COS; células madre tal como células ES y células madre hematopoyéticas; y células aisladas de organismos vivos, tal como células de cultivos primarios.

- 20 En la presente invención, el gen diana cuya expresión se va a inhibir no está particularmente limitado y cualquier gen deseado puede ser establecido como el gen diana. Luego de determinar el gen diana, la secuencia inhibidora de expresión se puede diseñar como apropiada dependiendo del tipo de gen diana, como se describió anteriormente.

- Los ejemplos específicos de la molécula Nccs de la presente invención se expondrán más abajo. Se debe destacar, sin embargo, que la presente invención no está de ningún modo limitada a los mismos. Los ejemplos de la secuencia de bases de la molécula Nccs incluyen: secuencias de bases de SEC ID NÚM: 2, 7, 8, 13, 14, 29 a 35, 37, 43, 44, 47, 48 y 51 a 80; y las secuencias de bases obtenidas por, por ejemplo, eliminación, sustitución y/o adición de una o más bases en estas secuencias de bases. Cuando el gen diana es el gen de GAPDH, los ejemplos de la secuencia de bases de la molécula Nccs incluyen las secuencias de bases de SEC ID NÚM: 2, 7, 8, 13, 37 y 51 a 80. Cuando el gen diana es el TGF- β 1, los ejemplos de la secuencia de bases de la molécula Nccs incluyen las secuencias de bases de SEC ID NÚM: 14 y 29 a 35. Cuando el gen diana es el gen de LAMA1, los ejemplos de la secuencia de bases de la molécula Nccs incluyen las secuencias de bases de SEC ID NÚM: 43 y 44. Cuando el gen diana es el gen de LMNA, los ejemplos de la secuencia de bases de la molécula Nccs incluyen las secuencias de bases de SEC ID NÚM: 47 y 48.
- 25
- 30

- 35 En cuanto al uso de la molécula Nccs de la presente invención, se puede hacer referencia a la siguiente descripción respecto a la composición, el método de inhibición, el método de tratamiento y similares.

Dado que la molécula Nccs de la presente invención puede inhibir la expresión de un gen diana como se describió anteriormente, es útil como un medicamento, un agente para diagnóstico, un químico agrícola y una herramienta para realizar investigación en químicos agrícolas, ciencias de la medicina, ciencias biológicas y similares, por ejemplo.

- 40 2. Resto nucleotídico

El resto nucleotídico incluye, como componentes, un azúcar, una base y un fosfato. El resto nucleotídico es un resto de ribonucleótido o un resto de desoxirribonucleótido, como se describió anteriormente. El resto de ribonucleótido tiene, por ejemplo: un resto de ribosa como azúcar; y adenina (A), guanina (G), citosina (C) o uracilo (U) como la base.

- 45 El resto nucleotídico puede ser, por ejemplo, un resto nucleotídico no modificado o un resto nucleotídico modificado. Los componentes del resto nucleotídico no modificado son los mismos o sustancialmente los mismos que los componentes de un resto nucleotídico de origen natural, por ejemplo. Preferentemente, los componentes son los mismos o sustancialmente los mismos que los componentes de un resto nucleotídico de origen natural en un cuerpo humano.

- 50 El resto nucleotídico modificado es un resto nucleotídico obtenido por modificación del resto nucleotídico no modificado, por ejemplo. El resto nucleotídico modificado puede ser tal que cualquiera de los componentes del resto nucleotídico no modificado sea modificado, por ejemplo. En la presente invención, "modificación" hace referencia a, por ejemplo: sustitución, adición y/o eliminación de cualquiera de los componentes; y sustitución, adición y/o eliminación de uno o más átomos y/o uno o más grupos funcionales en el o los componentes. También se puede denominar "alteración". Los ejemplos del resto nucleotídico modificado incluyen restos de nucleótidos de origen natural y restos nucleotídicos artificialmente modificados. Respecto a los restos nucleotídicos modificados de origen natural, se puede hacer referencia a Limbach et al. (1994, *Summary: the modified nucleosides of RNA*, Nucleic
- 55

Acids Res. 22: pág. 2183 a 2196), por ejemplo. El resto nucleotídico modificado puede ser un resto de una alternativa del nucleótido, por ejemplo.

Los ejemplos de la modificación del resto nucleotídico incluyen modificación de un esqueleto de ribosa-fosfato (en los sucesivo "esqueleto ribofosfato").

- 5 En el esqueleto ribofosfato, se puede modificar un resto de ribosa, por ejemplo. En el resto de ribosa, por ejemplo, el carbono de la posición 2' puede modificarse. Específicamente, un grupo hidroxilo unido al carbono de la posición 2' se puede sustituir por un hidrógeno o un halógeno tal como flúor, por ejemplo. Por sustitución del grupo hidroxilo unido al carbono de la posición 2' por hidrógeno, es posible sustituir el resto de ribosa por desoxirribosa. El resto de ribosa se puede sustituir por su estereoisómero, por ejemplo y puede ser sustituido por un resto de arabinosa, por ejemplo.

- 10 El esqueleto ribofosfato puede sustituirse por un esqueleto no ribofosfato que tiene un resto no ribosa y/o uno no fosfato, por ejemplo. El esqueleto no ribofosfato puede ser, por ejemplo, el esqueleto ribofosfato modificado de modo de no ser cargado. Los ejemplos de uno alternativo obtenido por sustitución del esqueleto ribofosfato por el esqueleto no ribofosfato en el nucleótido incluye morfolino, ciclobutilo y pirrolidina. Otros ejemplos del alternativo incluyen restos de monómeros de ácido nucleico artificiales. Los ejemplos específicos de estos incluyen ANP (ácido nucleico peptídico), ANB (ácido nucleico bloqueado) y ANE (ácido nucleico con puente 2'-O,4'-C-etileno). Entre ellos, se prefiere ANP.

- 20 En el esqueleto ribofosfato, se puede modificar un grupo fosfato, por ejemplo. En el esqueleto ribofosfato, el grupo fosfato más próximo al resto de azúcar se llama "grupo α -fosfato". El grupo α -fosfato está cargado negativamente y las cargas eléctricas están distribuidas homogéneamente en dos átomos de oxígeno que no están unidos al resto de azúcar. Entre los cuatro átomos de oxígeno en el grupo α -fosfato, los dos átomos de oxígeno no unidos al resto de azúcar en la unión fosfodiéster entre los restos de nucleótidos se denominan en lo sucesivo "oxígenos de no unión". Por otra parte, dos átomos de oxígeno que están conectados al resto de azúcar en la unión fosfodiéster entre los restos de nucleótidos se denominan en lo sucesivo "oxígenos de unión". El grupo α -fosfato preferentemente es modificado para no ser cargado, o para generar una distribución asimétrica de cargas entre los oxígenos de no unión, por ejemplo.

- 25 En el grupo fosfato, el o los oxígenos de no unión se pueden sustituir, por ejemplo. El o los oxígenos se pueden sustituir por cualquier átomo que se elige del grupo que consiste en S (azufre), Se (selenio), B (boro), C (carbono), H (hidrógeno), N (nitrógeno) y OR (R es un grupo alquilo o un grupo arilo), por ejemplo y es preferible la sustitución por S. Se prefiere que los átomos de oxígeno de no unión sean sustituidos, por ejemplo y es más preferible que los oxígenos de no unión sean sustituidos por S. Los ejemplos del grupo fosfato modificado de tal modo incluyen fosforotioatos, fosforoditioatos, fosforoselenatos, borano fosfatos, ésteres de borano fosfato, fosfonatos de hidrógeno, fosforoamidatos, alquil o aril fosfonatos y fosfotriésteres. En particular, se prefiere fosforoditioato en el cual los oxígenos de no unión están sustituidos por S.

- 35 En el grupo fosfato, el o los oxígenos de unión pueden ser sustituidos, por ejemplo. El o los oxígenos pueden ser sustituidos por cualquier átomo que se elige del grupo que consiste en S (azufre), C (carbono) y N (nitrógeno), por ejemplo. Los ejemplos del grupo fosfato modificado de tal modo incluyen: fosforoamidatos con puente que resultan de la sustitución por N; fosforotioatos con puente que resultan de la sustitución por S; y metilfosfonatos con puente que resultan de la sustitución por C. Preferentemente, la sustitución de los oxígenos de unión se realiza en al menos uno de los restos de nucleótidos del extremo 5' y el resto nucleotídico del extremo 3' de la molécula Nccs de la presente invención, por ejemplo. Cuando la sustitución se realiza en el lateral 5', se prefiere la sustitución por C. Cuando la sustitución se realiza en el lateral 3', se prefiere la sustitución por N.

- 40 El grupo fosfato puede sustituirse por el conector libre de fosfato, por ejemplo. El conector puede contener siloxano, carbonato, carboximetilo, carbamato, amida, tioéter, conector de óxido de etileno, sulfonato, sulfonamida, tioformacetal, formacetal, oxima, metilenimino, metilenmetilimino, metilenhidrazo, metilendimetilhidrazo, metilenoximetilimino, o similar. Preferentemente, el conector puede contener un grupo metilencarbonilamino y un grupo metilenmetilimino.

- 45 En la molécula Nccs de la presente invención, por ejemplo, al menos uno de un resto nucleotídico en el extremo 3' y un resto nucleotídico en el extremo 5' puede ser modificado. El resto nucleotídico puede ser modificado en cualquiera del extremo 3' y el extremo 5', o pueden ser modificados los restos de nucleótidos en el extremo 3' y el extremo 5', por ejemplo. La modificación puede ser como se describió anteriormente, por ejemplo y es preferible modificar uno o más grupos fosfato en el o los extremos. El grupo fosfato completo puede ser modificado, o uno o más átomos en el grupo fosfato pueden ser modificados, por ejemplo. En el primer caso, por ejemplo, el grupo fosfato completo puede ser sustituido o eliminado.

- 50 La modificación de los restos de nucleótidos en el o los extremos puede ser una adición de cualquier otra molécula, por ejemplo. Los ejemplos de la otra molécula incluyen moléculas funcionales tales como sustancias marcadoras como se describió anteriormente y grupos protectores. Los ejemplos de los grupos protectores incluyen S (azufre), Si (silicio), B (boro) y grupos que contienen ésteres. Las moléculas funcionales tales como las sustancias marcadoras

se pueden usar para la detección y similares de la molécula Nccs de la presente invención, por ejemplo.

La otra molécula se puede agregar al grupo fosfato del resto de nucleótidos, o se puede agregar al grupo fosfato o al resto de azúcar por medio de un espaciador, por ejemplo. El átomo terminal del espaciador puede ser agregado o sustituido por uno de los oxígenos de unión del grupo fosfato, u O, N, S, o C del resto de azúcar, por ejemplo. El sitio de unión en el resto de azúcar preferentemente es, por ejemplo, C en la posición 3', C en la posición 5', o cualquier átomo unido al mismo. El espaciador también puede ser agregado o sustituido por un átomo terminal del nucleótido alternativo tal como ANP, por ejemplo.

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

Otros ejemplos de la molécula a ser agregada al extremo incluyen indicadores, agentes intercalantes (por ejemplo, acridinas), agentes de reticulación (por ejemplo, psoralen, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, Sapphyrin), hidrocarburos aromáticos policíclicos (por ejemplo, fenazina, dihidrofenazina), endonucleasas artificiales (por ejemplo, EDTA), vehículos lipófilos (por ejemplo, colesterol, ácido cólico, ácido adamantano acético, ácido 1-pirenobutírico, dihidrotestosterona, 1,3-Bis-O (hexadecil)glicerol, un grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3- propanodiol, un grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico, ácido O3-(oleoil)cólico, dimetoxitritilo o fenoxazina), complejos peptídicos (por ejemplo, péptido Antennapedia, péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (por ejemplo, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (por ejemplo, biotina), facilitadores de transporte/absorción (por ejemplo, aspirina, vitamina E, ácido fólico) y ribonucleasas sintéticas (por ejemplo, imidazol, bisimidazol, histamina, agrupamientos de imidazol, complejos de acridina-imidazol, complejos de Eu³⁺ de tetraazamacrociclos).

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

5'-monofosfato((HO)₂(O)P-O-5');

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

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

extremo protector 5'-guanosina (7-metilado o no metilado,

7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5');

extremo protector 5'-adenosina (Appp);

cualquier estructura de extremo protector de nucleótido modificado o no modificado

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

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

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

5'-fosfortiolato ((HO)₂(O)P-S-5');

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

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

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

5'-alquileterfosfonatos (por ejemplo, RP(OH)(O)-O-5', donde R es alquileter (por ejemplo, metoximetilo, etoximetilo, o similar)).

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

Los ejemplos de la base incluyen: bases purina tales como adenina y guanina; y bases pirimidina tales como citosina, uracilo y timina. Otros ejemplos de la base incluyen inosina, timina, xantina, hipoxantina, nubularina, isoguanisina y tubercidina. Los ejemplos de la base también incluyen: derivados de alquilo tales como 2-aminoadenina, purina 6-metilada y purina 2-propilada; 5-halouracilo y 5-halocitosina; 5-propinil uracilo y 5-propinil

citosina; 6-azo uracilo, 6-azo citosina y 6-azo timina; 5-uracilo (seudouracilo), 4-tiouracilo, 5-halouracilo, 5-(2-aminopropil)uracilo, 5-amino alil uracilo; purinas 8-halogenada, aminada, tiolada, tioalquilada, hidroxilada y otras 8-sustituidas; pirimidinas 5-trifluorometiladas y otras 5-sustituidas; 7-metilguanina; pirimidina 5-sustituida; 6-azapirimidina; purinas sustituidas N-2, N-6 y O-6 (que incluyen 2-aminopropiladenina); 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina; dihidrouracilo; 3-desaza-5-azacitosina; 2-aminopurina; 5-alquiluracilo; 7-alquilguanina; 5-alquilocitosina; 7-desazaadenina; N6,N6-dimetiladenina; 2,6-diaminopurina; 5-amino-alil-uracilo; N3-metiluracilo; 1,2,4-triazoles sustituidos; 2-piridinona; 5-nitroindol; 3-nitropirrol; 5-metoxiuracilo; ácido uracil-5-oxiacético; 5-metoxycarbonilmetiluracilo; 5-metil-2-tiouracilo; 5-metoxycarbonilmetil-2-tiouracilo; 5-metilaminometil-2-tiouracilo; 3-(3-amino-3-carboxipropil)uracilo; 3-metilcitosina; 5-metilcitosina; N4-acetilcitosina; 2-tiocitosina; N6-metiladenina; N6-isopentiladenina; 2-metiltio-N6-isopenteniladenina; N-metilguanina; y bases O-alquiladas. Los ejemplos de las purinas y pirimidinas incluyen aquellas descritas en la patente de los EE.UU. núm. 3.687.808, "*Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*", pág. 858 a 859, editado por Kroschwitz J. I, John Wiley & Sons, 1990 y Englisch et al, *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, vol. 30, pág. 613.

Otros ejemplos del resto nucleotídico modificado incluyen aquellos que no tienen base, es decir, aquellos que tienen un esqueleto ribofosfato abásico. A su vez, como resto nucleotídico modificado, se pueden usar aquellos descritos en la solicitud provisional de los EE.UU. 60/465.665 (fecha de presentación: 25 de abril de 2003) y la solicitud internacional WO2004/080406 (fecha de presentación: 8 de marzo de 2004), por ejemplo.

3. Resto no nucleotídico

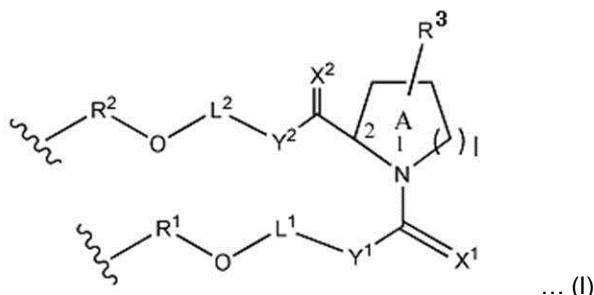
El resto no nucleotídico no está particularmente limitado. La molécula Nccs de la presente invención puede incluir, como el resto no nucleotídico, una estructura no nucleotídica que contiene un esqueleto pirrolidina o un esqueleto piperidina, por ejemplo.

El esqueleto pirrolidina puede ser el esqueleto de un derivado de pirrolidina obtenido por medio de sustitución de al menos un carbono que constituye el anillo formado por 5 miembros de pirrolidina, por ejemplo. En el caso de sustitución, se prefiere sustituir el o los carbonos diferentes del C-2, por ejemplo. El carbono puede ser sustituido por nitrógeno, oxígeno o azufre, por ejemplo. El esqueleto pirrolidina puede contener, por ejemplo, un doble enlace carbono-carbono o un doble enlace carbono-nitrógeno en, por ejemplo, el anillo formado por 5 miembros de pirrolidina. En el esqueleto pirrolidina, los carbonos y nitrógeno que constituyen el anillo formado por 5 miembros de pirrolidina pueden cada uno tener un grupo hidrógeno unido al mismo, o un sustituyente a ser descrito más abajo unido al mismo, por ejemplo. La región conectora (Lx) puede estar unida a las regiones (X) y (Xc) por medio, por ejemplo, de cualquier grupo en el esqueleto pirrolidina, preferentemente cualquier átomo de carbono o nitrógeno en el anillo formado por 5 miembros y más preferentemente el carbono en posición 2 (C-2) o nitrógeno en el anillo formado por 5 miembros. Los ejemplos del esqueleto pirrolidina incluyen esqueletos de prolina y esqueletos de prolinol. Los esqueletos de prolina, los esqueletos de prolinol y similares son excelentes en seguridad debido a que son sustancias presentes en los organismos vivos y reductores de los mismos, por ejemplo.

El esqueleto piperidina puede ser el esqueleto de un derivado de piperidina obtenido por medio de sustitución de al menos un carbono que constituye el anillo formado por 6 miembros de piperidina, por ejemplo. En el caso de sustitución, se prefiere sustituir el o los carbonos diferentes del C-2, por ejemplo. El carbono puede ser sustituido por nitrógeno, oxígeno o azufre, por ejemplo. El esqueleto piperidina puede contener, por ejemplo, un doble enlace carbono-carbono o un doble enlace carbono-nitrógeno en, por ejemplo, el anillo formado por 6 miembros de piperidina. En el esqueleto piperidina, los carbonos y nitrógeno que constituyen el anillo formado por 6 miembros de piperidina pueden cada uno tener un grupo hidrógeno unido al mismo, o un sustituyente a ser descrito más abajo unido al mismo, por ejemplo. La región conectora (Lx) puede estar unida a las regiones (X) y (Xc) por medio, por ejemplo, de cualquier grupo en el esqueleto piperidina, preferentemente cualquier átomo de carbono o nitrógeno en el anillo formado por 6 miembros y más preferentemente el carbono de la posición 2 (C-2) o nitrógeno en el anillo formado por 6 miembros. Lo mismo aplica para la región conectora (Ly).

Cada una de las regiones conectoras puede estar compuesta por el o los restos no nucleotídicos que tienen estructura no nucleotídica solamente, o pueden contener el o los restos no nucleotídicos que tienen estructura no nucleotídica y el o los restos de nucleótido, por ejemplo.

La región conectora está representada por la siguiente fórmula (I), por ejemplo.



En la fórmula (I),

X^1 y X^2 son cada uno en forma independiente H_2 , O, S o NH;

5 Y^1 y Y^2 son cada uno en forma independiente un enlace sencillo, CH_2 , NH, O o S;

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

el sustituyente es OH, OR^4 , NHR^4 , NR^4R^5 , SH, SR^4 , o un grupo oxo ($=O$);

cuando R^3 es el sustituyente, puede haber un sustituyente R^3 , dos o más sustituyentes R^3 o ningún sustituyente R^3 y cuando hay una pluralidad de sustituyentes R^3 , pueden ser iguales o diferentes;

10 R^4 y R^5 son cada uno un sustituyente o un grupo protector y pueden ser iguales o diferentes;

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

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

15 con la salvedad de que: cuando Y^1 es NH, O, o S, un átomo unido a Y^1 en L^1 es carbono, un átomo unido a OR^1 en L^1 es carbono y los átomos de oxígeno no se encuentran adyacentes entre sí;

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

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

con la salvedad de que: cuando Y^2 es NH, O o S, un átomo unido a Y^2 en L^2 es carbono, un átomo unido a OR^2 en L^2 es carbono y los átomos de oxígeno no se encuentran adyacentes entre sí;

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

l es 1 o 2;

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

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

en el Anillo A, un átomo de carbono distinto de C-2 puede estar sustituido con nitrógeno, oxígeno o azufre, y

30 el anillo A puede contener un doble enlace carbono-carbono o un doble enlace carbono-nitrógeno. Cuando la región conectora (Lx) está representada por la fórmula (I), las regiones (Xc) y (X) están unidas cada una a la región conectora (Lx) vía $-OR^1-$ u $-OR^2-$. Además, cuando la región conectora (Ly) está representada por la fórmula (I), las regiones (Yc) y (Y) están unidas cada una a la región conectora (Ly) vía $-OR^1-$ u $-OR^2-$. Se debe notar que R^1 y R^2 pueden estar presentes o no y cuando están presentes, R^1 y R^2 son cada uno en forma independiente un resto nucleotídico o la estructura de la fórmula (I).

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

En la fórmula (I), l en el anillo A es 1 o 2. Cuando l = 1, el anillo A es un anillo de 5 miembros, que es, por ejemplo, el esqueleto pirrolidina. El esqueleto pirrolidina es, por ejemplo, un esqueleto de prolina, un esqueleto de prolinol, o

similares y los ejemplos específicos incluyen estructuras divalentes del esqueleto de prolina y el esqueleto de prolinol. Cuando $l = 2$, el anillo A es un anillo de 6 miembros, que es, por ejemplo, el esqueleto piperidina. En el Anillo A, un átomo de carbono distinto de C-2 puede estar sustituido con nitrógeno, oxígeno o azufre. Además, el anillo A puede contener un doble enlace carbono-carbono o un doble enlace carbono-nitrógeno. El anillo A puede tener forma L o forma D, por ejemplo.

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

En la fórmula (I), R^3 es un átomo de hidrógeno o sustituyente que está unido a C-3, C-4, C-5 o C-6 en el anillo A. El sustituyente es OH, OR^4 , NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , SH, SR^4 o un grupo oxo ($=O$). Cuando R^3 es el sustituyente, puede haber un sustituyente R^3 , dos o más sustituyentes R^3 o ningún sustituyente R^3 y cuando hay una pluralidad de sustituyentes R^3 , pueden ser iguales o diferentes. R^4 y R^5 son cada uno un sustituyente o un grupo protector y pueden ser iguales o diferentes.

Los ejemplos de sustituyente incluyen halógenos, alquilos, alquilenos, alquínulos, haloalquilos, arilos, heteroarilos, arilalquilos, cicloalquilos, cicloalquénulos, cicloalquilalquilos, ciclilalquilos, hidroxialquilos, alcoxilalquilos, aminoalquilos, heterociclilalquénulos, heterociclilalquilos, heteroarilalquilos, sililos y sililoxialquilos. Lo mismo se aplica a continuación.

El grupo protector es un grupo funcional que inactiva un grupo funcional altamente reactivo, por ejemplo. Los ejemplos del grupo protector incluyen grupos protectores conocidos. Con respecto al grupo protector, la descripción en la bibliografía (J. F. W. McOmie, "Group protectors in Organic Chemistry", Plenum Press, Londres y Nueva York, 1973) se incorpora a la presente memoria por referencia, por ejemplo. El grupo protector no está particularmente limitado y sus ejemplos incluyen un grupo terc-butildimetilsililo (TBDMS), un grupo bis(2-acetoxietiloxi)metilo (ACE), un grupo triisopropil-sililoximetilo (TOM), un grupo 1-(2-cianoetoxi)etilo (CEE), un grupo 2-cianoetoximetilo (CEM), un grupo tolilsulfoniletoximetilo (TEM) y dimetoxitritilo (DMTr). Cuando R^3 es OR^4 , el grupo protector no está particularmente limitado y sus ejemplos incluyen un grupo TBDMS, un grupo ACE, un grupo TOM, un grupo CEE, un grupo CEM y un grupo TEM. Otros ejemplos del grupo protector incluyen grupos con contenido de sililo que se describen más adelante. Lo mismo se aplica en lo sucesivo.

En la fórmula (I), L^1 es una cadena alquénulo compuesta de n átomos. Un átomo/s de hidrógeno en un átomo/s de carbono del alquénulo puede estar o no estar sustituido con OH, OR^a , NH_2 , NHR^a , NR^aR^b , SH o SR^a , por ejemplo. De manera alternativa, L^1 puede ser una cadena de poliéter obtenida sustituyendo al menos un átomo de carbono en la cadena de alquénulo con un átomo de oxígeno. La cadena de poliéter es, por ejemplo, polietilenglicol. Cuando Y^1 es NH, O o S, un átomo unido a Y^1 en L^1 es carbono, un átomo unido a OR^1 en L^1 es carbono y los átomos de oxígeno no se encuentran adyacentes entre sí. Es decir, por ejemplo, cuando Y^1 es O, este átomo de oxígeno y el átomo de oxígeno en L^1 no son adyacentes entre sí y el átomo de oxígeno en OR^1 y el átomo de oxígeno en L^1 no son adyacentes entre sí.

En la fórmula (I), L^2 es una cadena alquénulo compuesta de m átomos. Un átomo/s de hidrógeno en un átomo/s de carbono del alquénulo puede estar o no estar sustituido con OH, OR^c , NH_2 , NHR^c , NR^cR^d , SH o SR^c , por ejemplo. De manera alternativa, L^2 puede ser una cadena de poliéter obtenida sustituyendo al menos un átomo de carbono en la cadena de alquénulo con un átomo de oxígeno. Cuando Y^2 es NH, O o S, un átomo unido a Y^2 en L^2 es carbono, un átomo unido a OR^2 en L^2 es carbono y los átomos de oxígeno no se encuentran adyacentes entre sí. Es decir, por ejemplo, cuando Y^2 es O, este átomo de oxígeno y el átomo de oxígeno en L^2 no son adyacentes entre sí y el átomo de oxígeno en OR^2 y el átomo de oxígeno en L^2 no son adyacentes entre sí.

n de L^1 y m de L^2 no están particularmente limitados y el límite inferior de cada uno de ellos puede ser 0, por ejemplo y su límite superior no está particularmente limitado. n y m pueden establecerse como corresponda según la longitud deseada de la región conectora (Lx), por ejemplo. Por ejemplo, desde el punto de vista del coste de fabricación, rendimiento y aspectos similares, n y m son cada uno preferentemente 0 a 30, más preferentemente 0 a 20 e incluso más preferentemente 0 a 15. n y m pueden ser iguales ($n = m$) o diferentes. $n + m$ es, por ejemplo, 0 a 30, preferentemente 0 a 20 y más preferentemente 0 a 15.

R^a , R^b , R^c y R^d , cada uno en forma independiente, puede ser un sustituyente o un grupo protector. El sustituyente y el grupo protector son como se describe precedentemente, por ejemplo.

En la fórmula (I), cada átomo de hidrógeno en forma independiente puede estar sustituido con un halógeno tal como Cl, Br, F o I, por ejemplo.

Cuando la región conectora (Lx) está representada por la fórmula (I), las regiones (Xc) y (X) están unidas cada una a la región conectora (Lx) vía $-OR^1-$ u $-OR^2-$, por ejemplo. R^1 y R^2 pueden estar presentes o no. Cuando R^1 y R^2 están presentes, R^1 y R^2 son cada uno en forma independiente un resto nucleotídico o la estructura representada por la fórmula (I). Cuando R^1 y/o R^2 es el resto nucleotídico, la región conectora (Lx) se compone del resto no nucleotídico con la estructura de la fórmula (I) excluyendo el resto nucleotídico R^1 y/o R^2 y el o los restos nucleotídicos, por ejemplo. Cuando R^1 y/o R^2 es la estructura representada por la fórmula (I), la estructura de la región conectora (Lx) es tal que, por ejemplo, dos o más de los restos no nucleotídicos que tienen la estructura de la fórmula (I) están unidos entre sí. El número de las estructuras de la fórmula (I) puede ser 1, 2, 3 o 4, por ejemplo.

Cuando la región conectora (Lx) incluye una pluralidad de las estructuras, las estructuras de la fórmula (I) pueden estar unidas directamente o vía el o los restos nucleotídico, por ejemplo. Por otra parte, cuando R^1 y R^2 no están presentes, la región conectora (Lx) se compone del resto no nucleotídico que tiene la estructura de la fórmula (I) solamente, por ejemplo. Cuando la región conectora (Lx) está representada por la fórmula (I), la descripción de la región conectora (Lx) dada precedentemente también se aplica a la región (Yc), la región (Y) y la región conectora (Ly).

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

10 Condición (1):

las regiones (Xc) y (X) están unidas a la estructura de la fórmula (I) vía $-OR^2-$ y $-OR^1-$, respectivamente; y

las regiones (Yc) y (Y) están unidas a la estructura de la fórmula (I) vía $-OR^1-$ y $-OR^2-$, respectivamente.

Condición (2):

las regiones (Xc) y (X) están unidas a la estructura de la fórmula (I) vía $-OR^2-$ y $-OR^1-$, respectivamente; y

15 las regiones (Yc) y (Y) están unidas a la estructura de la fórmula (I) vía $-OR^2-$ y $-OR^1-$, respectivamente.

Condición (3):

las regiones (Xc) y (X) están unidas a la estructura de la fórmula (I) vía $-OR^1-$ y $-OR^2-$, respectivamente; y

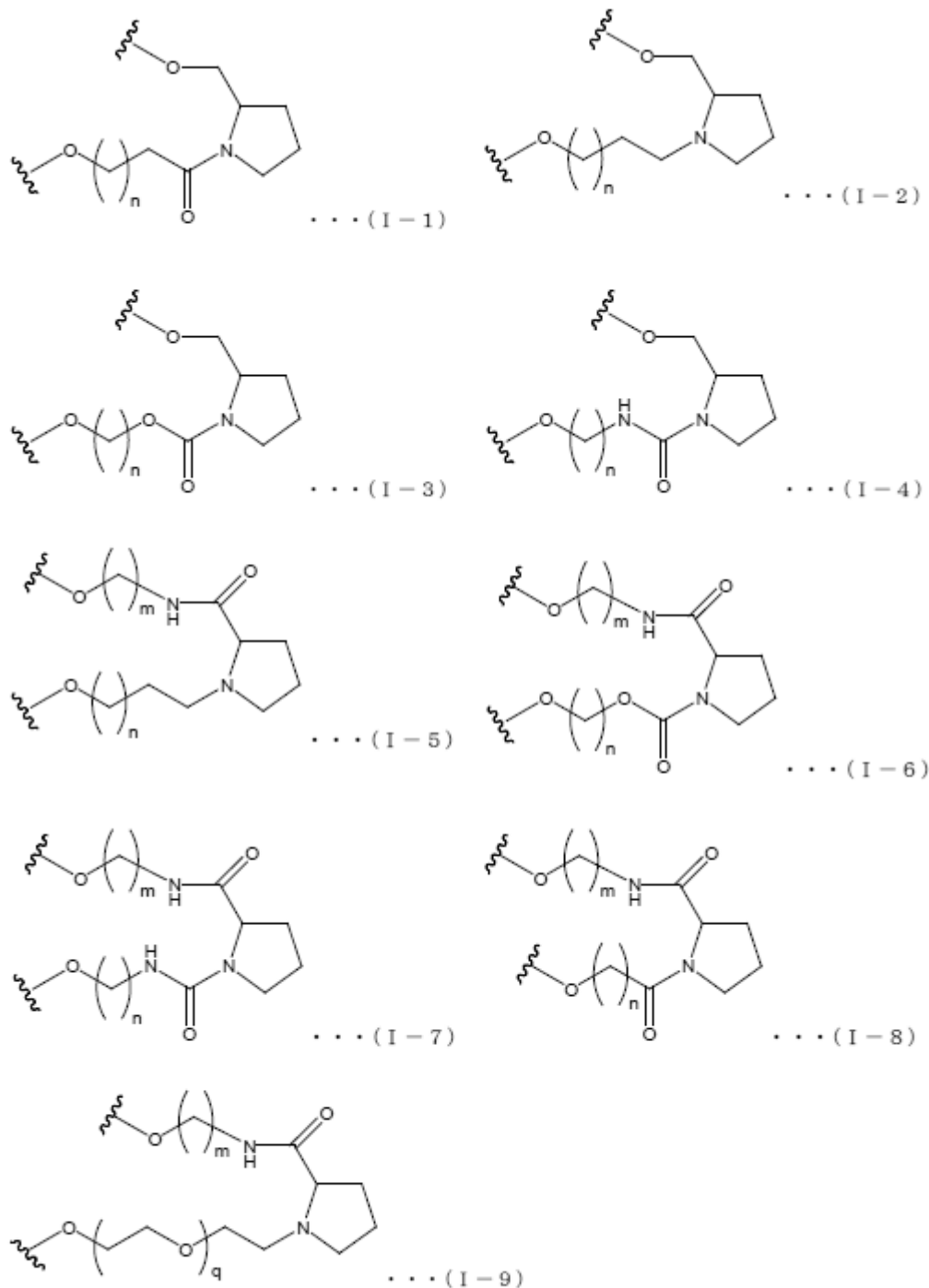
las regiones (Yc) y (Y) están unidas a la estructura de la fórmula (I) vía $-OR^1-$ y $-OR^2-$, respectivamente.

Condición (4):

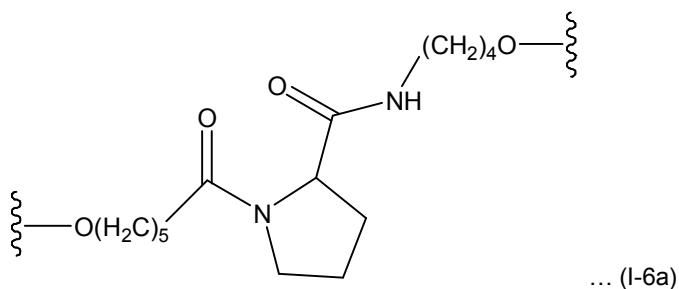
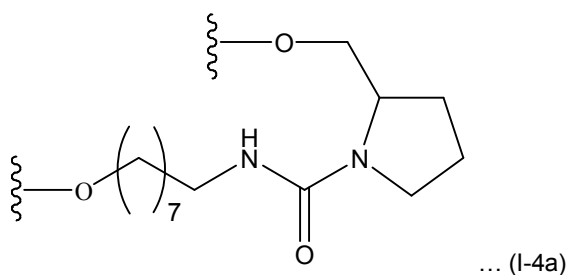
20 las regiones (Xc) y (X) están unidas a la estructura de la fórmula (I) vía $-OR^1-$ y $-OR^2-$, respectivamente; y

las regiones (Yc) y (Y) están unidas a la estructura de la fórmula (I) vía $-OR^2-$ y $-OR^1-$, respectivamente.

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



En las fórmulas (I-1) a (I-9), n, m y q no están particularmente limitados y son como se ha descrito precedentemente. Algunos ejemplos específicos son los siguientes: en la fórmula (I-1), n = 8; en la fórmula (I-2), n = 3; en la fórmula (I-3), n = 4 o 8; en la fórmula (I-4), n = 7 o 8; en la fórmula (I-5), n = 3 y m = 4; en la fórmula (I-6), n = 8 y m = 4; en la fórmula (I-7), n = 8 y m = 4; en la fórmula (I-8), n = 5 y m = 4; y en la fórmula (I-9), q = 1 y m = 4. La siguiente fórmula (I-4a) presenta un ejemplo de la fórmula (I-4) (n = 8) y la siguiente fórmula (I-6a) presenta un ejemplo de la fórmula (I-6) (n = 5, m = 4).



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

En la presente invención, el término “alquenilo” abarca alquenos de cadena lineal y ramificada, por ejemplo. Los ejemplos del alquenilo incluyen los alquenos antes mencionados que tienen uno o más enlaces dobles. La cantidad de átomos de carbono en el alquenilo no está particularmente limitada y es, por ejemplo, la misma que en el alquilo, preferentemente entre 2 y 8. Los ejemplos del alquenilo incluyen vinilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 1,3-butadienilo y 3-metil-2-butenilo.

En la presente invención, el término “alquinilo” abarca alquinos de cadena lineal y ramificada, por ejemplo. Los ejemplos del alquinilo incluyen los alquinos anteriormente mencionados que tienen uno o más enlaces triples. La cantidad de átomos de carbono en el alquinilo no está particularmente limitada y es, por ejemplo, la misma que en el alquilo, preferentemente entre 2 y 8. Los ejemplos del alquinilo incluyen etinilo, propinilo y butinilo. El alquinilo también puede incluir uno o más enlaces dobles, por ejemplo.

En la presente invención, el término “arilo” abarca grupos de hidrocarburos aromáticos monocíclicos y grupos de hidrocarburos aromáticos policíclicos, por ejemplo. Los ejemplos de grupos de hidrocarburos aromáticos monocíclicos incluyen fenilo. Los ejemplos de grupos de hidrocarburos aromáticos policíclicos incluyen 1-naftilo, 2-naftilo, 1-antrilo, 2-antrilo, 9-antrilo, 1-fenantrilo, 2-fenantrilo, 3-fenantrilo, 4-fenantrilo y 9-fenantrilo. Entre ellos, se prefieren, por ejemplo, fenilo, naftilos tal como 1-naftilo y 2-naftilo y similares.

En la presente invención, el término “heteroarilo” abarca grupos heterocíclicos aromáticos monocíclicos y grupos heterocíclicos aromáticos condensados, por ejemplo. Los ejemplos del heteroarilo incluyen furilos (por ejemplo: 2-furilo, 3-furilo), tienilos (por ejemplo: 2-tienilo, 3-tienilo), pirrolilos (por ejemplo: 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo), imidazolilos (por ejemplo: 1-imidazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo), pirazolilos (por ejemplo: 1-pirazolilo, 3-pirazolilo, 4-pirazolilo), triazolilos (por ejemplo: 1,2,4-triazol-1-ilo, 1,2,4-triazol-3-ilo, 1,2,4-triazol-4-ilo), tetrazolilos (por ejemplo: 1-tetrazolilo, 2-tetrazolilo, 5-tetrazolilo), oxazolilos (por ejemplo: 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 5-oxazolilo), isoxazolilos (por ejemplo: 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo), tiazolilos (por ejemplo: 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo), tiadiazolilos, isotiazolilos (por ejemplo: 3-isotiazolilo, 4-isotiazolilo, 5-isotiazolilo), piridilos (por ejemplo: 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo), piridazinilos (por ejemplo: 3-piridazinilo, 4-piridazinilo), pirimidinilos (por ejemplo: 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo), furazanilos (por ejemplo: 3-furazanilo), pirazinilos (por ejemplo: 2-pirazinilo), oxadiazolilos (por ejemplo: 1,3,4-oxadiazol-2-ilo), benzofurilos (por ejemplo: 2-benzo[b]furilo, 3-benzo[b]furilo, 4-benzo[b]furilo, 5-benzo[b]furilo, 6-benzo[b]furilo, 7-benzo[b]furilo), benzotienilos (por ejemplo: 2-benzo[b]tienilo, 3-benzo[b]tienilo, 4-benzo[b]tienilo, 5-benzo[b]tienilo, 6-benzo[b]tienilo, 7-benzo[b]tienilo), bencimidazolilos (por ejemplo: 1-bencimidazolilo, 2-bencimidazolilo, 4-bencimidazolilo, 5-bencimidazolilo), dibenzofurilos, benzoxazolilos, benzotiazolilos, quinoxalilos (por ejemplo: 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 6-quinoxalinilo), cinnolinilos (por ejemplo: 3-cinnolinilo, 4-cinnolinilo, 5-cinnolinilo, 6-cinnolinilo, 7-cinnolinilo, 8-cinnolinilo), quinazolilos (por ejemplo: 2-quinazolinilo, 4-quinazolinilo, 5-quinazolinilo, 6-quinazolinilo, 7-quinazolinilo, 8-quinazolinilo), quinolilos (por ejemplo: 2-quinolilo, 3-quinolilo, 4-quinolilo, 5-quinolilo, 6-quinolilo, 7-quinolilo, 8-quinolilo), ftalazinilos (por ejemplo: 1-ftalazinilo, 5-ftalazinilo, 6-ftalazinilo), isoquinolilos (por ejemplo: 1-isoquinolilo, 3-isoquinolilo, 4-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 6-isoquinolilo, 7-isoquinolilo, 8-isoquinolilo), purilos, pteridinilos (por ejemplo: 2-pteridinilo, 4-pteridinilo,

6-pteridinilo, 7-pteridinilo), carbazolilos, fenantridinilos, acridinilos (por ejemplo: 1-acridinilo, 2-acridinilo, 3-acridinilo, 4-acridinilo, 9-acridinilo), indolilos (por ejemplo: 1-indolilo, 2-indolilo, 3-indolilo, 4-indolilo, 5-indolilo, 6-indolilo, 7-indolilo), isoindolilos, fenazinilos (por ejemplo: 1-fenazinilo, 2-fenazinilo) y fenotiazinilos (por ejemplo: 1-fenotiazinilo, 2-fenotiazinilo, 3-fenotiazinilo, 4-fenotiazinilo).

5 En la presente invención, el término “cicloalquilo” se refiere a grupos de hidrocarburos cíclicos saturados, por ejemplo y la cantidad de átomos de carbono en el cicloalquilo oscila entre 3 y 15, por ejemplo. Los ejemplos del cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, grupos de hidrocarburos cíclicos con puentes y grupos de hidrocarburos espiro. Entre ellos, se prefieren ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, hidrocarburos cíclicos con puentes y similares.

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

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

15 En la presente invención, el término “cicloalquenilo” abarca grupos de hidrocarburos alifáticos cíclicos insaturados, por ejemplo y la cantidad de átomos de carbono en el cicloalquenilo oscila entre 3 y 7, por ejemplo. Los ejemplos del grupo cicloalquenilo incluyen ciclopropenilo, ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo y cicloheptenilo. Entre ellos, se prefieren ciclopropenilo, ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo y similares. El término “cicloalquenilo” también abarca grupos de hidrocarburos cíclicos con puentes y grupos de hidrocarburos espiro que tienen un enlace insaturado en sus anillos, por ejemplo.

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

25 En la presente invención, “alcoxi” abarca grupos compuestos por cualquiera de los alquilos y oxígeno (grupos alquil-O) anteriormente descritos y sus ejemplos incluyen metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi y n-butoxi. Los ejemplos del “alcoxilalquilo” incluyen metoximetilo. Los ejemplos del “aminoalquilo” incluyen 2-aminoetilo.

30 En la presente invención, los ejemplos del “heterocíclico” incluyen 1-pirrolinilo, 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, 1-pirrolidinilo, 2-pirrolidinilo, 3-pirrolidinilo, pirrolidinona, 1-imidazolinilo, 2-imidazolinilo, 4-imidazolinilo, 1-imidazolidinilo, 2-imidazolidinilo, 4-imidazolidinilo, imidazolidinona, 1-pirazolinilo, 3-pirazolinilo, 4-pirazolinilo, 1-pirazolidinilo, 3-pirazolidinilo, 4-pirazolidinilo, piperidinona, piperidino, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-piperidinilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo, piperazinona, 2-morfolinilo, 3-morfolinilo, morfolino, tetrahidropiranilo y tetrahidrofurano.

En la presente invención, los ejemplos del “heterocicilalquilo” incluyen piperidinilmetilo y piperazinilmetilo. Los Ejemplos del “heterocicilalquenilo” incluyen 2-piperidiniletlenilo. Los ejemplos del “heteroarilalquilo” incluyen piridilmetilo y quinolin-3-ilmetilo.

35 En la presente invención, el término “sililo” abarca grupos representados por la fórmula R_3Si- , donde R en forma independiente se puede seleccionar entre los alquilos, arilos y cicloalquilos antes mencionados. Los ejemplos del sililo incluyen un grupo trimetilsililo y un grupo terc-butildimetilsililo. Los ejemplos del “sililoxi” incluyen un grupo trimetilsililoxi. Los ejemplos del “sililoxialquilo” incluyen trimetilsililoximetilo.

En la presente invención, los ejemplos del “alquilenilo” incluyen metileno, etileno y propileno.

40 En la presente invención, los distintos grupos antes mencionados pueden estar sustituidos. Los ejemplos del sustituyente incluyen hidroxilo, carboxilo, halógenos, alquilo haluros (por ejemplo: CF_3 , CH_2CF_3 , CH_2CCl_3), nitro, nitroso, ciano, alquilos (por ejemplo: metilo, etilo, isopropilo, terc-butilo), alquilenilos (por ejemplo: vinilo), alquilenilos (por ejemplo: etinilo), cicloalquilos (por ejemplo: ciclopropilo, adamantilo), cicloalquilalquilos (por ejemplo: ciclohexilmetilo, adamantilmetilo), cicloalquenilos (por ejemplo: ciclopropenilo), arilos (por ejemplo: fenilo, naftilo), arilalquilos (por ejemplo: bencilo, fenetilo), heteroarilos (por ejemplo: piridilo, furilo), heteroarilalquilos (por ejemplo: piridilmetilo), heterocíclicos (por ejemplo: piperidilo), heterocicilalquilos (por ejemplo: morfolilmetilo), alcoxis (por ejemplo: metoxi, etoxi, propoxi, butoxi), alcoxis halogenados (por ejemplo: OCF_3), alquileniloxis (por ejemplo: viniloxi, aliloxi), ariloxis (por ejemplo: feniloxi), alquiloxicarbonilos (por ejemplo: metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, terc-butoxicarbonilo), arilalquilois (por ejemplo: benciloxi), aminos [alquilaminos (por ejemplo: metilamino, etilamino, dimetilamino), acilaminos (por ejemplo: acetilamino, benzoilamino), arilalquilaminos (por ejemplo: bencilamino, tritilamino), hidroxiamino], alquilaminoalquilos (por ejemplo: dietilaminometilo), sulfamilo y oxo.

4. Método de síntesis de la molécula Nccs de la presente invención

55 El método para sintetizar la molécula Nccs de la presente invención no está particularmente limitado y se puede emplear un método convencionalmente conocido. Los ejemplos del método incluyen métodos de síntesis de acuerdo a procedimientos de ingeniería genética y métodos de síntesis química. Los ejemplos de los procedimientos de ingeniería genética incluyen: métodos de síntesis que utilizan transcripción *in vitro*; métodos que usan un vector; y

métodos realizados usando un casete de PCR. El vector no está particularmente limitado y los ejemplos de este incluyen vectores no víricos tal como plásmidos y vectores víricos. Los métodos de síntesis química no están particularmente limitados y los ejemplos de estos incluyen un método con fosforamidita y un método con H-fosfonato. Los métodos de síntesis química se pueden realizar usando un sintetizador de ácido nucleico automatizado comercialmente disponible, por ejemplo. En los métodos de síntesis química, en general se usa amidita. La amidita no está particularmente limitada. Los ejemplos de amiditas comercialmente disponibles incluyen fosforamiditas de ARN (2'-O-TBDMSi, nombre comercial, Samchully Pharm. Co., Ltd.), amidita ACE, amidita TOM, amidita CEE, amidita CEM y amidita TEM.

5. Composición

La composición inhibidora de acuerdo a la presente invención es, como se describió anteriormente, una composición para inhibir la expresión de un gen diana, que contiene la molécula Nccs de la presente invención. La composición de la presente invención se caracteriza porque contiene la molécula Nccs de la presente invención y otras configuraciones no están de ningún modo limitadas. También se puede hacer referencia a la composición inhibidora de la presente invención como a un reactivo inhibidor, por ejemplo.

Por administración de la composición a un sujeto en el cual está presente el gen diana, es posible inhibir la expresión del gen diana.

Asimismo, como se describió anteriormente, la composición farmacéutica de acuerdo a la presente invención contiene la molécula Nccs de la presente invención. La composición farmacéutica de la presente invención se caracteriza porque contiene la molécula Nccs de la presente invención y otras configuraciones no están de ningún modo limitadas. También se puede hacer referencia a la composición farmacéutica de la presente invención como a un fármaco, por ejemplo.

Por administración de la composición farmacéutica a un paciente con una enfermedad causada por un gen, es posible inhibir la expresión del gen, consecuentemente tratando la enfermedad. El término "tratamiento" abarca: prevención de enfermedades; mejora de enfermedades; y mejora en el pronóstico, por ejemplo y puede hacer referencia a cualquiera de ellos.

Una enfermedad a ser tratada no está particularmente limitada y sus ejemplos incluyen enfermedades provocadas por la expresión de genes. Dependiendo del tipo de enfermedad, un gen que provoca la enfermedad puede ser establecido como el gen diana y adicionalmente, dependiendo del gen diana, la secuencia inhibidora de expresión puede ser establecida como apropiada.

Un ejemplo específico es el siguiente. Al establecer el gen de TGF- β 1 como el gen diana e incorporar una secuencia inhibidora de expresión para este gen en la molécula Nccs, la molécula Nccs se puede usar para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, específicamente, daño pulmonar agudo y similares, por ejemplo.

El método para usar la composición inhibidora y la composición farmacéutica (en lo sucesivo, ambas composiciones simplemente denominadas "las composiciones") no está particularmente limitado y sus ejemplos incluyen administrar la molécula Nccs a un sujeto que tiene el gen diana.

Los ejemplos del sujeto al cual se le administra la molécula Nccs de la presente invención incluyen células, tejidos y órganos. Los ejemplos del sujeto también incluyen seres humanos y animales no humanos tal como mamíferos no humanos, es decir, mamíferos excluyendo seres humanos. La administración se puede realizar *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo. Las células no están particularmente limitadas y los ejemplos de estas incluyen: diferentes células cultivadas como células HeLa, células 293, células NIH3T3 y células COS; células madre tal como células ES y células madre hematopoyéticas; y células aisladas de organismos vivos, tal como células de cultivos primarios.

El método de administración no está particularmente limitado y puede determinarse como apropiado dependiendo del sujeto, por ejemplo. Cuando el sujeto es una célula cultivada, el método de administración puede ser un método que usa un reactivo para transfección, un método de electroporación o similar, por ejemplo.

Cada una de las composiciones de la presente invención puede contener sólo la molécula Nccs de la presente invención o pueden contener también uno o más aditivos además de la molécula Nccs, por ejemplo. El aditivo no está particularmente limitado y preferentemente es un aditivo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo. El tipo de aditivo no está particularmente limitado y se puede seleccionar como apropiado dependiendo del tipo de sujeto, por ejemplo.

En la composición de la presente invención, la molécula Nccs puede formar un complejo con el aditivo, por ejemplo. El aditivo también puede denominarse agente complejante, por ejemplo. La formación del complejo permite que la molécula Nccs se administre eficazmente, por ejemplo. El enlace entre la molécula Nccs y el agente complejante no están particularmente limitado y sus ejemplos incluyen enlaces no covalentes. El complejo puede ser un complejo de inclusión, por ejemplo.

El agente complejante no está particularmente limitado y los ejemplos del mismo incluyen polímeros, ciclodextrinas y

adamantina. Los ejemplos de las ciclodextrinas incluyen copolímeros de ciclodextrinas lineales y copolímeros de ciclodextrinas oxidadas lineales.

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

- 5 El vehículo preferentemente es un polímero, más preferentemente un biopolímero, por ejemplo. Preferentemente, el vehículo es biodegradable, por ejemplo. Los ejemplos del vehículo incluyen: proteínas tales como albúmina sérica humana (ASH), lipoproteína de baja densidad (LDL) y globulina; hidratos de carbono tales como, por ejemplo, dextrano, pululano, quitina, quitosano, inulina, ciclodextrina y ácido hialurónico; y lípidos. Como vehículo, se puede usar un polímero sintético tal como un poliaminoácido sintético, por ejemplo. Los ejemplos del poliaminoácido
- 10 incluyen polilisina (PLL), poliácido L-aspartico, poliácido L-glutámico, copolímero estireno-anhídrido maleico, copolímero poli(L-láctido-co-glicólido), copolímero divinil éter-anhídrido maleico, copolímero *N*-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMA), polietilenglicol (PEG), polivinilalcohol (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrilico), polímero *N*-isopropilacrilamida y polifosfazina.

- 15 Los ejemplos de la sustancia de unión incluyen hormona estimulante de tiroides, hormona estimulante de melanocitos, lectina, glicoproteínas, proteína A tensioactiva, hidrato de carbono mucina, lactosa multivalente, galactosa multivalente, *N*-acetil-galactosamina, *N*-acetil-glucosamina, manosa multivalente, fucosa multivalente, poliaminoácido glicosilado, galactosa multivalente, transferrina, bisfosfonato, poliácido glutámico, poliácido aspartico, lípidos, colesterol, esteroides, ácido biliar, folato, vitamina B12, biotina, Neproxina, péptido RGD y péptido mimético RGD.

- 20 Los ejemplos del agente fusogénico y el agente condensante incluyen cadenas de poliamino tal como polietilenimina (PEI). La PEI puede ser lineal o ramificada y también, puede ser sintética o de origen natural, por ejemplo. La PEI puede ser sustituida por un alquilo o un lípido, por ejemplo. Como agente fusogénico es también posible usar polihistidina, polimidazol, polipiridina, polipropilenimina, melitina, una sustancia poliacetal (por ejemplo, poliacetal catiónico o similar), o similar, por ejemplo. El agente fusogénico puede tener una estructura α -helicoidal, por ejemplo.
- 25 El agente fusogénico puede ser un agente que altera la membrana tal como melitina, por ejemplo.

En cuanto a las composiciones de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, la formación del complejo y similares se describen en la patente de los EE.UU. núm. 6.509.323, en la publicación de patente de los EE.UU. núm. 2003/0008818, y en el documento WO 2004 080406 (solicitud internacional núm. PCT/US04/07070).

- 30 Otros ejemplos del aditivo incluyen moléculas anfífilas. La molécula anfífila es una molécula que tiene una región hidrófoba y una región hidrófila, por ejemplo. La molécula preferentemente es un polímero, por ejemplo. El polímero puede tener, por ejemplo, una estructura secundaria, preferentemente una estructura secundaria repetitiva. Específicamente, se prefiere un polipéptido y se prefiere incluso más un polipéptido α -helicoidal y similares, por ejemplo.

- 35 El polímero anfífilo puede ser un polímero que tiene dos o más subunidades anfífilas, por ejemplo. Los ejemplos de la subunidad incluyen subunidades con una estructura cíclica que tiene al menos un grupo hidrófilo y un grupo hidrófobo. La subunidad puede contener esteroides tal como ácido cólico, una estructura aromática y similares, por ejemplo. El polímero puede contener, por ejemplo, una subunidad de estructura cíclica, tal como una subunidad aromática y un aminoácido.

6. Método inhibidor

- 40 La expresión de un gen diana se puede inhibir mediante el uso de la molécula Nccs de la presente invención. El método para efectuar dicha inhibición se caracteriza porque la molécula Nccs de la presente invención se usa en el mismo, y otros pasos y condiciones no se encuentran de ningún modo limitados.

- 45 El mecanismo por el cual se inhibe la expresión de genes no está particularmente limitado y los ejemplos de este incluyen la inhibición de la expresión por interferencia por ARN o un fenómeno similar a interferencia por ARN. El método inhibidor es, por ejemplo, un método para inducir interferencia por ARN que inhibe la expresión de un gen diana, y también se puede hacer referencia a un método inhibidor que se caracteriza porque la molécula Nccs de la presente invención se usa en el mismo.

- 50 El método inhibidor incluye el paso de administrar la molécula Nccs a un sujeto en el cual está presente el gen diana, por ejemplo. Por el paso de administración, la molécula Nccs se pone en contacto con el sujeto al cual se le administra la molécula Nccs, por ejemplo. De acuerdo con el método *in vitro* de la invención, la molécula Nccs se administra a células, tejidos y órganos. Los ejemplos del sujeto también incluyen animales humanos y no humanos tal como mamíferos no humanos, es decir, mamíferos excluyendo seres humanos. La administración se puede realizar *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo.

- 55 En el método inhibidor, la molécula Nccs se puede administrar sola, o se puede administrar la composición de la presente invención que contiene la molécula Nccs, por ejemplo. El método de administración no está particularmente limitado y se puede seleccionar como apropiado dependiendo del tipo de sujeto, por ejemplo.

7. Método de tratamiento

Se puede tratar una enfermedad con un método que incluye el paso de administrar la molécula Nccs de la presente invención a un paciente y la molécula Nccs incluye, como la secuencia inhibidora de expresión, una secuencia que inhibe la expresión de un gen que provoca la enfermedad. El método de tratamiento se caracteriza porque la molécula Nccs de la presente invención se usa en el mismo, y otros pasos y condiciones no están de ningún modo limitados.

La descripción referida al método inhibitor también aplica al método de tratamiento, por ejemplo. El método de administración no está particularmente limitado y puede ser administración oral o administración parenteral, por ejemplo.

8. Uso de la molécula Nccs

La molécula Nccs de la presente invención se emplea para inhibir la expresión de un gen diana. Además, la molécula Nccs de la presente invención se utiliza para inducir interferencia por ARN.

La molécula de ARN de acuerdo con la presente invención es una molécula de ARN para uso en el tratamiento de una enfermedad. La molécula de ARN es la molécula Nccs de la presente invención, y la molécula Nccs incluye, como la secuencia inhibidora de expresión, una secuencia que inhibe la expresión de un gen que provoca la enfermedad.

A continuación, la presente invención se describirá en detalle en relación a los ejemplos y similares. Se debe destacar, sin embargo, que la presente invención no está de ningún modo limitada a los mismos.

Ejemplos

(Ejemplo A1) Síntesis de ARN

Como ARN (ex) del presente ejemplo, se sintetizó el ARNcs (NK-0016) que se muestra más abajo. NK-0016 incluye una secuencia 19-mer inhibidora de expresión (SEC ID NÚM: 1) que inhibe la expresión del gen de GAPDH. En la secuencia de NK-0016, una región entre una región (Xc) y una región (X) es una región conectora (Lx), y una región entre una región (Y) y una región (Yc) es una región conectora (Ly) (a partir de aquí las mismas). En esta secuencia, la región 5' (Xc) y la región 3' (Yc) se indican con letras minúsculas (a partir de aquí las mismas).

Secuencia inhibidora de expresión para el gen de GAPDH (SEC ID NÚM: 1)

5'-GUUGUCAUACUUCUCAUGG-3'

Ex: NK-0016 (SEC ID NÚM: 2)

5'- caugagaaguaugacaacagcc CACACC GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUC Ggaa -3'

Xc X Y Yc

Como ARN de un ejemplo comparativo, se sintetizó el ARNcd (NI-0011) que se muestra más abajo como un control positivo (Pc) de ARNi. NI-0011 tiene una sobre-extensión de dos bases en el extremo 3' de cada cadena simple, y la cadena simple de la SEC ID NÚM: 4 tiene la secuencia 19-mer inhibidora de expresión descrita anteriormente, de modo similar a NK-0016.

Pc: NI-0011

5' - CCAUGAGAAGUAUGACAACAG -3' (SEC. ID. NÚM: 3)

3' - UUGGUACUCUUCAUACUGUUG -5' (SEC. ID. NÚM: 4)

Los ARN se sintetizaron en función de un método de fosforamidita con el uso de un sintetizador de ácido nucleico (nombre comercial: ABI Expedite (marca registrada) 8909 Nucleic Acid Synthesis System, Applied Biosystems). En la síntesis, se usaron Fosforamiditas de ARN (2'-O-TBDMSi, nombre comercial, Samchully Pharm. Co., Ltd.) como amiditas de ARN (lo mismo aplica de aquí en adelante). Las amiditas se desprotegeron por un método convencional. Los ARN sintetizados se purificaron por HPLC. Se liofilizó cada uno de los ARN purificados. En los siguientes ejemplos, la síntesis de ARN se realizó del mismo modo que en el presente ejemplo, a menos que se indique de otro modo.

El ARN liofilizado se disolvió en agua destilada para inyección (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., a partir de aquí lo mismo) para alcanzar las concentraciones deseadas.

(Ejemplo A2) Efecto inhibitor sobre la expresión del gen de GAPDH en células HCT116

Usando el ARNs de la presente invención, se examinó la inhibición de la expresión del gen de GAPDH *in vitro*.

(1) Materiales y Métodos

Como ARN (Ex) del presente ejemplo, se usó el ARNs (NK-0016) del Ejemplo A1.

5 Ex: NK-0016 (SEC ID NÚM: 2)

5'-caugagaaguaugacaacagccCCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCGgaa-3'
Xc X Y Yc

Se prepararon soluciones de ARN disolviendo el ARN en agua destilada para inyección a fin de alcanzar las concentraciones deseadas. Se usaron células HCT116 (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) como las células. Se usó un medio McCoy 5A (Invitrogen) que contenía FBS al 10% como el medio. Las condiciones de cultivo se establecieron a 37°C y CO₂ 5%.

Primero, las células HCT116 se cultivaron en el medio y se dispensaron en una placa de 24 pocillos de modo que cada pocillo contuviera 400 µl del medio para alcanzar una densidad de 2×10^4 células/pocillo. Las células en los pocillos se cultivaron durante otras 24 horas. Luego las células se transfectaron con el ARN usando un reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (nombre comercial, Invitrogen) de acuerdo al protocolo provisto con el mismo. Concretamente, la transfección se realizó especificando la composición por pocillo de la siguiente manera. La concentración final del ARN en el pocillo se ajustó a 5 nmol/l, 10 nmol/l, 20 nmol/l o 40 nmol/l.

[Tabla 1]

(Composición por pocillo: µl)

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

Después de la transfección, las células en los pocillos se cultivaron durante 48 horas y luego se recolectó el ARN usando un kit de componentes RNeasy Mini (nombre comercial, Qiagen) de acuerdo al protocolo provisto con el mismo. Posteriormente, se sintetizó el ADNc a partir del ARN usando una transcriptasa inversa (nombre comercial: SuperScript III, Invitrogen) de acuerdo con el protocolo provisto con la misma. Luego se realizó una PCR usando el ADNc sintetizado de ese modo como molde y se midió el nivel de expresión del gen de GAPDH y el del gen de β-actina como estándar interno. El nivel de expresión del gen de GAPDH se corrigió en relación al del gen de β-actina.

La PCR se realizó usando LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (nombre comercial, Roche) como reactivo y un Light Cycler DX400 (nombre comercial, Roche) como instrumento (a partir de aquí el mismo). El gen de GAPDH y el gen de β-actina se ampliaron usando los siguientes conjuntos de cebadores, respectivamente.

Conjunto de cebadores para el gen de GAPDH

5'-GGAGAAGGCTGGGGCTCATTTGC-3' (SEC ID NÚM: 9)

5'-TGGCCAGGGGTGCTAAGCAGTTG-3' (SEC ID NÚM: 10)

Conjunto de cebadores para el gen de β-actina

5'-GCCACGGCTGCTTCCAGCTCCTC-3' (SEC ID NÚM: 11)

5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGTAC-3' (SEC ID NÚM: 12)

Como Control 1, respecto a las células a las cuales se habían agregado solamente 100 µl de (B), también se midieron los niveles de expresión de los genes (-). Además, como Control 2, respecto a las células sometidas a los mismos procedimientos de transfección como anteriormente, excepto que no se añadió la solución de ARN y que se añadieron (B) y 1,5 µl de (A) de modo que la cantidad total de (A) y (B) sería 100 µl, también se midió el nivel de expresión del gen (control de procedimiento).

Luego, el nivel de expresión corregido del gen de GAPDH en el control (-) se determinó como 1 y el de las células

transfectadas con el ARN en cada concentración se presentó como el valor relativo al del control (-).

(2) Resultados

Los resultados de los mismos se muestran en la Figura 4. La Figura 4 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen de GAPDH. Como se puede ver en la Figura 4, cuando se usó NK-0016, la cantidad de expresión fue menor que en el control (-) al cual no se agregó el ARN. Por lo tanto, se encontró que NK-0016 inhibe la expresión del gen de GAPDH. Además, como se puede ver en la Figura 4, se encontró que NK-0016 exhibe un efecto inhibitor en un modo dependiente de la dosis.

(Ejemplo A3) Efecto inhibitor sobre la expresión del gen de GAPDH en células HCT116

Usando el ARNs de la presente invención, se examinó la inhibición de la expresión del gen de GAPDH *in vitro*.

(1) Materiales y método

Como ARN (Ex) del presente ejemplo, se usó ARNs (NK-0016) del Ejemplo A1. Como ARN de un ejemplo comparativo, se usó ARNcd (NI-0011) como control positivo (Pc) de ARNi. La solución de ARN se preparó por disolución de cada uno de los ARN en agua destilada para inyección de modo de lograr una concentración de 40 $\mu\text{mol/l}$.

Se examinó el nivel de expresión del gen de GAPDH en las células HCT116 del mismo modo que en el Ejemplo A2, excepto que se usó la solución de ARN anterior. La concentración de ARN al momento de la transfección se ajustó a 40 nmol/l.

(2) Resultados

Los resultados de los mismos se muestran en la Figura 5. La Figura 5 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen de GAPDH y el eje vertical indica la cantidad de expresión relativa de los genes. Como se puede ver en la Figura 5, NK-0016 del ejemplo exhibió una actividad inhibitora muy potente, en comparación con NI-0011 del ejemplo comparativo.

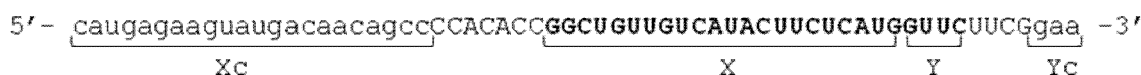
(Ejemplo A4) Efecto inhibitor sobre la expresión del gen de GAPDH en células A549 y células 293

Usando el ARNs de la presente invención, se examinó la inhibición de la expresión del gen de GAPDH *in vitro*.

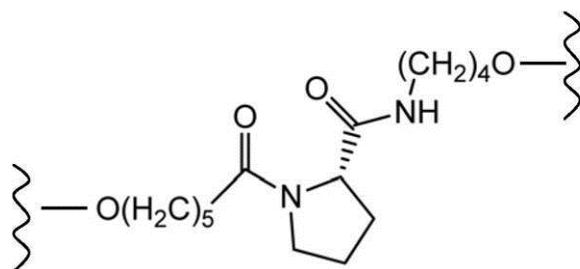
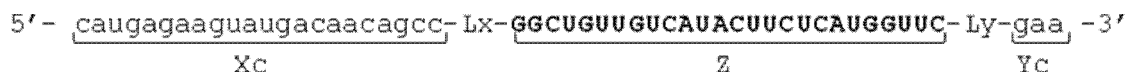
(1) Materiales y método

Como ARN (Ex) del presente ejemplo, se usaron NK-0016 del Ejemplo A1 y Ex-ARNs (PK-0004) que se muestran a continuación. En PK-0004, se proporcionaron una región conectora (Lx) y una región conectora (Ly) por unión del Compuesto 10 (L-prolina-diamida-amidita) en el Esquema 3 que se muestra en el Ejemplo B entre Xc y X, y entre Yc e Y, respectivamente. La fórmula química de ambos conectores se muestra a continuación. Las secuencias de NK-y Y.

Ex: NK-0016 (SEC ID NÚM: 2)



Ex: PK-0004 (SEC ID NÚM: 13)



La solución de ARN se preparó por disolución de cada uno de los ARN en agua destilada para inyección de modo de

lograr una concentración de 20 $\mu\text{mol/l}$. Se usaron células A549 y células 293 (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) como las células. Como medio para las primeras células, se usó DMEM que contenía FBS al 10% (Invitrogen). Como medio para las últimas células, se usó MEM que contenía FBS al 10% (Invitrogen). Las condiciones de cultivo se establecieron en 37°C y CO₂ 5%.

- 5 Primero, las células de cada tipo se cultivaron en el medio y se dispensaron a una placa de 24 pocillos de modo que cada pocillo contuviera 400 μl del medio para lograr una densidad de 5×10^4 células/pocillo. Las células en los pocillos se cultivaron durante otras 24 horas. Luego, las células se transfectaron con el ARN usando el reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (nombre comercial, Invitrogen) de acuerdo al protocolo provisto con el mismo. Específicamente, la transfección se realizó estableciendo la composición por pocillo como a continuación para las células A549 y las células 293. En la siguiente composición, (B) es Opti-MEM (nombre comercial, Invitrogen) y (C) es la solución de ARN de 20 $\mu\text{mol/l}$, y se agregaron de modo que la cantidad total de (B) y (C) fuese 98,5 μl o 99 μl . La concentración final del ARN en el pocillo se estableció en 1 nmol/l, 3 nmol/l o 10 nmol/l.

[Tabla 2]

(Composición por pocillo: μl)

	Células A549	Células 293
Medio	400	400
(A) Lipofectamine 2000	1,5	1
(B) + (C)	98,5	99
Total	500	500

- 20 Después de la transfección, se cultivaron las células durante 48 horas. Luego, se recogió el ARN, la síntesis del ADNc y PCR se llevaron a cabo del mismo modo que en el Ejemplo A2 y se determinó la cantidad de expresión relativa del gen de GAPDH.

(2) Resultados

- 25 Los resultados de los mismos se muestran en las Figuras 6 y 7. La Figura 6 muestra el resultado obtenido respecto a las células A549, y la Figura 7 muestra el resultado obtenido respecto a las células 293. Las Figuras 6 y 7 son cada una un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen de GAPDH. Como se puede observar a partir de las Figuras 6 y 7, se encontró que NK-0016 y PK-0004 de acuerdo al presente ejemplo exhiben una actividad inhibidora potente y exhiben un efecto inhibitor en un modo dependiente de la concentración.

(Ejemplo A5) Efectos inhibidores sobre la expresión del gen de TGF- β 1 en células Hepa1-6

- 30 Respecto al ARNcs de la presente invención, se examinó el efecto de inhibir la expresión del gen de TGF- β 1 *in vitro*.

(1) Materiales y método

Como ARN (Ex) del presente ejemplo, se usó el ARNcs (NK-0033) que se muestra a continuación. NK-0033 incluye la siguiente secuencia 21-mer que inhibe la expresión del gen de TGF- β 1. Esta secuencia se designó basada en el ARNpi usado por Cheng y col. (Mol. Pharm., 2009, 6, pág. 772-779).

- 35 Secuencia inhibidora de la expresión del gen de TGF- β 1 (SEC ID NÚM: 16)

5'-AAAGUCA AUGUACAGCUGCUU-3'

Como ARN de un ejemplo comparativo, se usó ARNcs (NK-0035) que se muestra a continuación como ARNi control negativo (Nc). Se diseñó NK-0035 para incorporar, en lugar de la secuencia inhibidora de expresión, una secuencia mezclada al azar que no estuviese implicada en la inhibición de la expresión.

- 40 Ex: NK-0033 (SEC ID NÚM: 80)

5' - cagcuguacauugacuuuagccc CCACACCGGCUAAAGUCA AUGUACAGCUGCUU CUUCGgaa - 3'
Xc Z Yc

Nc: NK-0035 (SEC ID NÚM: 15)

5' - ugucagugcucauuuacaagccc CCACACCGGCUUGUAAAUGAGCACUGACACUUCUUCGgaa - 3'
Xc Z Yc

Se preparó solución de ARN disolviendo los ARN en agua destilada para inyección. Como células se usaron las células Hepa1-6 (RIKEN BioResource Center) y como medio se usó DMEM que contenía FBS al 10% (Invitrogen). Las condiciones de cultivo se establecieron a 37°C y CO₂ 5%.

- 5 Primero, las células Hepa1-6 se cultivaron en el medio y se dispensaron en una placa de 24 pocillos de modo que cada pocillo contuviera 400 µl del medio para alcanzar una densidad de 3×10^4 células/pocillo. Las células en los pocillos se cultivaron durante otras 24 horas. Luego, las células se transfectaron con el ARNs usando el reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (nombre comercial, Invitrogen) de acuerdo al protocolo provisto con el mismo. Específicamente, la transfección se realizó ajustando la composición por pocillo como a continuación. En la siguiente composición, (B) es Opti-MEM (nombre comercial, Invitrogen) y (C) es la solución de ARN de 20 µmol/l y se agregaron de modo que la cantidad total de (B) y (C) fuese 98,5 µl. La final concentración del ARN en el pocillo se ajustó a 10 nmol/l, 25 nmol/l, 50 nmol/l o 100 nmol/l.

[Tabla 3]

(Composición por pocillo: µl)

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

- 20 Después de la transfección, las células en los pocillos se cultivaron durante 48 horas, y luego, se recolectó el ARN usando un kit de componentes RNeasy Mini (nombre comercial, Qiagen) de acuerdo al protocolo provisto con el mismo. Posteriormente, se sintetizó el ADNc a partir del ARN usando una transcriptasa inversa (nombre comercial: SuperScript III, Invitrogen) de acuerdo al protocolo provisto con la misma. Luego, se realizó la PCR del mismo modo que en el Ejemplo A2, excepto que se usó el siguiente conjunto de cebadores para el gen de TGF-β1 y el siguiente conjunto de cebadores para el gen de β-actina y se midió el nivel de expresión del gen de TGF-β1 y el del gen de β-actina como estándar interno. El nivel de expresión del gen de TGF-β1 se corrigió en relación al del gen de β-actina.

- 25 Conjunto de cebadores para el gen de TGF-β1

5'-CCATTGCTGTCCCGTGCAGAGCTG-3' (SEC ID NÚM: 17)

5'-ATGGTAGCCCTTGGGCTCGTGGATC-3' (SEC ID NÚM: 18)

Conjunto de cebadores para la ampliación del gen de β-actina

5'-GTCGTACCACAGGCATTGTGATGG-3' (SEC ID NÚM: 19)

- 30 5'-GCAATGCCTGGGTACATGGTGG-3' (SEC ID NÚM: 20)

Respecto al control (–) y al control (control de procedimiento), se midió el nivel de expresión del mismo modo que en el Ejemplo A2. El nivel de expresión corregido del gen de TGF-β1 en el control (–) se estableció en 1 y el de las células transfectadas con cada ARN se presentó como el valor relativo al del control.

(2) Resultados

- 35 Los resultados de los mismos se muestran en la Figura 8. La Figura 8 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen de TGF-β1. Como se puede ver en la Figura 8, NK-0033 de acuerdo al ejemplo inhibió la expresión del gen de TGF-β1 *in vitro*. Por otra parte, NK-0035 como control negativo no inhibió la expresión del gen de TGF-β1.

(Ejemplo A6) Efectos inhibidores sobre la expresión del gen de TGF-β1 y daño pulmonar agudo *in vivo*

- 40 Respecto al ARNs de la presente invención, se examinaron los efectos inhibidores sobre la expresión y el daño pulmonar agudo *in vivo*. Estos efectos se examinaron de acuerdo al método descrito por Takagi y col. (J. Thromb Hemost 2009; 7: pág. 2053-2063).

(1) Materiales y método

(1.1) Administración de ARNs a ratones con daño pulmonar agudo

- 45 Como ARN (Ex) del presente ejemplo, se usó el ARNs (NK-0033) del Ejemplo A5. Como ARN de un ejemplo comparativo, se usó ARNs (NK-0035) como ARNi control negativo (Nc) que se muestra en el Ejemplo A5.

Se preparó solución de ARN por disolución de 100 µg de cada uno de los ARNs en 80 µl de solución salina

fisiológica estéril (Nippon Kayaku Co., Ltd., a partir de aquí la misma). Por otra parte, se preparó una solución de LPS por disolución de 100 µg de lipopolisacárido (LPS) en 50 µl de solución salina fisiológica estéril.

Primero, se instilaron 80 µl de la solución de ARN en las tráqueas de los ratones. Luego, 1 hora después de la instilación, se instilaron 50 µl de la solución de LPS en las tráqueas de los ratones para inducir daño pulmonar.

- 5 Como control negativo para el LPS, se usaron 50 µl de solución salina fisiológica estéril que no contenían LPS en lugar de la solución de LPS. Además, como control negativo para la solución de ARN se usaron 80 µl de solución salina fisiológica estéril.

Los grupos de administración se presentan a continuación. En cada grupo de administración, se usaron entre cuatro y seis ratones.

- 10 Grupo de administración 1:

1 hora después de la administración de 80 µl de la solución salina fisiológica estéril, se administraron 50 µl de la solución salina fisiológica estéril.

Grupo de administración 2:

- 15 1 hora después de la administración de 80 µl de la solución de ARN (NK-0033), se administraron 50 µl de la solución salina fisiológica estéril.

Grupo de administración 3:

1 hora después de la administración de 80 µl de la solución de ARN (NK-0035), se administraron 50 µl de la solución salina fisiológica estéril.

Grupo de administración 4:

- 20 1 hora después de la administración de 80 µl de la solución salina fisiológica estéril, se administraron 50 µl de la solución de LPS.

Grupo de administración 5:

1 hora después de la administración de la solución de ARN (NK-0033), se administraron 50 µl de solución de LPS.

Grupo de administración 6:

- 25 1 hora después de la administración de la solución de ARN (NK-0035), se administraron 50 µl de solución de LPS.

(1.2) Muestreo de fluido de lavado broncoalveolar (FLBA)

- 30 Veinticuatro horas después de la instilación de la solución de LPS, se sacrificaron los ratones mediante administración de un exceso de pentobarbital a sus cavidades abdominales, y se usaron como muestras para el análisis bioquímico y el análisis histológico. Como control negativo, se usó solución salina fisiológica estéril en lugar de la solución de LPS.

- 35 Se recogieron muestras de sangre mediante punción de los corazones de los ratones. Se agregó cada muestra de sangre a un tubo de ensayo con una solución acuosa al 3,8% de citrato de sodio. La cantidad (volumen) de solución acuosa de citrato de sodio se estableció en 1/10 de la muestra de sangre. Se tomó una muestra de FLBA a partir de esta mezcla en la forma que se describió en Yasui et al. (Am J Respir Crit Care Med 2001: 163: 1660-8). Luego, se midió el número total de células en la muestra de FLBA usando un Nucleo Counter (nombre comercial, ChemoMetec).

- 40 Se centrifugó la muestra de FLBA y se recogió el sobrenadante de la muestra de FLBA. El sobrenadante se conservó a -80°C hasta que se llevó a cabo el análisis bioquímico. Asimismo, con el objetivo de contar los diferentes tipos de células contenidas en la muestra de FLBA, se centrifugó la muestra de FLBA usando un Cytospin, y se sometió a las células separadas a tinción de Giemsa usando un May-Grunwald-Giemsa (nombre comercial, Merck). También se recogieron los tejidos pulmonares de los ratones y luego se tiñeron con HE.

(2) Resultados

(2.1) Inhibición de expresión de TGF-β1 en pulmón

- 45 Respecto a cada muestra de pulmón de los ratones, se midió el nivel de expresión del gen TGF-β1 por unidad de peso de pulmón usando un TGF-β1 Quantikine Colorimetric Sandwich ELISA (nombre comercial, R&D Systems).

Los resultados de los mismos se muestran en la Figura 9. La Figura 9 es un gráfico que muestra el nivel de expresión de TGF-β1 por unidad de peso de pulmón en cada grupo de administración. En el grupo de administración 4 (LPS (+)/ARN (-)), el nivel de expresión de TGF-β1 se incrementó como resultado del tratamiento con el LPS, en

comparación con el del grupo de administración 1 (LPS (-)/ARN (-)). En el grupo de administración 5 (LPS (+)/NK-0033 (+)) del ejemplo, se inhibió un incremento del nivel de expresión de TGF- β 1 en comparación con el del grupo de administración 4 (LPS (+)/ARN (-)). Este efecto inhibitor no se observó en el grupo de administración 6 (LPS (+)/control negativo NK-0035 (+)). Estos resultados demuestran que el NK-0033 del ejemplo puede inhibir de forma eficaz la expresión del gen de TGF- β 1.

(2.2) Efecto inhibitor sobre daño agudo de pulmón

La inflamación en el daño agudo de pulmón está causada por la infiltración de células tales como neutrófilos en los pulmones. Por lo tanto, se pueden utilizar fármacos que inhiben la infiltración de células tales como neutrófilos en los pulmones se pueden como agentes terapéuticos para la inflamación en daño agudo de pulmón. Por lo tanto, se examinó el efecto farmacológico del ARNcs de la presente invención mediante el recuento del número de células en el fluido de lavado broncoalveolar (FLBA) como indicador del número de células que habían infiltrado los pulmones.

Los resultados del recuento del número de células en la muestra de FLBA se muestran en la Figura 10. La Figura 10 es un gráfico que muestra el número de células en la muestra de FLBA en cada grupo de administración. En el grupo de administración 4 (LPS (+)/ARN (-)), el número de células en la muestra de FLBA se incrementó como resultado del tratamiento con LPS, en comparación con el del grupo de administración 1 (LPS (-)/ARN (-)). Esto indica que el LPS indujo una acción inflamatoria, mediante lo cual se permitió que las células infiltren los pulmones. En el grupo de administración 5 (LPS (+)/NK-0033 (+)) del ejemplo, se inhibió un incremento del número de células en comparación con el del grupo de administración 4 (LPS (+)/ARN (-)). Esto indica que la inflamación en el daño agudo de pulmón fue inhibida por NK-0033. Este efecto inhibitor no se observó en el grupo de administración 6 (LPS (+)/control negativo NK-0035 (+)). Estos resultados demuestran que el NK-0033 del ejemplo puede inhibir la inflamación en el daño agudo de pulmón de forma eficaz.

Los resultados de la medición del número de neutrófilos en la muestra de FLBA se exponen en la Figura 11. La Figura 11 es un gráfico que muestra el número de neutrófilos en la muestra de FLBA en cada grupo de administración. En el grupo de administración 4 (LPS (+)/ARN (-)), el número de neutrófilos en la muestra de FLBA se incrementó como resultado del tratamiento con LPS, en comparación con el del grupo de administración 1 (LPS (-)/ARN (-)). Esto indica que el LPS indujo una acción inflamatoria, mediante la cual se permitió que los neutrófilos infiltren los pulmones. En el grupo de administración 5 (LPS (+)/NK-0033 (+)) del ejemplo, se inhibió un incremento en el número de neutrófilos en la muestra de FLBA en comparación con el del grupo de administración 4 (LPS (+)/ARNcs (-)). Esto indica que se inhibió la inflamación en daño agudo de pulmón mediante NK-0033. Este efecto inhibitor no se observó en el grupo de administración 6 (LPS (+)/control negativo NK-0035 (+)). Estos resultados demuestran que el NK-0033 del ejemplo puede inhibir la inflamación en daño agudo de pulmón de forma eficaz.

(2.3) Observación histológica: tinción de Giemsa

Los resultados de la tinción de Giemsa se muestran en la Figura 12. La Figura 12 muestra fotografías ($\times 100$) en donde cada una muestra el resultado de la tinción de Giemsa de las células en la muestra de FLBA. La Figura 12A muestra el resultado obtenido respecto al grupo de administración 4 (LPS (+)/ARN (-)). La Figura 12B muestra el resultado obtenido respecto al grupo de administración 6 (LPS (+)/control negativo NK-0035 (+)). La Figura 12C muestra el resultado obtenido respecto al grupo de administración 5 (LPS (+)/NK-0033 (+)).

Como se puede ver en la Figura 12, en el grupo de administración 5 (Figura 12C: LPS (+)/NK-0033 (+)) del ejemplo, el número de células que han infiltrado los pulmones fue marcadamente menor que en el grupo de administración 4 (Figura 12A: LPS (+)/ARN (-)) y que en el grupo de administración 6 (Figura 12B: LPS (+)/control negativo NK-0035 (+)). Los resultados de esta observación histológica concuerdan con los resultados del recuento del número de células en la muestra de FLBA que se describió previamente.

(2.4) Observación histológica: tinción de HE

Los resultados de la tinción de HE se muestran en la Figura 13. La Figura 13 muestra fotografías ($\times 10$) en donde cada una muestra el resultado de la tinción de HE del tejido pulmonar. La Figura 13A muestra el resultado obtenido respecto al grupo de administración 4 (LPS (+)/ARN (-)). La Figura 13B muestra el resultado obtenido respecto al grupo de administración 6 (LPS (+)/control negativo NK-0035 (+)). La Figura 13C muestra el resultado obtenido respecto al grupo de administración 5 (LPS (+)/NK-0033 (+)). A partir de la Figura 13, se halló que disminuyó la infiltración de las células tales como neutrófilos en la proximidad de los vasos sanguíneos, los espacios alveolares, las paredes alveolares y en la proximidad de los tubos bronquiales, y que disminuyeron los daños a los tejidos pulmonares.

(Ejemplo A7) Evaluación de efectos colaterales usando inducción de interferón como indicador

Se sabe que los agentes de ARNi convencionales traen aparejado el efecto colateral de que se induce el interferón de una forma independiente de la secuencia, y que este efecto colateral se percibe como un problema. Por lo tanto, respecto a los ARNcs de la presente invención, se evaluó la inducción de interferón como efecto colateral.

(1) Materiales y método

Se administraron los ARNCs a ratones con daño agudo de pulmón de la misma forma y bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo A6. Luego, 24 horas después de la instilación de la solución de LPS o solución salina fisiológica estéril (control negativo para LPS), los ratones fueron sacrificados y se recogieron sus tejidos pulmonares.

5 [Tabla 4]

Grupo de administración	ARN	LPS
1	–	–
2	Ex: NK-0033	–
4	–	+
5	Ex: NK-0033	+

EX: ARN del ejemplo

10 Con el objetivo de medir el nivel de expresión para cada gen, se aisló ARN de cada uno de los tejidos pulmonares usando TRIZOL (nombre comercial, Invitrogen). Luego, se sintetizó el ADNc a partir del ARN usando una transcriptasa inversa (nombre comercial: SuperScriptII, Invitrogen) de acuerdo al protocolo provisto con el producto. Luego, se llevó a cabo la PCR usando el ADNc sintetizado de ese modo como molde, y se midieron los niveles de expresión del gen de TGF- β 1, el gen de IFN- α y el gen de IFN- β .

La PCR se llevó a cabo usando Gold AmpliTaq (nombre comercial, Applied Biosystem, EE.UU.) como reactivo y AB Applied Biosystem 7600 (nombre comercial, Applied Biosystem) como instrumento de medición. Se ampliaron el gen de TGF- β 1, el gen de IFN- α y el gen de IFN- β usando los siguientes juegos de cebadores, respectivamente.

15 Conjunto de cebadores para el gen de GAPDH

5'-CCCTTATTGACCTCAACTACATGGT-3' (SEC ID NÚM: 21)

5'-GAGGGGCCATCCACAGTCTTCTG-3' (SEC ID NÚM: 22)

Conjunto de cebadores para el gen de TGF- β 1

5'-ACTCCACGTGGAAATCAACGG-3' (SEC ID NÚM: 23)

20 5'-TAGTAGACGATGGGCACTGG-3' (SEC ID NÚM: 24)

Conjunto de cebadores para el gen de IFN- α

5'-ATGGCTAGRCTCTGTGCTTCCT-3' (SEC ID NÚM: 25)

5'-AGGGCTCTCCAGAYTTCTGCTCTG-3' (SEC ID NÚM: 26)

Conjunto de cebadores para el gen de IFN- β

25 5'-CATCAACTATAAGCAGCTCCA-3' (SEC ID NÚM: 27)

5'-TTCAAGTGGAGAGCAGTTCAG-3' (SEC ID NÚM: 28)

30 Luego, cada uno de los productos de PCR obtenidos de ese modo se sometió a electroforesis en gel de agarosa. El análisis de la densidad del gel de agarosa se llevó a cabo usando un sistema de adquisición de imágenes NIH, y se midieron los niveles de expresión de los genes respectivos. Se evaluaron los niveles de expresión del gen de TGF- β 1, gen de IFN- α y gen de IFN- β relativamente en referencia al nivel de expresión del gen de GAPDH como estándar. Específicamente, la intensidad medida para el producto de PCR que se obtuvo usando el conjunto de cebadores para GAPDH, se estableció como 1, y los de los genes respectivos se evaluaron como valor relativo al de GAPDH.

(2) Resultados y consideración

35 Los resultados del análisis cuantitativo respecto a los niveles de expresión del gen de TGF- β 1, gen de IFN- α e IFN- β gen se muestran en los gráficos de las Figuras 14A a 14C, respectivamente. Los grupos de administración son como se muestran más abajo y son los mismos que en el Ejemplo A6.

La Figura 14A muestra los resultados de la medición del nivel de expresión del gen de TGF- β 1. Como se puede ver en la Figura 14A, en el grupo de administración 5 del ejemplo al que se administró NK-0033, se inhibió un

incremento en la expresión del gen de TGF-β1 inducido por LPS, en comparación con el del grupo de administración 4 (ARN (-)). Este resultado se correlaciona con los resultados de la medición del nivel de expresión de TGF-β1 en el Ejemplo A5, que se muestran en la Figura 8.

La Figura 14B muestra los resultados de la medición del nivel de expresión del gen de IFN-α y la Figura 14C muestra los resultados de la medición del nivel de expresión del gen de IFN-β. Como se puede ver en las Figuras 14B y 14C, cuando no se instiló LPS, a partir de la comparación entre el grupo de administración 1 (ARN (-)) y el grupo de administración 2 (ARN (+)) se halló que las expresiones del gen de IFN-α y del gen de IFN-β, los cuales son ambos interferón de tipo I, no se indujeron mediante la instilación de los ARNcs. También, como se puede ver en las Figuras 14B y 14C, cuando se instiló LPS, a partir de la comparación entre el grupo de administración 4 (ARN (-)) y el grupo de administración 5 (NK-0033 (+)) se halló que las expresiones tanto del gen de IFN-α como del gen de IFN-β no se indujeron mediante la instilación de los ARNcs.

Estos resultados contrastan con el hecho de que el uso de ARNpi convencionales causa el efecto colateral de inducción del interferón de tipo I. O sea, se demuestra que, inesperadamente, el ARNcs de la presente invención no causa una inducción de interferón como el efecto colateral que se ha percibido como un problema en los ARNpi convencionales.

(Ejemplo A8) Efecto inhibitor sobre la expresión del gen de TGF-β1 en células Hepa1-6

Respecto a los ARNcs de la presente invención, se examinó el efecto inhibitor sobre la expresión del gen de TGF-β1 *in vitro*.

(1) Materiales y método

Como los ARN (Ex) del presente ejemplo, se usaron NK-0033 del Ejemplo A5 y NK-0061, NK-0055 y NK-0062 que se muestran a continuación adelante. En las siguientes secuencias, "*" indica una base desapareada.

Ex: NK-0033 (SEC ID NÚM: 80)

5' - cagcuguacauugacuuuagccCCACACCGGCUAAAGUCA AUGUACAGCUGCUUC^{*}UUCGgaa-3'
Xc Z Yc

Ex: NK-0061 (SEC ID NÚM: 29)

5' - agcuguacauugacuuuagccCCACACCGGCUAAAGUCA AUGUACAGCUGCUUC^{**}UUCGgaa-3'
Xc Z Yc

Ex: NK-0055 (SEC ID NÚM: 30)

5' - agcagcuguacauugacuuuagccCCACACCGGCUAAAGUCA AUGUACAGCUGCUUC^{*}UUCGg-3'
Xc Z Yc

Ex: NK-0062 (SEC ID NÚM: 31)

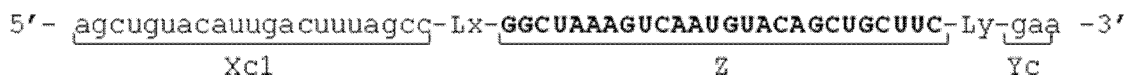
5' - gcagcuguacauugacuuuagccCCACACCGGCUAAAGUCA AUGUACAGCUGCUUC^{**}UUCGg-3'
Xc Z Yc

También, como los ARN (Ex) del presente ejemplo, se usaron PK-0007, PK-0026, PK-0027 y PK-0028 que se muestran más adelante. En cada uno de estos ARNcs, se proporcionaron una región conectora (Lx) y una región conectora (Ly) mediante la unión del Compuesto 10 (L-prolina-diamida-amidita) en el Esquema 3 que se muestra en los Ejemplos B entre Xc y X, y entre Yc e Y, respectivamente.

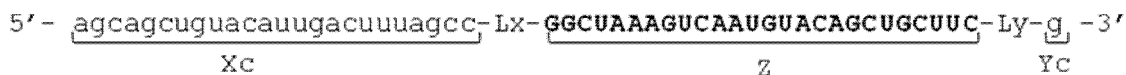
Ex: PK-0007 (SEC ID NÚM: 32)

5' - cagcuguacauugacuuuagcc-Lx-GGCUAAAGUCA AUGUACAGCUGCUUC-Ly-gaa-3'
Xc Z Yc

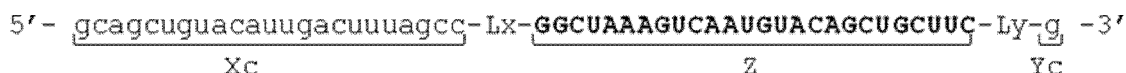
Ex: PK-0026 (SEC ID NÚM: 33)



Ex: PK-0027 (SEC ID NÚM: 34)



5 Ex: PK-0028 (SEC ID NÚM: 35)



Las secuencias de NK-0033, NK-0061, NK-0055 y NK-0062 son las mismas que las de PK-0007, PK-0026, PK-0027 y PK-0028, respectivamente, excepto por el primer conector (L1) y el segundo conector (L2). Todas ellas tienen una secuencia que inhibe la expresión del gen de TGF-β1 (SEC ID NÚM: 16).

10 (1.2) Inhibición de la expresión génica

Se preparó la solución de ARN disolviendo cada uno de los ARN que se habían crioconservado en agua destilada para inyección de forma de conseguir una concentración de 20 μmol/l. Luego, se llevó a cabo la transfección de los ARNs a las células Hepal-6, la recolección de los ARN, la síntesis de ADNc, la PCR y la determinación del nivel relativo de expresión del gen de TGF-β1 de la misma forma que en el Ejemplo A5, excepto porque se usó la solución de ARN mencionada previamente. La concentración de ARN al momento de la transfección se estableció en 1 nmol/l.

15 (2) Resultados

Los resultados de los mismos se muestran en las Figuras 15 y 16. Las Figuras 15 y 16 son cada una un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen de TGF-β1. La Figura 15 muestra los resultados que se obtuvieron cuando se usaron NK-0033, NK-0061, NK-0055 y NK-0062, y la Figura 16 muestra los resultados que se obtuvieron cuando se usaron PK-0007, PK-0026, PK-0027 y PK-0028. Como se puede ver en las Figuras 15 y 16, estos ARNs exhibieron todos potentes actividades inhibitoras.

(Ejemplo A9) Efectos inhibidores sobre la expresión del gen de TGF-β1 y daño agudo de pulmón *in vivo*

(A9-1) Efecto inhibidor sobre el efecto de expresión del gen de TGF-β1 *in vivo*

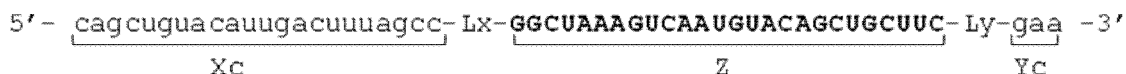
25 Usando los ARNs de la presente invención, se examinó el efecto de la inhibición de la expresión del gen de TGF-β1 *in vivo*.

(1) Materiales y método

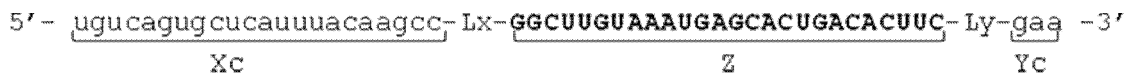
La administración del ARN a ratones con daño agudo de pulmón se llevó a cabo de la misma forma que en el Ejemplo A6, a menos que se indique de otro modo.

30 Como los ARN (Ex) del presente ejemplo, se usaron PK-0007 y NK-0033 del Ejemplo A8. A su vez, se usaron como ARN de un ejemplo comparativo, PK-0008 y NK-0035 como ARNi de control negativo (Nc), ARNcd (NI-0030) como ARNi de control positivo (Pc) y ARNcd (NI-0031) como ARNi de control negativo (Nc), los cuales se muestran más adelante. PK-0008 como control negativo tiene los conectores Lx y Ly que derivan de la amidita descrita previamente (Compuesto 10 en el Esquema 3: L-prolina-diamida-amidita), y estos conectores son los mismos que los de PK-0007.

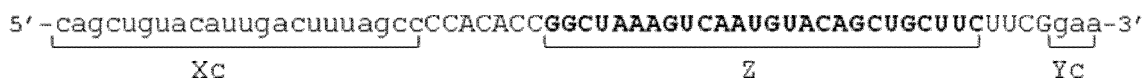
Ex: PK-0007 (SEC ID NÚM: 32)



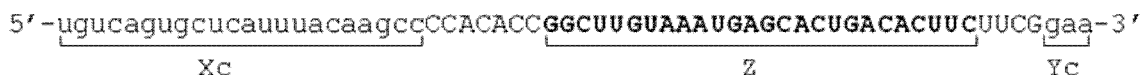
Nc: PK-0008 (SEC ID NÚM: 36)



Ex: NK-0033 (SEC ID NÚM: 80)



5 Nc: NK-0035 (SEC ID NÚM: 15)



Pc: NI-0030



Nc: NI-0031



- 10 Se preparó la solución de ARN mediante la disolución de 100 µg de cada uno de los ARN en 75 µl de solución salina fisiológica estéril. Por otro lado, se preparó una solución de LPS mediante la disolución de 100 µg de lipopolisacárido (LPS) en 50 µl de solución salina fisiológica estéril.

Los grupos de administración se muestran a continuación. A menos que se indique de otro modo, la administración se llevó a cabo de la misma forma que en el Ejemplo A6. En cada grupo de administración, se usaron entre cuatro y seis ratones.

Grupo de administración 1:

- 15 Cinco minutos después de la administración de 75 µl de solución salina fisiológica estéril, se administraron 50 µl de solución salina fisiológica estéril.

Grupo de administración 2:

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

- 20 Grupo de administración 3:

Cinco minutos después de la administración de 75 µl de la solución de ARN (PK-0007), se administraron 50 µl de la solución de LPS.

Grupo de administración 4:

- 25 Cinco minutos después de la administración de 75 µl de la solución de ARN (PK-0008), se administraron 50 µl de la solución de LPS.

Grupo de administración 5:

Cinco minutos después de la administración de 75 µl de la solución de ARN (NK-0033), se administraron 50 µl de la solución de LPS.

Grupo de administración 6:

- 30 Cinco minutos después de la administración de 75 µl de la solución de ARN (NK-0035), se administraron 50 µl de la solución de LPS.

Grupo de administración 7:

Cinco minutos después de la administración de 75 µl de la solución de ARN (NI-0030), se administraron 50 µl de la solución de LPS.

Grupo de administración 8:

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

Luego se prepararon muestras de pulmón y se midió el nivel de expresión de TGF-β1 por unidad de peso de pulmón de la misma forma que en el Ejemplo A6.

- 10 Los resultados de los mismos se muestran en la Figura 17. La Figura 17 es un gráfico que muestra por unidad de peso de pulmón en cada grupo de administración. En el grupo de administración 3 (LPS (+)/PK-0007 (+)) y el grupo de administración 5 (LPS (+)/NK-0033 (+)), el nivel de expresión del gen de TGF-β1 se inhibió en comparación con el del grupo de administración 2 (LPS (+)/ARNcs (-)). Se halló que estos efectos inhibidores fueron más fuertes que en el grupo de administración 7 (LPS (+)/control positivo NI-0030). En particular, en el grupo de administración 3 (LPS (+)/PK-0007 (+)), se observó un marcado efecto inhibidor. En los grupos de administración a los que se administraron los ARN de control negativo, o sea, el grupo de administración 4 (PK-0008), el grupo de administración 6 (NK-0035) y el grupo de administración 8 (NI-0031), no se observó ningún efecto inhibidor.
- 15

(A9-2) Efecto fuera de la diana *in vivo*

Usando los ARNcs de la presente invención, se examinó el efecto fuera de la diana *in vivo*, y se evaluó el efecto colateral.

- 20 Como ARN del presente ejemplo, se usó el ARNcs (PK-0007) del Ejemplo A8. Como ARN de un ejemplo comparativo, se usaron los ARNcs (PK-0008) como ARNi de control negativo (Nc), ARNcd (NI-0030) como ARNi de control positivo (Pc) y ARNcd (NI-0031) como ARNi de control negativo, los cuales se muestran en el Ejemplo A9-1. Se preparó la solución de ARN disolviendo 100 µg de cada uno de los ARN en 75 µl de solución salina fisiológica estéril.
- 25 Los grupos de administración se muestran a continuación. En cada grupo de administración, se usaron entre dos y cuatro ratones.

Grupo de administración 1:

Se administraron 75 µl de solución salina fisiológica estéril.

Grupo de administración 2:

- 30 Se administraron 75 µl de la solución de ARN (PK-0007).

Grupo de administración 3:

Se administraron 75 µl de la solución de ARN (PK-0008).

- 35 Luego, 24 horas después de la administración, se recogieron muestras de FLBA de los ratones, y se obtuvieron los sobrenadantes de las muestras de FLBA de la misma forma que en el Ejemplo A6. Se midió la cantidad de TNF-α y la cantidad de IFN-β en cada sobrenadante. Se cuantificó la cantidad de TNF-α usando un conjunto Mouse TNF set II (nombre comercial, Beckton Dickinson and Company) de acuerdo con sus instrucciones de uso. Se cuantificó la cantidad de IFN-β usando una placa de ELISA que se produjo usando Rabbit Anti-Mouse Interferon β (nombre comercial, PBL Interferon Source) y Biotin Labeling Kit-NH2 (nombre comercial, Dojindo Laboratories) de acuerdo con sus instrucciones de uso.

- 40 Los resultados de los mismos se muestran en la Figura 18. La Figura 18A es un gráfico que muestra la cantidad de TNF-α en la muestra de FLBA en cada grupo de administración, y la Figura 18B es un gráfico que muestra la cantidad de IFN-β en la muestra de FLBA en cada grupo de administración. En las Figuras 18A y 18B, el eje horizontal indica las cantidades respectivas. En el grupo de administración 2 (PK-0007 (+)), no se produjeron expresiones de TNF-α ni de IFN-β, en comparación con el grupo de administración 1 (ARN (-)).

- 45 (Ejemplo A10) Efecto inhibidor sobre la expresión de genes LAMA1 en células 293

Usando los ARNcs de la presente invención, se examinó la inhibición de la expresión de genes LAMA1 *in vitro*.

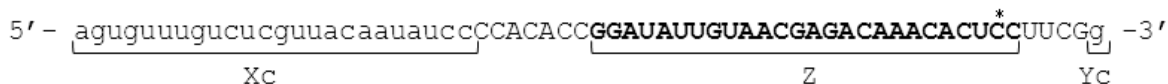
(1) Materiales y método

Como ARN (Ex) del presente ejemplo, se usaron NK-0043 y NK-0064 las que se muestran a continuación. En las siguientes secuencias, “*” indica una base desapareada (de aquí en adelante lo mismo).

Ex: NK-0043 (SEC ID NÚM: 43)



Ex: NK-0064 (SEC ID NÚM: 44)



- 5 La transfección a las células 293 se llevó a cabo de la misma forma que en el Ejemplo A4, excepto porque se usó cada uno de los ARN anteriores y se cultivaron las células durante 48 horas. La concentración de ARN al momento de la transfección se estableció en 10 nmol/l. Luego, se llevó a cabo la recolección de ARN, la síntesis de ADNc y la PCR de la misma forma que en el Ejemplo A2, excepto porque se usó un conjunto de cebadores para el gen LAMA1, los cuales se muestran más adelante, y se midió el nivel de expresión del gen LAMA1 y del gen de β -actina como estándar interno. El nivel de expresión del gen LAMA1 se corrigió en referencia al del gen de β -actina como estándar interno.

Conjunto de cebadores para el gen LAMA1

5'-AAAGCTGCCAATGCCCTCGACC-3' (SEC ID NÚM: 45)

5'-TAGGTGGGTGGCCCTCGTCTTG-3' (SEC ID NÚM: 46)

- 15 Respecto a cada uno del control 1 (-) y del control 2 (control de procedimiento), se midió el nivel de expresión de la misma forma que en el Ejemplo A2. El nivel de expresión corregido del gen LAMA1 en el control (-) se estableció como 1 y el de las células transfectadas con cada ARN se presentó como valor relativo al del control

(2) Resultados

- 20 Los resultados de los mismos se muestran en la Figura 19. La Figura 19 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen LAMA1 en las células 293. Como se puede ver en la Figura 19, se halló que NK-0043 y NK-0064 del ejemplo exhiben cada uno una potente actividad inhibidora.

(Ejemplo A11) Efecto inhibidor sobre la expresión de genes LMNA en células A549

Usando los ARNcs de la presente invención, se examinó la inhibición de la expresión de genes LMNA *in vitro* mediante efecto de interferencia por ARN.

- 25 (1) Materiales y método

Como los ARN (Ex) del presente ejemplo, se usaron NK-0063 y NK-0066 que se muestran a continuación. En las siguientes secuencias, "*" indica una base desapareada.

Ex: NK-0063 (SEC ID NÚM: 47)



- 30 Ex: NK-0066 (SEC ID NÚM: 48)



- 35 La transfección a células A549 se llevó a cabo de la misma forma que en el Ejemplo A4, excepto porque se usó cada uno de los ARN anteriores y se cultivaron las células durante 48 horas. La concentración de ARN al momento de la transfección se estableció en 3 nmol/l. Luego, se llevó a cabo la recolección de ARN, la síntesis de ADNc y la PCR de la misma forma que en el Ejemplo A2, excepto porque se usó un conjunto de cebadores para el gen LMNA que se muestran más adelante y se midió el nivel de expresión del gen LMNA y el del gen de β -actina como estándar interno. El nivel de expresión del gen LMNA se corrigió en referencia al del gen de β -actina como estándar interno.

Conjunto de cebadores para el gen LMNA

5'-CTGGACATCAAGCTGGCCCTGGAC-3' (SEC ID NÚM: 49)

5'-CACCAGCTTGCGCATGGCCACTTC-3' (SEC ID NÚM: 50)

Respecto a cada control 1 (–) y control 2 (control de procedimiento), también se midió el nivel de expresión de la misma forma que en el Ejemplo A2. El nivel de expresión corregido del gen LMNA en el control (–) se estableció como 1 y el de las células transfectadas con cada ARN se presentó como valor relativo al del control.

(2) Resultados

Los resultados de los mismos se muestran en la Figura 20. La Figura 20 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen LMNA en las células A549. Como se puede ver en la Figura 20, se halló que NK-0063 y NK-0066 del ejemplo exhiben cada uno una potente actividad inhibidora.

(Ejemplo A12) Longitudes de Xc y Yc

Respecto a los ARNcs de la presente invención, se cambiaron la longitud de la región lateral 5' (Xc) complementaria a la región lateral interna 5' (X), y la longitud de la región lateral 3' (Yc) complementaria a la región lateral 3' (Y), y se examinó la inhibición de la expresión del gen de GAPDH *in vitro*.

(1) Materiales y método

Como ARN del presente ejemplo, se usaron los ARNcs que se muestran en la Figura 21. En la Figura 21, los números sobre la derecha indican los números de identificación de secuencia. En la Figura 21, desde el lado 5', una región que se indica con letras minúsculas subrayadas es la región (Xc); una región que se indica con letras mayúsculas subrayadas es la región interna (Z); y una región que se indica con letras minúsculas subrayadas es la región (Yc). Una región entre Xc y Z es una región conectora (Lx), y una región entre Z y Yc es una región conectora (Ly). También, "Xc/Yc" indica la relación entre la longitud de bases (Xc) de la región (Xc) y la longitud de bases (Yc) de la región (Yc). En la Figura 21, "*" indica una base desapareada.

En cada uno de los ARNcs, la longitud de bases de la región interna (Z) se estableció en 26, la longitud de bases de la región conectora (Lx) se estableció en 7 y la longitud de bases de la región conectora (Ly) se estableció en 4. En NK-0036 y NK-0040, el número total de bases (Xc + Yc) en las regiones (Xc) y (Yc) se estableció en 26. En los ARNcs diferentes de NK-0036 y NK-0040, el número total de bases (Xc + Yc) en las regiones (Xc) y (Yc) se estableció en 25. Luego, bajo estas condiciones, se cambiaron las longitudes de bases de las regiones (Xc) y (Yc). Como resultado, NK-0036 y NK-0040 se convirtieron a moléculas sin bases desapareadas. Adicionalmente, cada uno de los ARNcs diferentes de NK-0036 y NK-0040 se convirtió en una molécula en la que la región interna (Z) incluye solo una base desapareada que no forma una cadena doble, y la posición de la base desapareada en la región interna (Z) se cambió desde el lateral 3' al lateral 5'.

Se llevó a cabo la transfección en las células HCT116, el cultivo, la recolección de ARN, la síntesis de ADNc y la PCR de la misma forma que en el Ejemplo A2, excepto porque se usó cada uno de los ARN anteriores, y se determinó el nivel relativo de expresión del gen de GAPDH. La concentración de ARN al momento de la transfección se estableció en 10 nmol/l.

(2) Resultados y consideración

Los resultados de los mismos se muestran en la Figura 22. La Figura 22 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen GAPDH cuando se usó cada uno de los ARN a la concentración final de 10 nmol/l. Como se puede ver en la Figura 22, se halló que todos los ARNcs con las longitudes variadas de la región lateral 5' (Xc) y la región lateral 3' (Yc) inhibieron la expresión del gen de GAPDH.

En particular, se halló que, a medida que la diferencia entre la longitud de bases de la región (Xc) y la longitud de bases de la región (Yc) se tornaba mayor, el nivel de expresión del gen disminuía en forma relativa, es decir, se incrementaba la actividad inhibidora. O sea, se halló que, mediante el establecimiento de la base desapareada en la región interna (Z) de forma de que esté más cerca del lateral 5' o del lateral 3' con respecto a la mitad de la región interna, es posible mejorar la actividad inhibidora.

En el Ejemplo A2, se halló que NK-0016 tiene una actividad inhibidora muy potente. En el presente ejemplo, se halló que las actividades inhibidoras de NK-0025 y NK-0037 fueron incluso superiores a la de NK-0016.

Respecto a la posición de la base desapareada, también se obtuvo el mismo efecto que en el presente ejemplo en los ejemplos en los que se examinaron diferentes genes, por ejemplo, el Ejemplo A8 (gen de TGF-β1), el Ejemplo A10 (gen de LAMA1) y el Ejemplo A11 (gen de LMNA).

Es decir, en el Ejemplo A8, como se muestra en las secuencias anteriores, NK-0033 y NK-0055 tienen ambos una base individual desapareada. En NK-0033, la base desapareada es la 4ª base desde el extremo 3' de la región

interna (Z). En NK-0055, la base desapareada es la 2ª base desde el extremo 3' de la región interna (Z). Luego, como se puede ver en la Figura 15 que se describió previamente, NK-0055 con la base desapareada en una posición más cercana al extremo 3' exhibió una mayor actividad inhibidora. Se obtuvo el mismo resultado cuando se compararon NK-0061 y NK-0062, en donde cada uno tiene dos bases desapareadas. También, en los Ejemplos A9 y A10, la posición de la base desapareada se cambió bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo A8. Como resultado, de forma similar, el ARNcs que tiene la base desapareada en una posición más cercana al extremo 3' exhibió una mayor actividad inhibidora.

También a partir de estos resultados, es claro que el ARNcs de la presente invención exhibe un comportamiento similar sin importar el tipo de gen diana y de secuencia inhibidora de la expresión para el gen diana. Por lo tanto, se puede decir que el ARNcs de la presente invención es una herramienta que se puede aplicar sin importar el tipo del gen diana.

(Ejemplo A13) Longitudes de X, Xc, Y e Yc

Respecto al ARNcs de la presente invención, se cambiaron las longitudes de la región lateral interna 5' (X), la región lateral 5' (Xc), la región lateral interna 3' (Y) y la región lateral 3' (Yc), y se examinó la inhibición de la expresión del gen de GAPDH *in vitro*.

(1) Materiales y método

Como ARN del presente ejemplo, se usaron los ARNcs que se muestran en la Figura 23. En la Figura 23, los números sobre la derecha indican los números de identificación de secuencia. En la Figura 23, desde el lado 5', una región que se indica con letras minúsculas subrayadas es la región (Xc); una región que se indica con letras mayúsculas subrayadas es la región interna (Z); y una región que se indica con letras minúsculas subrayadas es la región (Yc). También, "Xc+Yc/X+Y" indica la relación entre la longitud de bases total de las regiones (Xc) y (Yc) y la longitud de bases total de las regiones (X) y (Y). En la Figura 23, "*" indica una base desapareada.

En cada uno de los ARNcs, la longitud de bases de la región conectora (Lx) se estableció en 7, la longitud de bases de la región conectora (Ly) se estableció en 4, la longitud de bases de la región (Yc) se estableció en 1 y la 2ª base desde el extremo 3' de la región interna (Z) se estableció como base desapareada. Luego, se cambió la longitud de bases de la región interna (Z) y la longitud de bases de la región (Xc).

A menos que se indique de otro modo, se llevó a cabo la transfección de cada uno de los ARN en células HCT116, el cultivo, la recolección de ARN, la síntesis de ADNC y la PCR de la misma forma que en el Ejemplo A2, y se midió el nivel de expresión del gen de GAPDH. La transfección se llevó a cabo estableciendo la composición por pocillo como sigue. En la siguiente composición, (B) es Opti-MEM (nombre comercial, Invitrogen), (C) es la solución de ARN de 20 µmol/l, y se agregaron de forma que la cantidad total fuese 98,5 µl. La concentración final del ARN en el pocillo se estableció en 1 nmol/l. También se llevaron a cabo la corrección con un estándar interno y el cálculo de un valor relativo del nivel de expresión de la misma forma que en el Ejemplo A2.

[Tabla 5]

(Composición por pocillo: µl)

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

(2) Resultados y consideración

Los resultados de los mismos se muestran en la Figura 24. La Figura 24 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen de GAPDH cuando se usó cada uno de los ARN a la concentración final de 1 nmol/l. Como se puede ver en la Figura 24, se encontró que todos los ARNcs con las longitudes variadas de las regiones (X), (Xc), (Y) y (Yc) inhibieron la expresión del gen de GAPDH. En el Ejemplo A2, se halló que NK-0016 tiene una actividad inhibidora muy potente. En el presente ejemplo, se halló que las actividades inhibidoras de todos los ARNcs, excluyendo a NK-0016, fueron superiores incluso que la de NK-0016.

(Ejemplo A14) Longitud de Xc

Respecto al ARNcs de la presente invención, se cambió la longitud de la región lateral 5' (Xc) complementaria a la región lateral interna 5' (X) y se examinó la inhibición de la expresión del gen de GAPDH *in vitro*.

(1) Materiales y método

Como los ARN del presente ejemplo, se usaron los ARNcs que se muestran en la Figura 25. En la Figura 25, desde el lado 5', una región que se indica con letras minúsculas subrayadas es la región (Xc); una región que se indica con letras mayúsculas subrayadas es la región lateral interna 5' (X); y una región que se indica con letras minúsculas subrayadas es la región (Yc). También, "Xc/X" indica la relación entre la longitud de bases (Xc) de la región (Xc) y la longitud de bases (X) de la región (X). En la Figura 25, "*" indica una base desapareada. Las secuencias de los siguientes ARN se muestran en las SEC ID NÚM: 74 a 76.

En cada uno de los ARNcs, la longitud de bases de la región interna (Z) se estableció en 26; la longitud de bases de la región (X) se estableció en 25, la longitud de bases de la región (Y) se estableció en 1, la longitud de bases de la región (Yc) se estableció en 1, la longitud de bases de la región conectora (Lx) se estableció en 7 y la longitud de bases de la región conectora (Ly) se estableció en 4. Luego, bajo estas condiciones, se cambió la longitud de bases de la región (Xc). Por lo tanto, en cada uno de los ARNcs, se cambió la presencia o la ausencia de una base desapareada que no forma una cadena doble y el número de dichas bases desapareadas. NK-0001 no tiene base desapareada.

Se llevó a cabo la transfección en células HCT116, el cultivo, la recolección de ARN, la síntesis de ADNc y la PCR de la misma forma que en el Ejemplo A13, excepto porque se usó cada uno de los ARN anteriores, y se midió el nivel de expresión del gen de GAPDH. También se llevaron a cabo la corrección con un estándar interno y el cálculo del valor relativo del nivel de expresión de la misma forma que en el Ejemplo A13.

(2) Resultados y consideración

Los resultados de los mismos se muestran en la Figura 26. La Figura 26 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen de GAPDH cuando se usó cada uno de los ARN a la concentración final de 1 nmol/l. Como se puede ver en la Figura 26, se halló que todos los ARNcs con las longitudes variadas de la región lateral 5' (Xc) inhibieron la expresión del gen de GAPDH. En particular, cuando los ARNcs tienen una base(s) desapareada(s), se considera que se mejora la actividad inhibidora a medida que disminuye el número de bases desapareadas. En el Ejemplo A2, se halló que NK-0016 tiene una actividad inhibidora muy potente. En el presente ejemplo, se halló que los ARNcs que se usaron en el presente ejemplo, que son diferentes de NK-0016, exhibieron todas actividades inhibidoras superiores incluso a la de NK-0016.

Con respecto al número de bases desapareadas, se obtuvo también el mismo efecto que en el presente ejemplo en el Ejemplo A8, en el cual el gen que se examinó (gen de TGF-β1) fue diferente al del presente ejemplo. O sea, en el Ejemplo A8, como se muestra en las secuencias anteriores, NK-0033 tiene una base desapareada y NK-0061 tiene dos bases desapareadas. Luego, como se puede ver en la Figura 15 que se describió previamente, NK-0033, con un menor número de bases desapareadas, exhibió una mayor actividad inhibidora. Además, NK-0055 y NK-0062, en los que se cambiaron las posiciones de las bases desapareadas de forma de estar más cercanas al lateral 3' de la región interna (Z) en comparación con las de NK-0033 y NK-0061, exhibieron una mayor actividad inhibidora, como se describió en el Ejemplo A12. También a partir de estos resultados, es claro que el ARNcs de la presente invención exhibe un comportamiento similar sin importar el tipo de un gen diana ni el tipo de secuencia inhibidora de expresión para el gen diana. Por lo tanto, se puede decir que el ARNcs de la presente invención es una herramienta que se puede aplicar sin importar el tipo del gen diana.

(Ejemplo A15) Intercambiabilidad de conectores

Respecto al ARNcs de la presente invención, se cambiaron la región conectora (Lx) entre la región lateral interna 5' (X) y la región lateral 5' (Xc), y la región conectora (Ly) entre la región lateral interna 3' (Y) y la región lateral 3' (Yc), y se examinó la inhibición de la expresión del gen de GAPDH *in vitro*.

(1) Materiales y método

Como ARN del presente ejemplo, se usaron los ARNcs que se muestran en la Figura 27. En la Figura 27, desde el lado 5', una región que se indica con letras minúsculas subrayadas es la región lateral 5' (Xc), una región que se indica con letras mayúsculas subrayadas es la región interna (Z) y una región que se indica con letras minúsculas subrayadas es la región lateral 3' (Yc). La secuencia entre X y Xc es la región conectora (Lx), y la secuencia entre Y y Yc es la región conectora (Ly). Además, respecto a cada uno de los ARN, se muestra la relación (Lx/Ly) entre la longitud de bases (Lx) de la región conectora (Lx) y la longitud de bases (Ly) de la región conectora (Ly). En la Figura 27, "*" indica una base desapareada.

Se llevó a cabo la transfección a células HCT116, el cultivo, la recolección de ARN, la síntesis de ADNc y la PCR de la misma forma que en el Ejemplo A13, excepto porque se usó cada uno de los ARN anteriores, y se midió el nivel de expresión del gen de GAPDH. También se llevaron a cabo la corrección con un estándar interno y el cálculo del valor relativo del nivel de expresión de la misma forma que en el Ejemplo A13.

(2) Resultados y consideración

Los resultados de los mismos se muestran en la Figura 28. La Figura 28 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen de GAPDH cuando se usó cada uno de los ARN a la concentración final de 1 nmol/l. Como se puede ver en la Figura 28, todos los ARNcs con las condiciones variadas de las regiones conectoras (Lx) y (Ly), es decir, en donde sus longitudes, la relación entre sus longitudes, sus secuencias y similares son muy variadas, de forma similar inhibieron la expresión del gen de GAPDH. A partir de este resultado, se halló que las condiciones de las regiones conectoras (Lx) y (Ly) no están limitadas en forma particular y que las mismas se pueden diseñar de modo de tener diferentes longitudes, secuencias y similares.

(Ejemplo A16) Efecto inhibitorio sobre la expresión del gen de GAPDH en células HCT116

Usando el ARNcs que se había sometido a sustitución con un conector que incluye prolina o prolinol, se examinó el efecto inhibitorio sobre la expresión de GAPDH en células HCT116.

(1) Materiales y método

Como ARN (Ex) del presente ejemplo, se sintetizó el ARN (Ex ARNcs) que se muestra a continuación. A su vez, como ARN de un ejemplo comparativo, se sintetizó Nc ARNcs como ARNi de control negativo (Nc), que se muestra a continuación. En cada una de las siguientes secuencias, se proveyeron una región conectora (Lx) y una región conectora (Ly) mediante unión de amidita con prolina o prolinol, las que se muestran en la tabla siguiente (véanse los Ejemplos B) entre Xc y X, y entre Yc e Y.

Ex ARNcs (SEC ID NÚM: 13)

5' - caugagaaguaugacaacagcc - Lx - GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC - Ly - gaa - 3'
Xc Z Yc

Nc ARNcs (SEC ID NÚM: 38)

5' - ccaaucaacgaauagugaaagcc - Lx - GGCUUUCACUUAUCGUUGAUGGCUUC - Ly - gaa - 3'
Xc Z Yc

[Tabla 6]

ARNcs		Amidita usada en Lx y Ly
Ejemplo Comparativo	Ejemplo	
PK-0003	PK-0004	L-prolina-diamida-amidita (Compuesto 10 en el Esquema 3)
PK-0005	PK-0006	prolinol-uretano-amidita (Compuesto 6 en el Esquema 7)
PK-0009	PK-0010	prolina-amida-amina-amidita (Compuesto 12 en el Esquema 3)
PK-0011	PK-0012	prolina-amida-ureido-amidita (Compuesto 17 en el Esquema 3)
PK-0015	PK-0016	prolinol-ureido-amidita (Compuesto 7 en el Esquema 7)

Se llevó a cabo la transfección en células HCT116, el cultivo, la recolección de ARN, la síntesis de ADNc y la PCR de la misma forma que en el Ejemplo A13, excepto porque se usó cada uno de los ARN anteriores, y se midió el nivel de expresión del gen de GAPDH. También se llevaron a cabo la corrección con un estándar interno y el cálculo del valor relativo del nivel de expresión de la misma forma que en el Ejemplo A13.

(2) Resultados

Los resultados de los mismos se muestran en la Figura 29. La Figura 29 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen de GAPDH. Como se puede ver en la Figura 29, se halló que todos los Ex ARNcs que incluyen prolina o prolinol como región conectora (Lx) y región conectora (Ly) exhiben una potente actividad inhibidora, y los mismos exhiben una actividad inhibidora de una forma dependiente de la concentración. Por otro lado, no se observó efecto inhibidor cuando se usaron los ARNcs como control negativo.

(Ejemplo A17) Efecto inhibidor sobre la expresión del gen de GAPDH en células HCT116

Usando el ARNcs que se había sometido a sustitución con un conector con prolina, se examinó el efecto inhibidor sobre la expresión de GAPDH en células HCT116.

(1) Materiales y método

Como ARN (Ex) del presente ejemplo, se sintetizó el ARN (Ex ARNcs) que se muestra a continuación. Asimismo, como ARN de un ejemplo comparativo, se sintetizó el Nc ARNcs como ARNi de control negativo (Nc) que se muestra a continuación. En cada una de las siguientes secuencias, se proporcionaron una región conectora (Lx) y una región conectora (Ly) mediante la unión de amidita con prolina, que se muestra en la tabla siguiente (véanse los Ejemplos B) entre Xc y X, y entre Yc e Y.

Ex ARNcs (SEC ID NÚM: 13)

5' - caugagaaguaugacaacagcc - Lx - GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC - Ly - gaa - 3'
Xc Z Yc

Nc ARNcs (SEC ID NÚM: 38)

5' - ccaaucaacgauaagugaaagcc - Lx - GGCUUUCACUUAUCGUUGAUGGCUUC - Ly - gaa - 3'
Xc Z Yc

[Tabla 7]

ARNcs		Amidita usada en Lx y Ly
Comparativo Ejemplo	Ejemplo	
PK-0033	PK-0034	D-prolina-diamida-amidita (Compuesto 9 en el Esquema 3)
PK-0035	PK-0036	prolina-diamida-amidita (tipo B) (Compuesto 22 en el Esquema 4)
PK-0003	PK-0004	L-prolina-diamida-amidita (Compuesto 10 en el Esquema 3)

Se llevó a cabo la transfección en células HCT116, el cultivo, la recolección de ARN, la síntesis de ADNc y la PCR de la misma forma que en el Ejemplo A13, excepto porque se usó cada uno de los ARN anteriores, y se midió el nivel de expresión del gen de GAPDH. También se llevaron a cabo la corrección con un estándar interno y el cálculo del valor relativo del nivel de expresión de la misma forma que en el Ejemplo A13.

(2) Resultados

Los resultados de los mismos se muestran en la Figura 30. La Figura 30 es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión del gen de GAPDH en las células HCT116. Como se puede ver en la Figura 30, los Ex ARNcs que incluyen prolina como la región conectora (Lx) y la región conectora (Ly) exhiben una potente actividad inhibidora y se halló que los mismos exhiben la actividad inhibidora de una forma dependiente de la concentración. Por otro lado, no se observó efecto inhibidor cuando se usaron los ARNcs como control negativo.

(Ejemplo A18) Resistencia a ribonucleasa

Respecto al ARNcs de la presente invención, se examinó la resistencia a ribonucleasa.

(1) Materiales y método

Como los ARN (Ex) del presente ejemplo, se usaron NK-0033 del Ejemplo A5 y PK-0007 del Ejemplo A8. Además, como ARN de un ejemplo comparativo, se usó ARNcd (NI-0030) como control positivo (Pc) del Ejemplo A9.

Primero, se mezclaron 60 pmol de cada uno de los ARN anteriores, 5×10^{-5} unidades de RNasa A (Roche) y 5×10^{-5} unidades de RNasa T1 (Roche) con 20 mmol/l Tris-HCl (pH 8), y se incubó la mezcla resultante a 37°C. Diez minutos, 20 minutos y 30 minutos después del comienzo de la incubación, se terminó la reacción de las ARNasas de acuerdo a un método convencional. Luego, se sometió la solución de reacción a electroforesis usando gel de poliacrilamida al 15%. Después se tiñó el gel con SYBR Green II (Lonza, Suiza) y luego se analizó usando una E-BOX-VX2 (M & S Instruments Inc., Tokio).

(2) Resultados

Los resultados de los mismos se muestran en la Figura 31. La Figura 31 es un electroferograma que muestra resistencia a ribonucleasa. En la Figura 31, el carril "M" indica un marcador de peso molecular y "min" indica el tiempo de incubación.

Como se puede ver en la Figura 31, NI-0030 del ejemplo comparativo se degradó casi completamente después de 10 minutos de incubación. Por el contrario, NK-0033 y PK-0007 del ejemplo aún permanecen incluso después de 10 minutos de incubación. Estos resultados demuestran que el ARNcs de la presente invención es superior al ARNcd en resistencia a ribonucleasa.

(Ejemplo A19) Resistencia a nucleasa

Respecto al ARNcs de la presente invención, se examinó la resistencia a nucleasa.

(1) Materiales y método

Se usaron los mismos ARN que en el Ejemplo A18. Primero, se mezclaron 60 pmol de cada ARN y 0,5 unidades de S7 nucleasa (Roche) con 50 mmol/l Tris-HCl (pH 8) que contenía 5 mmol/l de CaCl_2 , y se incubó la mezcla resultante a 37°C. Treinta minutos después del comienzo de la incubación (0 h), se terminó la reacción de la S7 nucleasa de acuerdo a un método convencional. Luego, se sometió la solución de reacción a electroforesis usando gel de urea 7 M poliacrilamida al 15% de acuerdo a un método convencional. Posteriormente, se tiñó el gel con SYBR Green II (nombre comercial, Lonza) y luego se analizó usando una E-BOX-VX2 (nombre comercial, M & S Instruments Inc.).

(2) Resultados

Los resultados de los mismos se muestran en la Figura 32. La Figura 32 es un electroferograma que muestra la resistencia a S7 nucleasa. En la Figura 32, el carril "M" indica un marcador de peso molecular y "h" indica el tiempo de incubación.

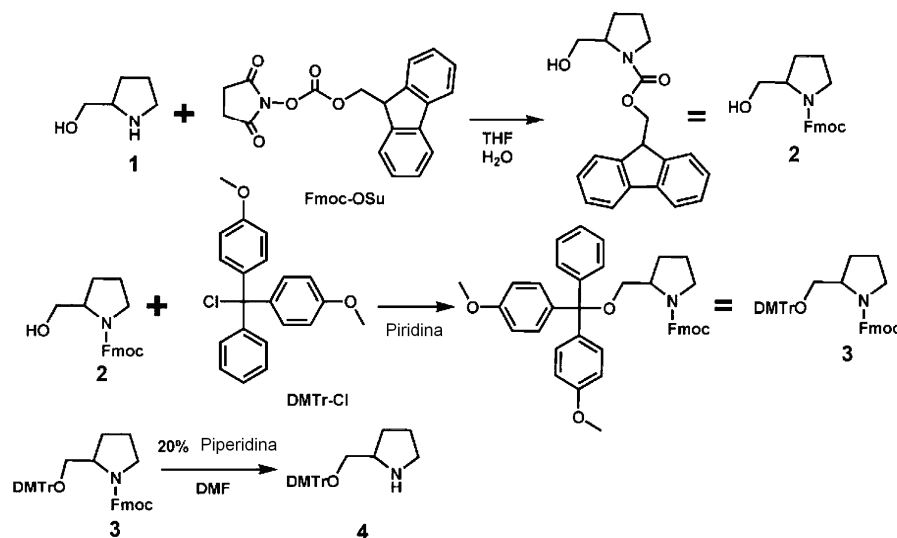
Como se puede ver en la Figura 32, NI-0030 del ejemplo comparativo se degradó casi completamente después de 0,5 hora de incubación. Por el contrario, NK-0033 y PK-0007 del ejemplo aún permanecen incluso después de 0,5 hora de incubación. Estos resultados demuestran que el ARNcs de la presente invención es superior al ARNcd en la resistencia a S7 nucleasa.

A partir de los resultados respectivos que se obtuvieron en los Ejemplos A, se halló que el ARNcs de la presente invención se puede construir sin importar el tipo de gen diana, por ejemplo. Específicamente, se halló que, en el ARNcs, es posible modificar: la longitud de una cadena doble formada por las regiones (X) y (Xc) y la longitud de una cadena doble formada por las regiones (Y) y (Yc); la presencia o ausencia de una base desapareada que no forma una cadena doble en la región interna (Z), el número y la posición de dichas bases desapareadas; la presencia o ausencia de las regiones conectoras (Lx) y (Ly), el tipo y la longitud de las regiones conectoras (Lx) y (Ly); y similares, por ejemplo. Por consiguiente, se puede decir que el ARNcs de la presente invención es una nueva herramienta versátil que se puede usar para inhibir la expresión de un gen diana sin depender del tipo de gen diana.

(Ejemplo B1)

1. Síntesis de prolinol

De acuerdo al Esquema 1 que se muestra a continuación, se sintetizó prolinol protegido con un grupo dimetoxitritilo.



Esquema 1

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

Se disolvió L-prolinol (Compuesto 1) (0,61 g, 6,0 mmol) en 70 ml de agua pura, preparando así una solución acuosa de L-prolinol. Se disolvió N-(9-fluorenilmetoxycarbonilo)succinimida (Fmoc-OSu) (2,0 g, 6,0 mmol) en 10 ml de THF. Esta solución de THF se agregó a la solución acuosa de L-prolinol y se agitó por 1 hora para someter a reacción el L-prolinol y Fmoc-OSu. La solución de la reacción se separó en una fracción líquida y una fracción de precipitado. Estas fracciones fueron sometidas, respectivamente, a extracción con acetato de etilo, y se recogieron las respectivas capas orgánicas. Las capas orgánicas así obtenidas se mezclaron, y se agregó sulfato de sodio anhidro a la mezcla para absorber la humedad (de aquí en adelante, este proceso se denomina proceso de "secado"). Las capas orgánicas se filtraron y el material filtrado obtenido se concentró al vacío. La sustancia residual obtenida se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (eluyente: hexano: acetato de etilo = 1 : 1). De este modo se obtuvo el Compuesto 2 (1,4 g, rendimiento: 74%). El resultado del análisis por NMR para este compuesto se muestra a continuación.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,77 (2H, d, $J = 7,7$ Hz, Ar-H), 7,60 (2H, d, $J = 7,3$ Hz, Ar-H), 7,40 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, Ar-H), 7,31 (2H, t, $J = 7,6$ Hz, Ar-H), 4,40-4,50 (2H, m, COOCH_2), 4,22 (1H, t, $J = 6,5$ Hz, Ar-CH), 3,20-3,80 (5H, m, H-5, H-6), 1,75 (3H, m, H-3, H-4), 1,40 (1H, m, H-3).

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

Se disolvió Fmoc-L-prolinol (Compuesto 2) (1,4 g, 4,3 mmol) en 20 ml de piridina y se azeotropeó tres veces. La sustancia residual obtenida se disolvió en 20 ml de piridina. A esta solución se agregó bajo agitación y en baño de hielo bajo argón, cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (DMTr-Cl) (1,8 g, 5,3 mmol). A la reacción en la solución de reacción le siguió TLC usando cloroformo/metanol, y se dejó que la reacción avanzara por 4 horas hasta que ya no se observaba la mancha de Fmoc-L-prolinol. Con el fin de neutralizar el exceso de DMTr-Cl, se agregaron 3 ml de metanol a la solución de la reacción y se agitó por 10 minutos. Luego se agregó cloroformo a la solución de reacción y a continuación, se recogió la capa orgánica. La capa orgánica recogida se lavó con solución salina saturada, luego con una solución acuosa al 5% de carbonato ácido de sodio y nuevamente con solución salina saturada. La capa orgánica recién lavada se secó con sulfato de sodio anhidro. Luego se filtró la capa orgánica y el material filtrado obtenido se concentró al vacío. La sustancia residual obtenida se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (eluyente: cloroformo, 1% de piridina). De este modo, se obtuvo el (2,0 g, rendimiento: 74%). El resultado del análisis por NMR para este compuesto se muestra a continuación.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,77 (2H, d, $J = 7,7$ Hz, Ar-H), 7,60 (2H, d, $J = 7,3$ Hz, Ar-H), 7,40-7,18 (13H, m, Ar-H), 6,89 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 4,20-4,40 (2H, m, COOCH_2), 4,02 (1H, t, $J = 6,5$ Hz, Ar-CH), 3,80-3,10 (5H, m, H-5, H-6), 3,73 (s, 6H, OCH_3), 1,84 (3H, m, H-3, H-4), 1,58 (1H, m, H-3).

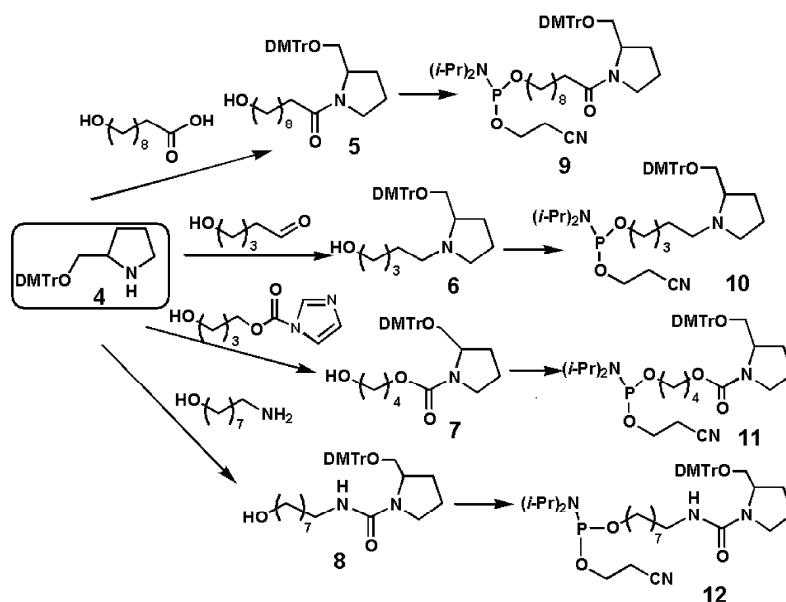
(3) DMTr-L-prolinol (Compuesto 4)

El Fmoc-DMTr-L-prolinol (Compuesto 3) (2,0 g, 3,2 mmol) se disolvió en 25 ml de una solución de DMF que contenía 20% de piperidina y se agitó por 12 horas. La solución se concentró al vacío, y la sustancia residual obtenida se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (cloroformo: metanol = 85: 15, que contenía 1% de piridina). De este modo, se obtuvo el Compuesto 4 (1,0 g, rendimiento: 78%). El resultado del análisis por NMR para este compuesto se muestra a continuación.

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

2. Síntesis de derivados amidita

- A continuación, de acuerdo al Esquema 2 que se muestra a continuación, se sintetizaron derivados de amidita que tienen prolinol. De aquí en adelante, el hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida se denomina "EDC" y la N,N-dimetilaminopiridina (4-dimetilaminopiridina) se denomina "DMAP".



Esquema 2

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

- Se disolvieron DMTr-L-prolinol (Compuesto 4) (0,80 g, 2,0 mmol), EDC (0,46 g, 2,4 mmol) y DMAP (0,29 g, 2,4 mmol) en 20 ml de diclorometano y luego se agitó. Se agregó ácido 10-hidroxidecanoico (0,45 g, 2,4 mmol) a esta solución y luego se agitó. A la reacción en la solución de reacción le siguió TLC usando acetato de etilo, y se dejó que la reacción avanzara por 20 horas hasta que ya no se observaba la mancha de DMTr-L-prolinol. Después se agregó diclorometano a la solución de la reacción y se recogió una capa orgánica. La capa orgánica recogida se lavó con solución salina saturada y luego se secó con sulfato de sodio anhidro. La capa orgánica se filtró y el material filtrado obtenido se concentró al vacío. La sustancia residual se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (acetato de etilo, que contenía 1% piridina). De este modo, se obtuvo el Compuesto 5 (0,71 g, rendimiento: 62%). El resultado del análisis por NMR para este compuesto se muestra a continuación.

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

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

- Se disolvió DMTr-L-prolinol (Compuesto 4) (0,80 g, 2,0 mmol) en 15 ml de metanol. Se agregó 5-hidroxipentanal (0,31 g, 3,0 mmol) y esto luego se agitó. Se agregó cianoborohidruro de sodio (0,25 g, 4,0 mmol) a esta solución y esto también se agitó. A la reacción en la solución de reacción le siguió TLC usando acetato de etilo/hexano, y se dejó que la reacción avanzara por 24 horas hasta que ya no se observaba la mancha de DMTr-L-prolinol. Se agregó acetato de etilo a la solución de reacción y se recogió la capa orgánica. La capa orgánica recogida se lavó con solución salina saturada y luego se secó con sulfato de sodio anhidro. La capa orgánica se filtró y el material filtrado obtenido se concentró al vacío. La sustancia residual se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (hexano: acetato de etilo = 1: 1, que contenía 1% de piridina). De este modo, se obtuvo el Compuesto 6 (0,62 g, rendimiento: 63%). El resultado del análisis por NMR para este compuesto se muestra a continuación.

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s, OCH_3), 3,70-2,86 (4H, m, CH_2OH , H-6), 2,06-1,79 (5H, m, alquilo, H-2, H-5), 1,74-1,49 (6H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,45-1,27 (4H, m, alquilo).
(3) DMTr-uretan-L-prolinol (Compuesto 7)

Se disolvió 1,4-butandiol (0,90 g, 10 mmol) en 30 ml de diclorometano. Luego se agregó carbonildiimidazol (1,4 g, 8,6 mmol) y se agitó por 3 horas. La capa orgánica de la solución de reacción se lavó con solución salina saturada y luego se secó con sulfato de sodio anhidro. La capa orgánica se filtró y el material filtrado obtenido se concentró al vacío. La sustancia residual se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (cloroformo: metanol = 9: 1). De este modo, se obtuvo un compuesto en el cual un extremo del 1,4-butandiol se activó con carbonildiimidazol (0,25 g, 1,5 mmol). Este compuesto se disolvió en 15 ml de diclorometano. Se agregó DMTr-L-prolinol (Compuesto 4) (0,6 g, 1,5 mmol) y se agitó por 24 horas. Luego se agregó acetato de etilo a esta mezcla y se recogió la capa orgánica. La capa orgánica recogida se lavó con solución salina saturada y después se secó con sulfato de sodio anhidro. La capa orgánica se filtró y el material filtrado obtenido se concentró al vacío. La sustancia residual se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (hexano: acetato de etilo = 1: 1, que contenía 1% de piridina). De este modo, se obtuvo el Compuesto 7 (0,61 g, rendimiento: 77%). El resultado del análisis por NMR para este compuesto se muestra a continuación.

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 4,24-3,94 (2H, m, COOCH_2), 3,78 (s, 6H, OCH_3), 3,72-2,96 (7H, m, alquilo, H-2, H-5, H-6), 2,10-1,30 (8H, m, alquilo, H-3, H-4).

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

Se disolvieron DMTr-L-prolinol (Compuesto 4) (0,50 g, 1,2 mmol) y trifosgeno (0,12 g, 0,40 mmol) en 8 ml de diclorometano, y la mezcla resultante se agitó en un baño de hielo bajo argón. Se agregó N,N-diisopropiletilamina (0,31 g, 2,4 mmol) a la solución y se agitó por 1 hora. Luego se agregó 8-amino-1-octanol (0,17 g, 1,2 mmol) y se agitó por 30 minutos en un baño de hielo de la misma manera que antes. Después, se continuó con la agitación a temperatura ambiente por 20 horas. Se agregó diclorometano a la solución y se recogió la capa orgánica. La capa orgánica recogida se lavó con solución salina saturada y luego se secó con sulfato de sodio anhidro. La capa orgánica se filtró y el material filtrado obtenido se concentró al vacío. La sustancia residual se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (hexano: acetato de etilo = 4 : 1, que contiene 1% de trietilamina). De este modo, se obtuvo el Compuesto 8 (0,44 g, rendimiento: 62%). El resultado del análisis por NMR para este compuesto se muestra a continuación.

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, m, Ar-H), 3,78 (s, 6H, OCH_3), 3,68-3,25 (9H, m, CH_2NH , CH_2OH , H-2, H-5, H-6), 1,74-1,18 (16H, m, alquilo, H-3, H-4).

(5) Derivados amidita con prolinol (Compuestos 9 a 12)

Los Compuestos 9 a 12 se sintetizaron de la siguiente manera, usando los prolinoles modificados (Compuestos 5 a 8), respectivamente, como materiales de partida. Cada uno de los prolinoles modificados y 5-benciltio-1H-tetrazol se disolvieron en 3 ml de acetonitrilo. La cantidad de prolinol modificado utilizada se indica a continuación: Compuesto 5: 0,69 g (1,2 mmol); Compuesto 6: 0,60 g (1,2 mmol); Compuesto 7: 0,60 g (1,2 mmol); y Compuesto 8: 0,25 g (0,43 mmol). La cantidad de 5-benciltio-1H-tetrazol usada fue: 0,15 g (0,78 mmol) para los Compuestos 5 a 7; y 54 mg (0,15 mmol) para el Compuesto 8. Bajo argón, se agregó 2-cianoetil N,N,N',N'-tetraisopropil-fosforodiamidita a la solución y se agitó por 2 horas. La cantidad utilizada de 2-cianoetil N,N,N',N'-tetraisopropil-fosforodiamidita fue: 0,54 g (1,8 mmol) en los sistemas de reacción que emplean los Compuestos 5 a 7; y 0,19 g (0,64 mmol) en un sistema de reacción que emplea el Compuesto 8. Después, se agregó una solución acuosa saturada de carbonato ácido de sodio a la solución, y la capa orgánica se extrajo con diclorometano y se recogió. La capa orgánica recogida se secó con sulfato de sodio anhidro. La capa orgánica se filtró y el material filtrado obtenido se concentró al vacío. La sustancia residual se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (hexano: acetato de etilo = 1 : 1, que contenía 1% de trietilamina). De este modo, se obtuvieron los Compuestos 9 a 12. Los resultados del análisis por NMR para estos compuestos se muestran a continuación.

DMTr-amida-L-prolinol amidita (Compuesto 9, 0,60 g, rendimiento: 55%)

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s, OCH_3), 3,68-2,93 (11H, m, CH_2O , POCH_2 , CHCH_3 , H-2, H-5, H-6), 2,58 (2H, m, CH_2CN), 2,27-1,72 (6H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,58 (4H, s, alquilo), 1,30 (22H, s, alquilo, CHCH_3).

DMTr-alquil-L-prolinol amidita (Compuesto 10, 0,71 g, rendimiento: 60%)

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s, OCH_3), 3,70-2,86 (8H, m, CH_2O , POCH_2 , CHCH_3 , H-6), 2,58 (2H, m, CH_2CN), 2,06-1,79 (5H, m, alquilo, H-2, H-5), 1,74-1,49 (6H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,37-1,10 (16H, m, alquilo, CHCH_3).

DMTr-uretan-L-prolinol amidita (Compuesto 11, 0,67 g, rendimiento: 52%)

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 4,24-3,94 (2H, m, COOCH_2), 3,78 (s, 6H,

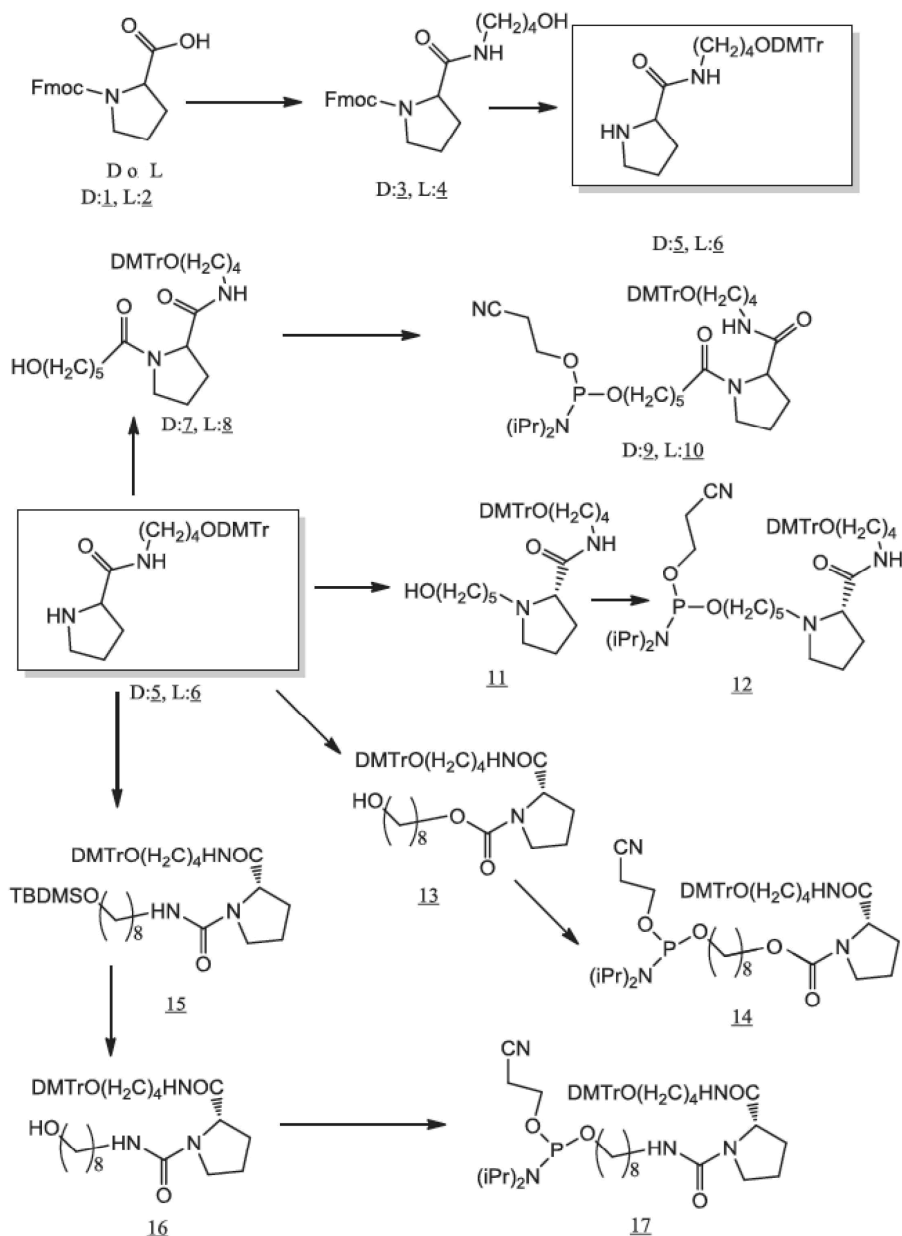
OCH₃), 3,72-2,96 (11H, m, CH₂O, POCH₂, CHCH₃, H-2, H-5, H-6), 2,58 (2H, m, CH₂CN), 2,10-1,46 (8H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,34-1,10 (12H, m, CHCH₃).

DMTr-ureido-L-prolinol amidita (Compuesto 12, 0,20 g, rendimiento: 61%)

¹H-NMR (CDCl₃): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, m, Ar-H), 3,78 (s, 6H, OCH₃), 3,65-3,25 (13H, m, CH₂O, POCH₂, CHCH₃, H-2, CH₂NH, CH₂OH, H-2, H-5, H-6), 2,73 (2H, m, CH₂CN), 2,10-1,48 (16H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,35-1,10 (12H, m, CHCH₃).

(Ejemplo B2)

Después, de acuerdo al Esquema 3 que se muestra a continuación, se sintetizaron derivados amidita con L-prolina.



Esquema 3

10 (1) DMTr-hidroxiamida amino-L-prolina (Compuesto 11)

Se agregó solución tampón de ácido acético (7 ml) a una solución de etanol (7 ml) que contenía DMTr-amida-L-prolina (Compuesto 6) (1,00 g, 2,05 mmol) y 5-hidroxipentanal (0,33 g, 3,07 mmol) bajo enfriamiento con hielo. La mezcla resultante se agitó por 20 minutos bajo enfriamiento con hielo. A continuación, se agregó cianoboro de sodio (0,77 g, 12,28 mmol) y se agitó por 7 horas a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con diclorometano, se lavó

con agua y luego se lavó además con solución salina saturada. Después, se recogió la capa orgánica y se secó con sulfato de sodio. La capa orgánica se filtró y el disolvente en el filtrado resultante se eliminó por evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía de columna sobre gel de sílice (eluyente: CH_2Cl_2 : CH_3OH = 98 : 2, que contiene 0,05% de piridina). El producto obtenido se aplicó a cromatografía de columna sobre gel de sílice (eluyente: CH_2Cl_2 : CH_3OH = 98 : 2, que contenía 0,05% de piridina) y el producto obtenido se sometió a otra cromatografía de columna sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano: acetona = 7: 3, que contiene 0,05% de piridina). De este modo, se obtuvo el Compuesto 11 en la forma de un jarabe incoloro (0,49 g, rendimiento: 41%).

Ms (FAB+): m/z 575 (M^+), 303 (DMTr^+)

(2) DMTr-amida amino-L-prolina amidita (Compuesto 12)

La DMTr-hidroxiamida amino-L-prolina (Compuesto 11) así obtenida (0,50 g, 0,87 mmol) se mezcló con acetonitrilo anhidro, y la mezcla se secó en forma azeotrópica a temperatura ambiente. A la sustancia residual obtenida se agregó diisopropilamonio-tetrazolida (178 mg, 1,04 mmol). La mezcla resultante se desgaseó a presión reducida y se burbujeó con gas de argón. Se agregó acetonitrilo anhidro (1 ml) a la mezcla y a continuación se agregó una solución de acetonitrilo anhidro (1 ml) de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropilo fosforodiamidita (313 mg, 1,04 mmol). Esta mezcla se agitó por 4 horas a temperatura ambiente en atmósfera de argón. A continuación, la mezcla se diluyó con diclorometano y se lavó con bicarbonato de sodio saturado y agua, y luego con solución salina saturada. Se recogió la capa orgánica y se secó con sulfato de sodio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente en el material filtrado obtenido se eliminó por evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía de columna usando aminosílice como carga (eluyente: hexano: acetona = 7: 3, que contenía 0,05% piridina). De este modo, se obtuvo el Compuesto 12 en la forma de un jarabe incoloro (0,57 g, pureza: 93%, rendimiento: 79%). La pureza se midió por HPLC (de aquí en adelante se usó lo mismo). El resultado del análisis por NMR para este compuesto se muestra a continuación.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,41-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,28-7,32 (m, 4H, Ar-H), 7,25-7,27 (m, 2H, Ar-H), 7,18-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,80-6,84 (m, 4H, Ar-H), 3,73-3,84 (m, 1H), 3,79 (s, 6H, OCH_3), 3,47-3,64 (m, 3H), 3,12-3,26 (m, 2H), 3,05 (t, J = 6,4 Hz, 2H, CH_2), 2,98-2,02 (m, 2H), 2,61 (t, J = 5,8 Hz, 2H, CH_2), 2,55-2,63 (m, 2H), 2,27-2,42 (m, 1H, CH), 2,31 (t, 7,8 Hz, 2H, CH_2), 2,03-2,19 (m, 1H, CH), 1,40-1,90 (m, 8H), 1,23-1,33 (m, 5H), 1,14-1,20 (m, 12H, CH_3);

P-NMR (CDCl_3): δ 146,91;

Ms (FAB+): m/z 774 (M^+), 303 (DMTr^+), 201 ($\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_2\text{OP}^+$).

(3) DMTr-hidroxiamida carbamoil-L-prolina (Compuesto 13)

A una solución de acetonitrilo anhidro (10 ml) en la cual se había disuelto la DMTr-amida-L-prolina (Compuesto 6) (1,00 g, 2,05 mmol), se agregó una solución de acetonitrilo anhidro (20 ml) en la cual se había disuelto 1-imidazo-carboniloxi-8-hidroxiocetano (1,12 g, 4,92 mmol) a temperatura ambiente, bajo atmósfera de argón. Esta mezcla se calentó a 40°C - 50°C por 2 días y luego se dejó asentarse a temperatura ambiente por 5 días. El disolvente en la mezcla se eliminó por evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía de columna sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano: acetona = 4: 1, que contenía 0,05% de piridina). De este modo, se obtuvo el Compuesto 13 en la forma de un jarabe incoloro (0,68 g, rendimiento: 50%). El resultado del análisis por NMR para este compuesto se muestra a continuación.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,40-7,42 (m, 2H, Ar-H), 7,27-7,31 (m, 6H, Ar-H), 7,17-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,79-6,82 (m, 4H, Ar-H), 4,23-4,30 (m, 1H), 4,05-4,10 (m, 2H), 3,79 (s, 6H, OCH_3), 3,60-3,65 (m, 2H), 3,32-3,55 (m, 2H), 3,16-3,29 (m, 2H), 3,01-3,07 (m, 2H), 2,38-2,40 (m, 1H, CH), 1,83-1,90 (m, 2H), 1,57-1,69 (m, 8H), 1,26-1,36 (m, 2H);

Ms (FAB+): m/z 602 (M^+), 303 (DMTr^+).

(4) DMTr-amida carbamoil-L-prolina amidita (Compuesto 14)

La DMTr-hidroxiamida carbamoil-L-prolina (Compuesto 13) (0,63 g, 1,00 mmol) así obtenida se mezcló con piridina anhidra, y la mezcla resultante se secó en forma azeotrópica a temperatura ambiente. Se agregó diisopropilamonio-tetrazolida (206 mg, 1,20 mmol) a la sustancia residual obtenida, y la mezcla resultante se desgaseó a presión reducida y se burbujeó con gas argón. Se agregó acetonitrilo anhidro (1 ml) a la mezcla y luego una solución de acetonitrilo anhidro (1 ml) de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropilo-fosforodiamidita (282 mg, 1,12 mmol). Esta mezcla se agitó por 4 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Después, la mezcla se diluyó con diclorometano y se lavó con bicarbonato de sodio saturado y agua, y luego con solución salina saturada. Se recogió la capa orgánica y se secó con sulfato de sodio. A continuación, se filtró la capa orgánica. El disolvente en el material filtrado obtenido se eliminó por evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía de columna usando aminosílice como carga (eluyente: hexano: acetona = 7: 3, que contenía 0,5% piridina). De este modo, se obtuvo el Compuesto 14 en la forma de un jarabe incoloro (0,74 g, pureza: 100%, rendimiento: 87%). El resultado del análisis por NMR para este compuesto se muestra a continuación.

P-NMR (CDCl₃): δ147,19;

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

(5) DMTr-t-butildimetilsiloxiamida ureido-L-prolina (Compuesto 15)

Se agregó una solución de tetrahydrofurano anhidro (10 ml) a trifosgeno (1,22 g, 4,10 mmol) bajo enfriamiento con hielo y bajo atmósfera de argón. Se instiló una solución de tetrahydrofurano anhidro (10 ml) en la cual se habían disuelto DMTr-amida-L-prolina (Compuesto 6) (1,00 g, 2,05 mmol) y DIEA (9,80 g, 75,8 mmol) en esta mezcla bajo enfriamiento con hielo y bajo atmósfera de argón por 30 minutos. A continuación, esto se agitó por 1 hora a temperatura ambiente. Se instiló una solución de tetrahydrofurano anhidro (20 ml) en la cual se habían disuelto 10-amino-1-t-butildimetilsiloxi decano (2,66 g, 10,25 mmol) y DIEA (3,20 g, 24,76 mmol) en la mezcla bajo enfriamiento con hielo en atmósfera de argón por 45 minutos. Después, la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Esta mezcla se diluyó con acetato de etilo (200 ml) y se recogió la capa orgánica. La capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio saturado y agua, y luego se lavó además con solución salina saturada. Después se recogió la capa orgánica y se secó con sulfato de sodio. La capa orgánica se filtró y el disolvente en el material filtrado obtenido se eliminó por evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía de columna sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano: acetona = 4: 1, que contenía 0,05% de piridina). De este modo, se obtuvo el Compuesto 15 en la forma de un jarabe incoloro (0,87 g, rendimiento: 55%).

(6) DMTr-hidroxiamidaureido-L-prolina (16)

A la DMTr-t-butildimetilsiloxiamida ureido-L-prolina (15) (0,87 g, 1,12 mmol) así obtenida, se agregó una solución de diclorometano-tetrahydrofurano anhidro (10 ml) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. A la mezcla, se agregó a razón de 1 mol/l una solución de tetrahydrofurano que contenía fluoruro de tetrabutamonio (4,69 ml, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) y esta mezcla se agitó por 3 días a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. La mezcla se diluyó con diclorometano (150 ml) y se lavó con agua y luego con solución salina saturada. Se recogió la capa orgánica y se secó con sulfato de sodio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente en el material filtrado obtenido se eliminó por evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía de columna sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano: acetona = 1: 1, que contenía 0,05% piridina). De este modo, se obtuvo el Compuesto 16 en la forma de un jarabe incoloro (0,68 g, rendimiento: 92%). El resultado del análisis por NMR para este compuesto se muestra a continuación.

¹H-NMR (CDCl₃): δ7,41-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,27-7,31 (m, 4H, Ar-H), 7,19-7,26 (m, 2H, Ar-H), 7,19-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,80-6,83 (m, 4H, Ar-H), 4,34 (t, 2H, CH₂), 3,79 (s, 6H, OCH₃), 3,63 (d, 1H, J = 6,4 Hz, CH₂), 3,61 (d, 1H, J = 6,4 Hz, CH₂), 3,34-3,37 (m, 1H, CH), 3,16-3,27 (m, 5H), 3,04 (t, J = 5,9 Hz, 2H, CH₂), 2,38-2,45 (m, 1H, CH), 1,83-2,05 (m, 3H), 1,45-1,64 (m, 8H), 1,25-1,38 (m, 7H).

(7) DMTr-amida ureido-L-prolina amidita (Compuesto 17)

La DMTr-hidroxiamida ureido-L-prolina (Compuesto 16) (0,62 g, 0,94 mmol) así obtenida se mezcló con acetonitrilo anhidro, y la mezcla resultante se secó en forma azeotrópica a temperatura ambiente. Se agregó diisopropilamonio-tetrazolida (192 mg, 1,12 mmol) a la sustancia residual obtenida, y la mezcla resultante se desgaseó a presión reducida y se burbujeó con gas de argón. Se agregó acetonitrilo anhidro (1 ml) a la mezcla y luego se agregó además una solución de acetonitrilo anhidro (1 ml) de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropilo fosforodiamidita (282 mg, 1,12 mmol). Esto se agitó por 4 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Después, la mezcla se diluyó con diclorometano y se lavó con bicarbonato de sodio saturado y agua, y luego con solución salina saturada. Se recogió la capa orgánica y se secó con sulfato de sodio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente en el material filtrado obtenido se eliminó por evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía de columna usando aminosilíce como carga (eluyente: hexano: acetona = 1: 1, que contenía 0,05% de piridina). De este modo, se obtuvo el Compuesto 17 en la forma de un jarabe incoloro (0,77 g, pureza: 88%, rendimiento: 84%). El resultado del análisis por NMR para este compuesto se muestra a continuación.

P-NMR (CDCl₃): δ147,27;

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

(Ejemplo B3) Síntesis de prolina-diamida-amidita

Con el fin de obtener una molécula de ácido nucleico de la presente invención que incluye un conector que tiene un esqueleto de prolina, se sintetizaron L-prolina-diamida-amidita y D-prolina-diamida-amidita de acuerdo al Esquema 3.

(B3-1) L-prolina-diamida-amidita

(1) Fmoc-hidroxiamida-L-prolina (Compuesto 4)

El Compuesto 2 (Fmoc-L-prolina) en el Esquema 3 se usó como material de partida. Se mezclaron el Compuesto 2

(10,00 g, 29,64 mmol), 4-amino-1-butanol (3,18 g, 35,56 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol (10,90 g, 70,72 mmol). La mezcla se desgaseó a presión reducida y se cargó con gas de argón. Se agregó acetonitrilo anhidro (140 ml) a la mezcla a temperatura ambiente y luego se agregó una solución en acetonitrilo anhidro (70 ml) de dicitlohexilcarbodiimida (7,34 g, 35,56 mmol). A continuación, la mezcla se agitó por 15 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Una vez completada la reacción, el precipitado generado se extrajo por filtración y el disolvente en el filtrado recogido se eliminó por evaporación a presión reducida. Se agregó diclorometano (200 ml) a la sustancia residual obtenida y la mezcla se lavó con bicarbonato de sodio saturado y agua (200 ml). Después, se recogió la capa orgánica y se secó con sulfato de magnesio. A continuación, la capa orgánica se filtró, y el disolvente en el material filtrado obtenido se eliminó por evaporación a presión reducida. Se agregó éter dietílico (200 ml) a la sustancia residual, con lo cual la sustancia residual se convirtió en un polvo. El polvo así obtenido se recogió por filtración. De este modo, se obtuvo el Compuesto 4 en la forma de un polvo incoloro (10,34 g, rendimiento: 84%). El resultado del análisis por NMR para este compuesto se muestra a continuación.

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

Ms (FAB+): m/z 409 (M+H⁺).

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

Se mezcló Fmoc-hidroxiamida-L-prolina (Compuesto 4) (7,80 g, 19,09 mmol) con piridina anhidra (5 ml), y la mezcla resultante se secó en forma azeotrópica dos veces a temperatura ambiente. A la sustancia residual obtenida se agregaron cloruro de 4, 4'-dimetoxitriilo (8,20 g, 24,20 mmol), DMAP (23 mg, 0,19 mmol) y piridina anhidra (39 ml). Esta mezcla se agitó por 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se agregó metanol (7,8 ml) y se agitó por 30 minutos a temperatura ambiente. Esta mezcla se diluyó con diclorometano (100 ml) y se lavó con bicarbonato de sodio saturado y agua (150 ml). A continuación, se separó la capa orgánica. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio y luego se filtró. El disolvente en el material filtrado obtenido se eliminó por evaporación a presión reducida. Se agregaron dimetilformamida anhidra (39 ml) y piperidina (18,7 ml, 189 mmol) a la sustancia residual no purificada así obtenida y se agitó por 1 hora a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción, el disolvente en la mezcla se eliminó por evaporación a presión reducida a temperatura ambiente. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía de columna sobre gel de sílice (nombre comercial: Wakogel C-300, eluyente: CH₂Cl₂ : CH₃OH = 9: 1, que contenía 0,05% de piridina). De este modo, se obtuvo el Compuesto 6 en la forma de un aceite amarillo claro (9,11 g, rendimiento: 98%). El resultado del análisis por NMR para este compuesto se muestra a continuación.

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

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

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

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

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

Ms (FAB+): m/z 602 (M⁺), 303 (DMTr⁺).

(4) DMTr-diamida-L-prolina amidita (Compuesto 10)

La DMTr-hidroxi diamida-L-prolina (Compuesto 8) (8,55 g, 14,18 mmol) así obtenida se mezcló con acetonitrilo anhidro, y la mezcla resultante se secó en forma azeotrópica tres veces a temperatura ambiente. A la sustancia residual obtenida se agregó diisopropilamonio-tetrazolida (2,91 g, 17,02 mmol). La mezcla resultante se desgaseó a presión reducida y se burbujeó con gas de argón. Se agregó acetonitrilo anhidro (10 ml) a la mezcla y luego una solución en acetonitrilo anhidro (7 ml) de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropilo fosfordiamidita (5,13 g, 17,02 mmol).

Esta mezcla se agitó por 2 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Después, la mezcla se diluyó con diclorometano y se lavó tres veces con bicarbonato de sodio saturado y agua (200 ml) y luego con solución salina saturada (200 ml). Se recogió la capa orgánica y se secó con sulfato de sodio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente en el material filtrado obtenido se eliminó por evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía de columna usando gel de aminosilíce como carga (eluyente: hexano: acetato de etilo = 1: 3, que contenía 0,05% de piridina). De este modo, se obtuvo el Compuesto 10 en la forma de un jarabe incoloro (10,25 g, pureza: 92%, rendimiento: 83%). El resultado del análisis por NMR para este compuesto se muestra a continuación.

¹H-NMR (CDCl₃): δ7,40-7,42 (m, 2H, Ar-H), 7,29-7,31 (m, 4H, Ar-H), 7,25-7,27 (m, 2H, Ar-H), 7,17-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,80-6,82 (m, 4H, Ar-H), 4,51-4,53 (m, 1H, CH), 3,75-3,93 (m, 4H), 3,79 (s, 6H, OCH₃), 3,45-3,60 (m, 4H), 3,35-3,45 (m, 1H, CH), 3,20-3,29 (m, 1H), 3,04 (t, J = 6,4 Hz, 2H, CH₂), 2,62 (t, J = 5,8 Hz, 2H, CH₂), 2,40-2,44 (m, 1H, CH), 2,31 (t, 7,8 Hz, 2H, CH₂), 2,03-2,19 (m, 1H, CH), 1,92-2,02 (m, 1H, CH), 1,70-1,83 (m, 1H, CH), 1,51-1,71 (m, 8H), 1,35-1,44 (m, 2H, CH₂), 1,18 (d, J = 6,8 Hz, 6H, CH₃), 1,16 (d, J = 6,8 Hz, 6H, CH₃);

P-NMR (CDCl₃): Msδ147,17;

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

(B3-2) D-prolina-diamida-amidita

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

El Compuesto 1 (Fmoc-D-prolina) del Esquema 3 se usó como material de partida. La mezcla de Compuesto 1 (1,5 g, 4,45 mmol), dicitclohexilcarbodiimida (1,1 g, 5,34 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol (1,5 g, 10,69 mmol) se desgaseó a presión reducida y se cargó con gas de argón. Se agregó acetonitrilo anhidro (24 ml) a la mezcla a temperatura ambiente y luego se agregó además una solución en acetonitrilo anhidro (6 ml) de 4-amino-1-butanol (0,48 g, 5,34 mmol). A continuación, la mezcla se agitó por 15 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Una vez completada la reacción, el precipitado generado se eliminó por filtración, y el disolvente en el filtrado recogido se eliminó por evaporación a presión reducida. Se agregó diclorometano a la sustancia residual obtenida y la mezcla se lavó tres veces con tampón de ácido acético (pH 4,0) y luego se lavó tres veces con bicarbonato de sodio saturado y agua. Luego se recogió la capa orgánica y se secó con sulfato de magnesio. A continuación, la capa orgánica se filtró y el disolvente en el material filtrado obtenido se eliminó por evaporación a presión reducida. Se agregó éter dietílico (50 ml) a la sustancia residual, con lo cual la sustancia residual se convirtió en un polvo. El polvo así obtenido se recogió por filtración. De este modo, se obtuvo el Compuesto 3 en la forma de un polvo blanco. El resultado del análisis por NMR para este compuesto se muestra a continuación.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ7,77 (d, J = 7,3 Hz, 2H); 7,58 (br, 2H); 7,41 (t, J = 7,3 Hz, 2H); 7,32 (t, J = 7,3 Hz, 2H); 4,25-4,43 (m, 4H); 3,25-3,61 (m, 6H); 1,57-1,92 (m, 8H).

MS (FAB+): m/z 409 (M+H⁺).

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

Se mezcló Fmoc-hidroxiamida-D-prolina (Compuesto 3) (1,0 g, 2,45 mmol) con piridina anhidra (5 ml), y la mezcla resultante se secó en forma azeotrópica dos veces a temperatura ambiente. A la sustancia residual obtenida, se agregaron cloruro de 4, 4'-dimetoxitritilo (1,05 g, 3,10 mmol), DMAP (3 mg, 0,024 mmol) y piridina anhidra (5 ml). Esta mezcla se agitó por 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se agregó metanol (1 ml) y la mezcla se agitó por 30 minutos a temperatura ambiente. Esta mezcla se diluyó con diclorometano y se lavó con bicarbonato de sodio saturado y agua. A continuación, se separó la capa orgánica. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio y luego se filtró. El disolvente en el material filtrado obtenido se eliminó por evaporación a presión reducida. Se agregaron dimetilformamida anhidra (5 ml) y piperidina (2,4 ml, 24 mmol) a la sustancia residual no purificada así obtenida y se agitó por 1 hora a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción, el disolvente en la mezcla se eliminó por evaporación a presión reducida a temperatura ambiente. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía de columna sobre gel de sílice (nombre comercial Wakogel C-300; eluyente: CH₂Cl₂: CH₃OH = 9: 1, que contenía 0,05% de piridina). De este modo, se obtuvo el Compuesto 5 en la forma de un aceite amarillo claro (1,26 g, rendimiento: 96%). El resultado del análisis por NMR para este compuesto se muestra a continuación.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ7,62 (br, 1H); 7,41-7,44 (m, 2H); 7,26-7,33 (m, 6H); 7,17-7,22 (m, 1H); 6,80-6,84 (m, 4H); 3,78 (s, 6H); 3,71 (dd, J = 8,8, 5,4 Hz, 1H); 3,22 (q, 6,5 Hz, 2H); 3,07 (t, J = 6,1 Hz, 2H); 2,97-3,03 (m, 1H); 2,85-2,91 (m, 1H); 1,85-2,15 (m, 3H); 1,55-1,73 (m, 6H).

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

(3) DMTr-hidroxi diamida-D-prolina (Compuesto 7)

Se preparó una solución de diclorometano anhidro mezclando la DMTr-amida-D-prolina (Compuesto 5) (1,2 g, 2,45 mmol) así obtenida, EDC (566 mg, 2,95 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (796 mg, 5,89 mmol) y trietilamina (1,2 ml, 8,84

mmol) en diclorometano anhidro (24 ml). Luego se agregó ácido 6-hidroxihexanoico (390 mg, 2,95 mmol) a esta solución a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón y a continuación se agitó por 1 hora a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. La mezcla se diluyó con diclorometano y se lavó tres veces con bicarbonato de sodio saturado y agua. Se recogió la capa orgánica y se secó con sulfato de sodio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente en el material filtrado obtenido se eliminó por evaporación a presión reducida. De este modo, se obtuvo el Compuesto 7 en la forma de un aceite amarillo claro (1,4 g, rendimiento: 95%). El resultado del análisis por NMR para este compuesto se muestra a continuación.

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

MS (FAB⁺): m/z 602 (M⁺), 303 (DMTr⁺).

(4) DMTr-diamida-D-prolina amidita (Compuesto 9)

La DMTr-hidroxi diamida-D-prolina (Compuesto 7) (1,2 g, 1,99 mmol) así obtenida se mezcló con acetonitrilo anhidro y la mezcla resultante se secó en forma azeotrópica tres veces a temperatura ambiente. Se agregó diisopropilamonio-tetrazolida (410 mg, 2,40 mmol) a la sustancia residual obtenida. La mezcla resultante se desgaseó a presión reducida y se cargó con gas de argón. Se agregó acetonitrilo anhidro (2,4 ml) a la mezcla y luego se agregó 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropilo fosfordiamidita (722 mg, 2,40 mmol). Esta mezcla se agitó por 2 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Después, la mezcla se diluyó con diclorometano y se lavó tres veces con bicarbonato de sodio saturado y agua, y luego se lavó con solución salina saturada. Se recogió la capa orgánica y se secó con sulfato de sodio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente en el material filtrado obtenido se eliminó por evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía de columna usando gel de aminosílice como carga (eluyente: hexano: acetato de etilo = 1: 3). De este modo, se obtuvo el Compuesto 9 en la forma de un aceite incoloro (1,4 g, pureza: 95%, rendimiento: 83%). El resultado del análisis por NMR para este compuesto se muestra a continuación.

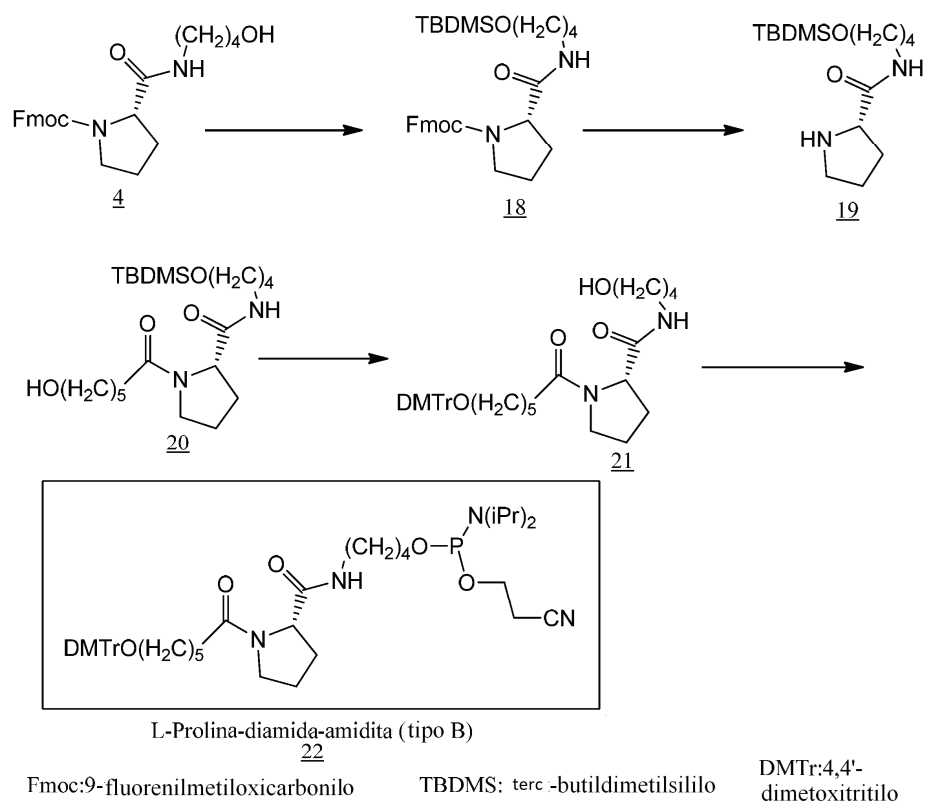
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,40-7,43 (m, 2H); 7,25-7,32 (m, 6H); 7,14-7,21 (m, 1H); 6,80-6,83 (m, 4H); 3,80-3,85 (m, 2H); 3,79 (s, 6H); 3,49-3,65 (m, 5H); 3,02-3,06 (m, 2H); 2,60-2,63 (m, 2H); 2,29-2,33 (m, 2H); 1,77-1,82 (m, 2H); 1,56-1,68 (m, 8H); 1,38-1,43 (m, 2H); 1,15-1,29 (m, 18H).

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ 146,94.

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

(Ejemplo B4)

Con el fin de obtener una molécula de ácido nucleico de la presente invención que incluye un conector con un esqueleto de prolina, se sintetizó L-prolina-diamida-amidita (tipo B) de acuerdo al Esquema 4 que se muestra a continuación.



Esquema 4

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

Se mezclaron Fmoc-hidroxi amida-L-prolina (Compuesto 4) (2,00 g, 30 mmol), cloruro de t-butil-dimetil sililo (1,11 g, 35 mmol), e imidazol (10,90 g, 71 mmol). La mezcla se desgaseó a presión reducida y se cargó con gas de argón. Se agregó acetonitrilo anhidro (20 ml) a la mezcla a temperatura ambiente y se agitó durante la noche a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Una vez finalizada la reacción, se agregó diclorometano (150 ml) a la mezcla. La mezcla resultante se lavó con agua tres veces y luego con solución salina saturada. Se recogió la capa orgánica y se secó con sulfato de magnesio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente en el material filtrado obtenido se retiró mediante evaporación a presión reducida y la sustancia residual se aplicó a cromatografía de columna sobre gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂: CH₃OH = 95: 5). De este modo, se obtuvo el Compuesto 18 en forma de jarabe incoloro (2,35 g, rendimiento: 92%). El resultado del análisis por RMN para este compuesto es el que se muestra a continuación.

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

Ms (FAB⁺): m/z 523 (M+H⁺).

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

A la Fmoc-t-butil-dimetil siloxi amida-L-prolina obtenida (Compuesto 18) (1,18 g, 2,5 mmol), se agregaron acetonitrilo anhidro (5 ml) y piperidina (2,4 ml), y se agitó por 1 hora a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción, se agregó acetonitrilo (50 ml) a la mezcla, y las sustancias insolubles se eliminaron mediante filtración. El disolvente en el material filtrado obtenido se retiró mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía de columna sobre gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂: CH₃OH = 9: 1). De este modo, se obtuvo el Compuesto 19 en forma de jarabe incoloro (0,61 g, rendimiento: 90%). El resultado del análisis por RMN para este compuesto es el que se muestra a continuación.

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

Ms (FAB+): m/z 301 (M+H⁺).

(3) t-butil-dimetilo siloxi amida hidroxí amida-L-prolina (Compuesto 20)

Se preparó una solución de diclorometano anhidro mezclando la t-butil-dimetil siloxi amida-L-prolina obtenida (Compuesto 19) (550 mg, 1,8 mmol), ácido 6-hidroxihexanoico (300 mg, 2,3 mmol), EDC (434 mg, 2,3 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol (695 mg, 4,5 mmol) en diclorometano anhidro (20 ml). Se agregó trietilamina (689 mg, 6,8 mmol) a esta solución a temperatura ambiente en una atmósfera de argón y luego se agitó durante la noche a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. La mezcla se lavó con solución saturada. Se recogió la capa orgánica y la capa orgánica recogida se secó con sulfato de sodio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente en el material filtrado obtenido se retiró mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía de columna sobre gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂: CH₃OH = 9: 1). De este modo, se obtuvo el Compuesto 20 en forma de jarabe incoloro (696 mg, rendimiento: 92%). El resultado del análisis por RMN para este compuesto es el que se muestra a continuación.

¹H-RMN (CDCl₃): δ4,54 (d, 1H, CH), 3,58-3,67 (m, 5H), 3,52-3,56 (m, 1H, CH), 3,32-3,39 (m, 1H), 3,20-3,25 (m, 2H), 2,40-2,43 (m, 1H, CH), 2,33 (t, J = 7,3 Hz, 2H, CH₂), 2,05-2,25 (m, 2H), 1,93-2,03 (m, 1H, CH), 1,75-1,85 (m, 1H, CH), 1,50-1,73 (m, 8H), 1,37-1,46 (m, 2H, CH₂), 0,87 (s, 9H, t-Bu), 0,04 (s, 6H, SiCH₃);

Ms (FAB+): m/z 415 (M⁺+1).

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

La t-butil-dimetil siloxi amida hidroxí amida-L-prolina obtenida (Compuesto 20) (640 mg, 1,54 mmol) se mezcló con piridina anhidra (1 ml) y se secó en forma azeotrópica a temperatura ambiente. A la sustancia residual obtenida se agregaron cloruro de 4, 4'-dimetoxitritilo (657 mg, 1,85 mmol), DMAP (2 mg) y piridina anhidra (5 ml) y se agitó por 4 horas a temperatura ambiente. A continuación, se agregó metanol (1 ml) y se agitó por 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con diclorometano y se lavó con bicarbonato de sodio saturado acuoso. Se recogió la capa orgánica y se secó con sulfato de sodio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente en el material filtrado obtenido se retiró mediante evaporación a presión reducida. A la sustancia residual obtenida se agregaron acetonitrilo anhidro (5 ml) y una solución de tetrahidrofurano que contenía 1 mol/l de fluoruro de tetrabutilamonio (1,42 ml, fluoruro de tetrabutilamonio 1,42 mmol) y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción, se agregó acetato de etilo (100 ml) a la mezcla. La mezcla resultante se lavó con agua y luego con solución saturada. Se recogió la capa orgánica y se secó con sulfato de sodio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente en el material filtrado obtenido se retiró mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía de columna sobre gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂: CH₃OH = 95: 5, que contenía 0,05% piridina). De este modo, se obtuvo el Compuesto 21 en forma de un jarabe incoloro (680 mg, rendimiento: 73%). El resultado del análisis por RMN para este compuesto es el que se muestra a continuación.

¹H-RMN (CDCl₃): δ7,41-7,44 (m, 2H, Ar-H), 7,26-7,33 (m, 4H, Ar-H), 7,18-7,21 (m, 2H, Ar-H), 7,17-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,80-6,84 (m, 4H, Ar-H), 4,51-4,53 (d, 6,8 Hz, 1H, CH), 3,79 (s, 6H, OCH₃), 3,61 (dd, 2H, J = 11 Hz, 5,4 Hz, CH₂), 3,50-3,54 (m, 1H, CH), 3,36-3,43 (m, 1H, CH), 3,20-3,26 (m, 2H, CH₂), 3,05 (t, J = 6,4 Hz, 2H, CH₂), 2,38-2,45 (m, 1H, CH), 2,30 (t, J = 7,8 Hz, 2H, CH₂), 2,05-2,25 (m, 1H, CH), 1,92-2,00 (m, 1H, CH), 1,75-1,83 (m, 1H, CH), 1,52-1,67 (m, 8H), 1,35-1,45 (m, 2H, CH₂);

Ms (FAB+): m/z 602 (M⁺), 303 (DMTr⁺).

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

La DMTr-hidroxí diamida-L-prolina así obtenida (tipo B) (Compuesto 21) (637 mg, 1,06 mmol) se mezcló con acetonitrilo anhidro, y la mezcla resultante se secó en forma azeotrópica a temperatura ambiente. A la sustancia residual obtenida, se agregó diisopropilamonio tetrazolida (201 mg, 1,16 mmol), y a la mezcla resultante se le quitó el aire a presión reducida y se cargó con gas de argón. Se agregó acetonitrilo anhidro (1 ml) a la mezcla y luego se añadió una solución de acetonitrilo anhidra (1 ml) de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropilfosforodiamidita (350 mg, 1,16 mmol). Esta mezcla se agitó por 4 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. La mezcla se diluyó con diclorometano y se lavó con bicarbonato de sodio saturado acuoso y solución salina saturada. Se recogió la capa orgánica y se secó con sulfato de sodio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente en el material filtrado obtenido se retiró mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a una columna cromatográfica usando gel de sílice como carga (eluyente: hexano: acetona = 7: 3). De este modo, se obtuvo el Compuesto 22 en forma de un jarabe incoloro (680 mg, pureza: 95%, rendimiento: 76%). El resultado del análisis por RMN para este compuesto es el que se muestra a continuación.

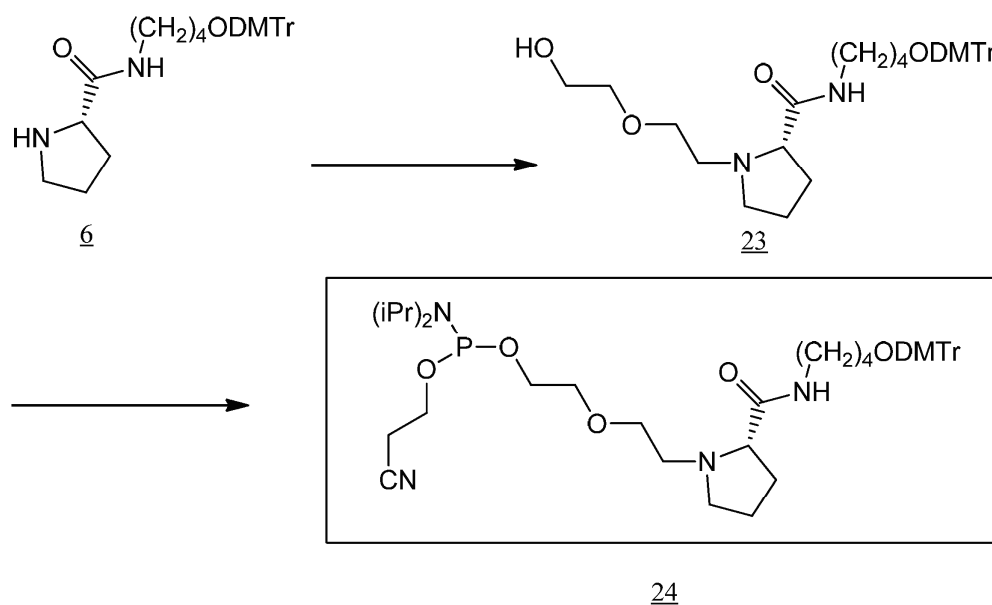
¹H-RMN (CDCl₃): δ7,41-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,25-7,32 (m, 4H, Ar-H), 7,17-7,22 (m, 2H, Ar-H), 6,80-6,83 (m, 4H, Ar-H), 4,53 (d, J = 7,8 Hz, 1H, CH), 3,75-3,93 (m, 3H), 3,79 (s, 6H, OCH₃), 3,46-3,68 (m, 5H), 3,34-3,41 (m, 1H, CH), 3,10-3,31 (m, 1H, CH), 3,05 (t, J = 6,3 Hz, 2H, CH₂), 2,62 (t, J = 6,3 Hz, 2H, CH₂), 2,39-2,46 (m, 1H, CH), 2,29 (t, 7,3 Hz, 2H, CH₂), 2,03-2,19 (m, 1H, CH), 1,90-2,00 (m, 1H, CH), 1,70-1,83 (m, 1H, CH), 1,51-1,71 (m, 8H), 1,35-1,45 (m, 2H, CH₂), 1,18 (d, J = 6,4 Hz, 6H, CH₃), 1,16 (d, J = 6,4 Hz, 6H, CH₃);

P-RMN (CH_3CN): δ 146,90;

Ms (FAB+): m/z 803 ($M^+ + 1$), 303 (DMTr^+).

(Ejemplo B5)

- 5 Con el fin de obtener una molécula de ácido nucleico de la presente invención que incluye un conector con un esqueleto de prolina, se sintetizó DMTr-amida-etilenoxietilamino-L-prolina amidita (de aquí en adelante denominada "tipo espaciador PEG") de acuerdo al Esquema 5 que se muestra a continuación.



Esquema 5

(1) DMTr-amida hidroxietoxi etilo amino-L-prolina (Compuesto 23)

- 10 Se mezclaron DMTr-amida-L-prolina (Compuesto 6) (1,00 g, 2,05 mmol), 2-(2-hidroxietoxi)etil éster de ácido 4-toluensulfónico (3,10 g, 12,30 mmol) y solución en dimetilformamida anhidra (10 ml) de carbonato de potasio (0,85 g, 6,15 mmol), y la mezcla resultante se agitó por 4 días a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El disolvente en la mezcla se retiró mediante evaporación a temperatura ambiente a presión reducida. A continuación, se agregó diclorometano (20 ml), y la mezcla resultante se filtró. El material filtrado se concentró y la sustancia residual obtenida se aplicó a una columna cromatográfica sobre gel de sílice. Como eluyentes en la cromatografía de columna sobre gel de sílice, primero se usó, acetato de etilo que contenía 0,05% de piridina y luego se usó una mezcla de CH_2Cl_2 y CH_3OH (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 9: 1) que contenía 0,05% de piridina. Como resultado, se obtuvo el Compuesto 23 en la forma de un jarabe incoloro (1,15 g, rendimiento: 97%). El resultado del análisis por RMN para este compuesto es el que se muestra a continuación.

- 20 ^1H -RMN (CDCl_3): δ 7,41-7,45 (m, 2H, Ar-H), 7,27-7,31 (m, 6H, Ar-H), 7,17-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,79-6,82 (m, 4H, Ar-H), 3,79 (s, 6H, OCH_3), 3,60-3,70 (m, 2H), 3,39-3,57 (m, 4H), 3,13-3,27 (m, 3H), 3,07-3,08 (m, 2H), 2,71-2,84 (m, 1H), 2,38-2,46 (m, 1H), 2,14-2,19 (m, 1H), 1,84-1,87 (m, 1H), 1,57-1,76 (m, 8H).

(2) DMTr-amida-etilenoxietilamino-L-prolina amidita (Compuesto 24)

- 25 La DMTr-amida hidroxietoxi etil amino-L-prolina así obtenida (Compuesto 23) (0,63 g, 1,00 mmol) se mezcló con piridina anhidra, y la mezcla resultante se secó en forma azeotrópica a temperatura ambiente. A la sustancia residual obtenida, se agregó diisopropilamonio tetrazolida (206 mg, 1,20 mmol). La mezcla resultante se desgaseó a presión reducida y se cargó con gas de argón. Se agregó acetonitrilo anhidro (1 ml) a la mezcla y también se agregó una solución en acetonitrilo anhidro (1 ml) de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropilfosforodiamidita (282 mg, 1,12 mmol). Esta mezcla se agitó por 4 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Luego la mezcla se diluyó con diclorometano y se lavó con bicarbonato de sodio saturado acuoso y solución salina saturada. Se recogió la capa orgánica y se secó con sulfato de sodio. A continuación, la capa orgánica se filtró. El disolvente en el material filtrado obtenido se retiró mediante evaporación a presión reducida. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía de columna usando gel de aminosílice como carga (eluyente: hexano: acetona = 7: 3, que contenía 0,05% piridina). De este modo, se obtuvo el Compuesto 24 en forma de jarabe incoloro (0,74 g, pureza: 100%, rendimiento: 87%). El resultado del análisis por RMN para este compuesto es el que se muestra a continuación.

- 35 ^1H -RMN (CD_3CN): δ 7,41-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,28-7,31 (m, 6H, Ar-H), 7,18-7,22 (m, 1H, Ar-H), 6,84-6,86 (m, 4H, Ar-

H), 3,73-3,84 (m, 2H, CH₂), 3,79 (s, 6H, OCH₃), 3,47-3,64 (m, 7H), 3,15-3,23 (m, 1H), 3,11 (t, J = 6,4 Hz, 2H, CH₂), 3,01 (t, J = 5,9 Hz, 2H, CH₂), 2,95-2,99 (m, 1H), 2,58-2,63 (m, 2H), 2,31-2,35 (m, 1H, CH), 2,03-2,19 (m, 1H, CH), 1,48-1,78 (m, 10H), 1,12-1,57 (m, 12H, CH₃);

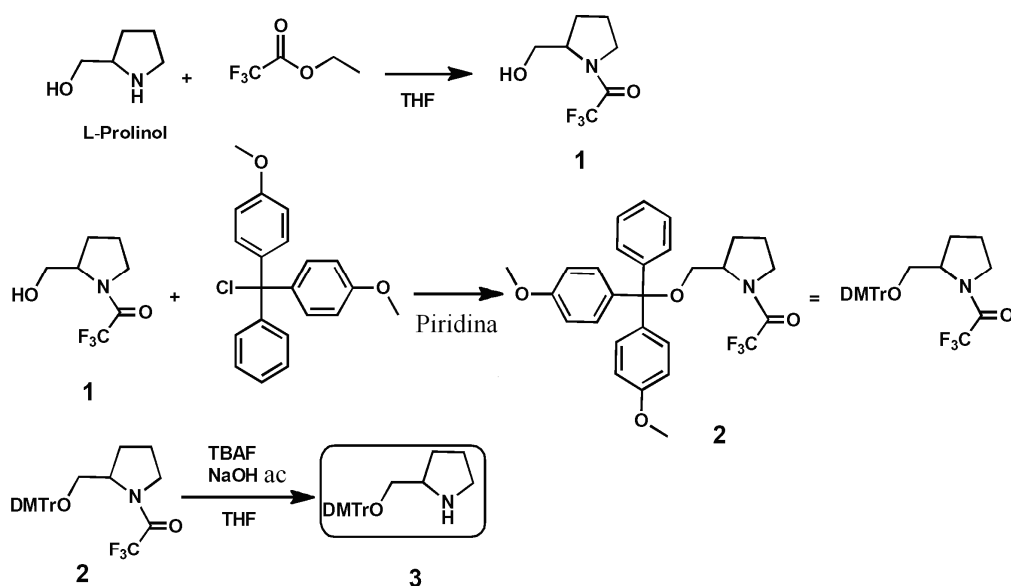
P-RMN (CD₃CN): δ148,00;

5 Ms (FAB⁺): m/z 776 (M⁺), 303 (DMTr⁺) 201 (C₈H₁₉N₂OP⁺).

(Ejemplo B6)

1. Síntesis de prolinol protegido

De acuerdo al Esquema 6 que se muestra a continuación, se sintetizó prolinol protegido con un grupo dimetoxitritilo (Compuesto 3).



Esquema 6

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

Se disolvió L-prolinol (2,0 g, 20 mmol) en 20 ml de THF. Por otra parte, se disolvió trifluoroacetato de etilo (3,0 g, 21 mmol) en 20 ml de THF. Luego, la segunda solución de THF se instiló en la primera solución de THF con contenido de L-prolinol y se agitó por 12 horas. La solución de reacción se concentró a vacío. De este modo, se obtuvo el Compuesto 1 (3,7 g, rendimiento: 97%). El resultado del análisis por RMN para este compuesto es el que se muestra a continuación.

¹H-RMN (CDCl₃): δ4,28-4,23 (1,0H, m, OH), 3,90-3,41 (5H, H-2, H-5, H-6, m), 2,27-1,77 (4H, H-3, H-4, m).

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

El trifluoroacetil-L-prolinol así obtenido (Compuesto 1) (3,7 g, 19 mmol) se disolvió en piridina, y la mezcla resultante se secó en forma azeotrópica tres veces a temperatura ambiente. La sustancia residual obtenida se disolvió en 15 ml de piridina y se agregó cloruro de 4, 4'-dimetoxitritilo (DMTr-Cl) (8,1 g, 24 mmol) a esta mezcla mientras se agitaba la mezcla en un baño de hielo bajo argón. Se dejaron reaccionar por otras 4 horas a temperatura ambiente. Luego, con el fin de neutralizar el exceso de DMTr-Cl, se agregaron otros 10 ml de metanol a la solución de la reacción y se agitó por 10 minutos. A continuación, se agregó diclorometano a la solución de reacción y la mezcla resultante se lavó con una solución saturada acuosa de carbonato ácido de sodio y solución salina saturada. Se recogió la capa orgánica y después de lavar se secó con sulfato de sodio. La capa orgánica se filtró y el material filtrado obtenido se concentró al vacío. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía de columna sobre gel de sílice (eluyente CH₂Cl₂: CH₃OH = 95: 5, con contenido de 0,1% piridina). De este modo, se purificó el Compuesto 2 (8,5 g, rendimiento: 89%). El resultado del análisis por RMN para este compuesto es el que se muestra a continuación.

¹H-RMN (CDCl₃): δ7,39-7,18 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, J = 8,6 Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s, OCH₃), 3,70-3,41 (5H, H-2, H-5, H-6, m), 2,19-1,85 (4H, H-3, H-4, m).

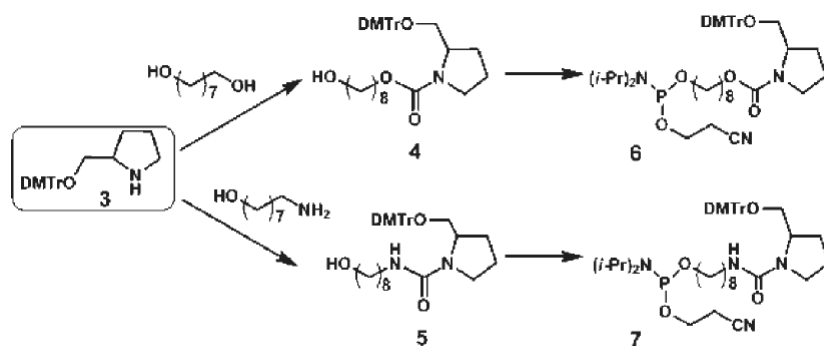
(3) DMTr-L-prolinol (Compuesto 3)

El trifluoroacetil-DMTr-L-prolinol así obtenido (Compuesto 2) (5 g, 10 mmol) se disolvió en 100 ml de THF. Se agregaron 100 ml de una solución acuosa al 5% de hidróxido de sodio a esta solución en THF y luego se agitó. Se agregaron 5 ml de solución de fluoruro de tetra-n-butilamonio 1M (TBAF) a esta solución y se agitó por 12 horas a temperatura ambiente. La solución de reacción se lavó con una solución saturada acuosa de carbonato ácido de sodio y solución salina saturada. Se recogió una capa orgánica y después de lavar se secó con sulfato de sodio. La capa orgánica se filtró y el material filtrado obtenido se concentró al vacío. De este modo, se obtuvo Compuesto 3 (3,6 g, rendimiento: 90%). El resultado del análisis por RMN para este compuesto es el que se muestra a continuación.

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

2. Síntesis de derivado de amidita

Usando el prolinol protegido (Compuesto 3) sintetizado en el punto "1" anterior, se sintetizaron derivados de amidita con prolinol unido en distintas formas de unión de acuerdo al Esquema 7 que se muestra a continuación.



Esquema 7

(1) DMTr-uretano-L-prolinol (Compuesto 4)

Se disolvió 1,8-octanodiol (9,0 g, 62 mmol) en 90 ml de THF y esta solución se colocó bajo argón. Por otra parte, se disolvió carbonildiimidazol (2,0 g, 12 mmol) en 10 ml de THF. Esta última solución en THF se agregó a la anterior solución en THF y se agitó por 1 hora a temperatura ambiente. La solución de reacción se lavó con agua hasta que no se observara una mancha del 1,8-octanodiol en la TLC. Además, se recogió una capa orgánica después de lavar con solución saturada y se secó con sulfato de sodio anhidro. La capa orgánica se filtró y el material filtrado obtenido se concentró al vacío. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía de columna sobre gel de sílice (eluyente: CH_2Cl_2 : $\text{CH}_3\text{OH} = 95:5$). De este modo, se obtuvo el compuesto del título purificado. En este compuesto, un extremo del 1,8-octanodiol se activó con carbonildiimidazol (2,3 g, rendimiento: 77%).

Se disolvieron 0,9 g del compuesto en 10 ml de acetonitrilo y esta solución se colocó bajo argón. Por otra parte, se disolvió DMTr-L-prolinol (Compuesto 3) (1,9 g, 4,8 mmol) en 20 ml de acetonitrilo. Esta última solución en acetonitrilo se agregó a la primera solución en acetonitrilo y se agitó por 24 horas a temperatura ambiente. Luego, la solución de reacción se lavó con una solución saturada acuosa de carbonato ácido de sodio y solución salina saturada. Se recogió la capa orgánica y se secó con sulfato de sodio anhidro. La capa orgánica se filtró y el material filtrado obtenido se concentró al vacío. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía de columna sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano: acetona = 9:1, con contenido de 0,1% piridina). De este modo, se obtuvo el Compuesto 4 purificado (prolinol-uretano-amidita) (1,5 g, rendimiento: 65%). El resultado del análisis por RMN para este compuesto es el que se muestra a continuación.

^1H -RMN (CDCl_3): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 4,24-3,94 (2H, m, COOCH_2), 3,78 (s, 6H, OCH_3), 3,72-2,96 (7H, m, alquilo, H-2, H-5, H-6), 2,10-1,30 (16H, m, alquilo, H-3, H-4).

FAB-MS: 576 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

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

Se disolvió bajo argón, trifosgeno (2,0 g, 6,7 mmol) en 10 ml de THF y se agitó a 0°C . Por otro lado, se disolvieron DMTr-L-prolinol (Compuesto 3) (1,3 g, 3,2 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (16 g, 124 mmol) en 10 ml de THF, y esta solución se instiló en la solución de trifosgeno en THF. La solución de reacción se agitó por 1 hora a 0°C y luego por 2 horas a temperatura ambiente. Luego, se disolvieron 8-amino-1-octanol (2,3 g, 16 mmol) y N,N-diisopropiletilamina

(5,0 g, 38 mmol) en 30 ml de THF. La solución de la reacción agitada se instiló en esta solución en THF y se agitó por 1 hora a 0°C y luego por 48 horas a temperatura ambiente. La solución de reacción se concentró al vacío y la sustancia residual obtenida se disolvió en diclorometano. Esta solución se lavó con una solución saturada acuosa de carbonato ácido de sodio y solución salina saturada. Se recogió la capa orgánica y se secó con sulfato de sodio anhidro. La capa orgánica se filtró y el material filtrado obtenido se concentró al vacío. La sustancia residual obtenida se purificó mediante cromatografía de columna en fase inversa sobre gel de sílice. En este punto, el eluyente usado fue una mezcla de disolventes de acetona y agua, con un contenido de 0,1% de piridina, y la relación de la mezcla entre la acetona y el agua se cambió gradualmente. Específicamente, la relación molar entre la acetona y el agua (acetona: agua) se cambió gradualmente para que fuera 2: 8, 3: 7, 4: 6 y 5: 5 en el orden dado. Se extrajo con diclorometano una fracción que contenía al Compuesto 5 como compuesto diana, y la capa orgánica así obtenida se secó con sulfato de sodio anhidro. La capa orgánica se filtró y el material filtrado obtenido se concentró al vacío. De este modo, se obtuvo el Compuesto 5 (prolinol-ureido-amidita) (0,9 g, rendimiento: 49%). El resultado del análisis por RMN para este compuesto es el que se muestra a continuación.

¹H-RMN (CDCl₃): δ7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, m, Ar-H), 3,78 (s, 6H, OCH₃), 3,68-3,25 (9H, m, CH₂NH, CH₂OH, H-2, H-5, H-6), 1,74-1,18 (16H, m, alquilo, H-3, H-4).

FAB-MS: 575 [M+H]⁺.

(3) Derivados amidita con prolinol (Compuestos 6 y 7)

Como prolinol modificado, el Compuesto 4 (0,80 g, 1,4 mmol) así obtenido se disolvió en acetonitrilo, y la mezcla resultante se secó en forma azeotrópica tres veces a temperatura ambiente. La sustancia residual obtenida se disolvió en 1 ml de acetonitrilo y la solución se colocó bajo argón. Se agregó diisopropilamonio tetrazolida (0,24 g, 1,4 mmol) a esta solución de acetonitrilo, proporcionando así una solución de reacción. Por otra parte, se disolvió 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosforodiamidita (0,50 g, 1,7 mmol) en 1 ml de acetonitrilo. Esto se agregó a la solución de la reacción y la mezcla resultante se agitó por 4 horas a temperatura ambiente. Se agregó diclorometano a la solución de reacción, y la mezcla resultante se lavó con una solución saturada acuosa de carbonato ácido de sodio y solución salina saturada. Se recogió una capa orgánica y después de lavarla se secó con sulfato de sodio anhidro. La capa orgánica se filtró y el material filtrado obtenido se concentró al vacío. La sustancia residual obtenida se aplicó a cromatografía de columna sobre gel de aminosílice (eluyente: hexano: acetona = 10: 1, que contenía 0,1% de piridina). De este modo, se obtuvo el Compuesto 6 (DMTr-uretano-L-prolinol amidita) purificado (0,90 g, rendimiento: 83%). El resultado del análisis por RMN para este compuesto es el que se muestra a continuación.

¹H-RMN (CDCl₃): δ7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, J = 8,6 Hz, Ar-H), 4,24-3,94 (2H, m, COOCH₂), 3,78 (s, 6H, OCH₃), 3,72-2,96 (11H, m, CH₂O, POCH₂, CHCH₃, H-2, H-5, H-6), 2,58 (2H, m, CH₂CN), 2,10-1,46 (16H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,34-1,10 (12H, m, CHCH₃). ³¹P-RMN (CD₃CN) δ 146,82.

FAB-MS: 776 [M+H]⁺.

El Compuesto 7 (DMTr-ureido -L-prolinol amidita) (0,80 g, rendimiento: 74%) purificado se obtuvo de la misma manera que el anterior, excepto que, como prolinol modificado, se usó el Compuesto 5 en lugar del Compuesto 4. El resultado del análisis por RMN para este compuesto es el que se muestra a continuación.

¹H-RMN (CDCl₃): δ7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, m, Ar-H), 3,78 (s, 6H, OCH₃), 3,65-3,25 (13H, m, CH₂O, POCH₂, CHCH₃, H-2, CH₂NH, CH₂OH, H-2, H-5, H-6), 2,73 (2H, m, CH₂CN), 2,10-1,48 (16H, m, alquilo, H-3, H-4), 1,35-1,10 (12H, m, CHCH₃).

³¹P-RMN (CD₃CN) δ 146,83.

FAB-MS: 775 [M+H]⁺.

Si bien la presente invención se describió previamente con referencia a formas de realización y ejemplos ilustrativos, la presente invención no está limitada a los mismos de ninguna forma. Se pueden realizar diversos cambios y modificaciones que pueden ser obvios para las personas con experiencia en la técnica en la configuración y especificaciones de la presente invención, sin alejarse del alcance de la presente invención.

Aplicabilidad industrial

De acuerdo a la molécula de ácido nucleico de cadena simple de la presente invención, es posible inhibir la expresión de un gen. A su vez, debido a que la molécula de ácido nucleico de cadena simple no es circular, se puede sintetizar fácilmente. También, debido a que el ARN es de cadena simple, no es necesario un paso de renaturalización como se requiere en la producción de una cadena doble, de forma que el mismo se puede producir en forma eficaz. Como se describió anteriormente, debido a que la molécula Nccs de la presente invención puede inhibir la expresión de un gen diana, la misma es útil, por ejemplo, como un fármaco, un agente para diagnóstico, un químico agrícola y una herramienta para llevar a cabo investigación sobre químicos agrícolas, ciencias médicas, ciencias biológicas y similares.

Aspectos de la invención

1. Una molécula de ácido nucleico de cadena simple, que comprende:

una secuencia inhibidora de expresión que inhibe la expresión de un gen diana, en donde

5 la molécula de ácido nucleico de cadena simple comprende, en secuencia desde un lateral 5' a un lateral 3': una región lateral 5' (Xc); una región interna (Z); y una región lateral 3' (Yc),

la región interna (Z) está compuesta por una región lateral interna 5' (X) y una región lateral interna 3' (Y) que están unidas entre sí,

la región lateral 5' (Xc) es complementaria a la región lateral interna 5' (X),

la región lateral 3' (Yc) es complementaria a la región lateral interna 3' (Y) y

10 por lo menos una de la región interna (Z), la región lateral 5' (Xc) y la región lateral 3' (Yc) comprende la secuencia inhibidora de expresión.

2. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según 1, que además comprende;

una región conectora (Lx) entre la región lateral 5' (Xc) y la región lateral interna 5' (X),

15 en donde la región lateral 5' (Xc) y la región lateral interna 5' (X) están unidas entre sí mediante la región conectora (Lx).

3. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según 1 o 2, que además comprende:

una región conectora (Ly) entre la región lateral 3' (Yc) y la región lateral interna 3' (Y),

en donde la región lateral 3' (Yc) y la región lateral interna 3' (Y) están unidas entre sí mediante la región conectora (Ly).

20 4. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según 1, que además comprende:

una región conectora (Lx) entre la región lateral 5' (Xc) y la región lateral interna 5' (X); y

una región conectora (Ly) entre la región lateral 3' (Yc) y la región lateral interna 3' (Y).

en donde la región lateral 5' (Xc) y la región lateral interna 5' (X) están unidas entre sí mediante la región conectora (Lx), y

25 la región lateral 3' (Yc) y la región lateral interna 3' (Y) están unidas entre sí mediante la región conectora (Ly).

5. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según uno cualquiera de 1 a 4, en donde el número de bases (Z) en la región interna (Z), el número de bases (X) en la región lateral interna 5' (X), el número de bases (Y) en la región lateral interna 3' (Y), el número de bases (Xc) en la región lateral 5' (Xc) y el número de bases (Yc) en la región lateral 3' (Yc) satisfacen las condiciones de las Expresiones (1) y (2):

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

30 $Z \geq Xc + Yc \quad \dots (2);$

6. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según uno cualquiera de 1 a 5, en donde el número de bases (X) en la región lateral interna 5' (X), el número de bases (Xc) en la región lateral 5' (Xc), el número de bases (Y) en la región lateral interna 3' (Y), y el número de bases (Yc) en la región lateral 3' (Yc) satisfacen cualquiera de las condiciones (a) a (d):

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

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

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

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

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

40 $Y > Yc \quad \dots (6)$

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

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

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

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

5 $X = X_c \dots (9)$

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

10 7. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según la reivindicación 6, en donde, en las condiciones (a) a (d), la diferencia entre el número de bases (X) en la región lateral interna 5' (X) y el número de bases (X_c) en la región lateral 5' (X_c), y la diferencia entre el número de bases (Y) en la región lateral interna 3' (Y) y el número de bases (Y_c) en la región lateral 3' (Y_c) satisfacen las siguientes condiciones:

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

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

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

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

15 $X - X_c = 0 \dots (13)$

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

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

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

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

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

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

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

8. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el número de bases (Z) en la región interna (Z) es 19 o más.

25 9. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según 8, en donde el número de bases (Z) en la región interna (Z) oscila entre 19 y 30.

10. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según uno cualquiera de 1 a 9, en donde el número de bases (X_c) en la región lateral 5' (X_c) oscila entre 1 y 11.

30 11. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según 10, en donde el número de bases (X_c) en la región lateral 5' (X_c) oscila entre 1 y 7.

12. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según 10, en donde el número de bases (X_c) en la región lateral 5' (X_c) oscila entre 1 y 3.

13. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según uno cualquiera de 1 a 12, en donde el número de bases (Y_c) en la región lateral 3' (Y_c) oscila entre 1 y 11.

35 14. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según 13, en donde el número de bases (Y_c) en la región lateral 3' (Y_c) oscila entre 1 y 7.

15. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según 13, en donde el número de bases (Y_c) en la región lateral 3' (Y_c) oscila entre 1 y 3.

40 16. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según uno cualquiera de 1 a 15, en donde la molécula de ácido nucleico de cadena simple comprende al menos un resto modificado.

17. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según uno cualquiera de 1 a 16, que además comprende una sustancia marcadora.

18. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según uno cualquiera de 1 a 17, que además comprende un isótopo estable.
19. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según uno cualquiera de 1 a 18, que es una molécula de ARN.
20. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según uno cualquiera de 2 a 19, en donde la región conectora (Lx) y/o la región conectora (Ly) está compuesta por al menos uno de un resto nucleotídico y un resto no nucleotídico.
21. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según 20, en donde el resto nucleotídico es un resto nucleotídico no modificado y/o un resto nucleotídico modificado.
22. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según 20 o 21, en donde la región conectora (Lx) y/o la región conectora (Ly) está compuesta por cualquiera de los restos (1) a (7):
 - (1) un resto nucleotídico no modificado
 - (2) un resto nucleotídico modificado
 - (3) un resto nucleotídico no modificado y un resto nucleotídico modificado
 - (4) un resto no nucleotídico
 - (5) un resto no nucleotídico y un resto nucleotídico no modificado
 - (6) un resto no nucleotídico y un resto nucleotídico modificado
 - (7) un resto no nucleotídico, un resto nucleotídico no modificado y un resto nucleotídico modificado.
23. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según uno cualquiera de 1 a 22, en donde el número total de bases en la molécula de ácido nucleico de cadena simple es 50 o más.
24. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según uno cualquiera de 1 a 23, en donde la expresión del gen es inhibida por interferencia por ARN.
25. La molécula de ácido nucleico de cadena simple según uno cualquiera de 1 a 24, en donde una secuencia de bases de la molécula de ácido nucleico de cadena simple es cualquiera de las SEC ID NÚM: 2, 7, 8, 13, 14, 29 a 35, 37, 43, 44, 47, 48 y 51 a 80.
26. Una composición para inhibir la expresión de un gen diana, en donde la composición comprende: la molécula de ácido nucleico de cadena simple según uno cualquiera de 1 a 25.
27. Una composición farmacéutica que comprende: la molécula de ácido nucleico de cadena simple según uno cualquiera de 1 a 25.
28. La composición farmacéutica según 27 para uso en el tratamiento de la inflamación.
29. Un método para inhibir la expresión de un gen diana, en donde el método comprende el paso de: usar la molécula de ácido nucleico de cadena simple según uno cualquiera de 1 a 25.
30. El método según 29, que comprende el paso de: administrar la molécula de ácido nucleico de cadena simple a una célula, tejido u órgano.
31. El método según 30, en donde la molécula de ácido nucleico de cadena simple se administra *in vivo* o *in vitro*.
32. El método según uno cualquiera de 29 a 31, en donde la expresión del gen se inhibe mediante interferencia por ARN.
33. Un método para inducir interferencia por ARN que inhibe la expresión de un gen diana, en donde el método comprende el paso de: usar la molécula de ácido nucleico de cadena simple según uno cualquiera de 1 a 25.
34. Un método para tratar una enfermedad, en donde el método comprende el paso de: administrar la molécula de ácido nucleico de cadena simple según uno cualquiera de 1 a 25 a un paciente,

en donde la molécula de ácido nucleico de cadena simple comprende, como la secuencia inhibidora de expresión, una secuencia que inhibe la expresión de un gen que causa la enfermedad.

35. Uso de la molécula de ácido nucleico de cadena simple según uno cualquiera de 1 a 25 para inhibir la expresión de un gen diana.

5 36. Uso de la molécula de ácido nucleico de cadena simple según uno cualquiera de 1 a 25 para inducir la interferencia por ARN.

37. Una molécula de ácido nucleico para uso en el tratamiento de una enfermedad, en donde la molécula de ácido nucleico es la molécula de ácido nucleico de cadena simple según uno cualquiera de 1 a 25, y

10 la molécula de ácido nucleico de cadena simple comprende, como la secuencia inhibidora de expresión, una secuencia que inhibe la expresión de un gen que causa la enfermedad.

Lista de secuencias

<110> BONAC CORPORATION

<120> Molécula de ácido nucleico de cadena simple para el control de la expresión de genes

<130> N116852A

15 <140>

<141> 2011-07-08

<150> JP 2010-156122

<151> 2010-07-08

<150> JP 2010-174915

20 <151> 2010-08-03

<150> JP 2010-230806

<151> 2010-10-13

<150> JP 2010-230808

<151> 2010-10-13

25 <150> JP 2010-269823

<151> 2010-12-02

<150> JP 2010-269824

<151> 2010-12-02

<160> 80

30 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 19

<212> ARN

<213> Artificial

35 <220>

<223> ARNip

<400> 1

guugucauac uucucaugg 19

<210> 2

40 <211> 62

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> molécula de ácido nucleico

45 <400> 2

caugagaagu augacaacag cccacacccg gcuguuguca uacuucucan gguucucgg 60

aa

62

<210> 3
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> sense
 <400> 3
 ccaugagaag uaugacaaca g 21
 10 <210> 4
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> antisentido
 15 <400> 4
 guugucauac uucuauggu u 21
 <210> 5
 <211> 19
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> ARNip
 <400> 5
 auuguaacga gacaaacac 19
 25 <210> 6
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> ARNip
 <400> 6
 uugcgcuuuu uggugacgc 19
 <210> 7
 <211> 62
 35 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico
 <400> 7
 agccccacac cggcuguugu cauacuucuc augguucuuc ggaaccauga gaaguaugac 60
 40 aa 62
 <210> 8
 <211> 58
 <212> ARN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico
 <400> 8
 accaugagaa guaagacaac agccuucggg cuguugucan acuucucaug guucaugg 58
 50 <210> 9
 <211> 23

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 5 <400> 9
 ggagaaggct ggggctcatt tgc 23

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

 <220>
 <223> cebador

 <400> 10
 tggccagggg tgctaagcag ttg 23

 15 <210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> cebador

 <400> 11
 gccacggctg ctccagctc ctc 23

 <210> 12
 <211> 25
 25 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 12
 30 aggtctttgc ggatgtccac gtcac 25

 <210> 13
 <211> 51
 <212> ARN
 <213> Artificial

 35 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

 <400> 13
 caugagaagu augacaacag ccggcuguug ucauacuucu caugguucga a 51

 <210> 14
 40 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

 45 <400> 14
 augacaacag ccccaacaccg gcuguuguca uacuucucau gguucuucgg aaccaugaga 60

 ag 62

 <210> 15
 <211> 62
 <212> ARN

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 15	
	ugucagugcu cauuuacaag cccacacccg gcuuguaau gagcacugac acuucuucgg	60
5	aa	62
	<210> 16	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
10	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 16	
	aaagucaaug uacagcugcu u	21
15	<210> 17	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
20	<400> 17	
	ccattgctgt cccgtgcaga gctg	24
	<210> 18	
	<211> 25	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 18	
	atggtagccc ttgggctcgt ggatc	25
30	<210> 19	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> cebador	
	<400> 19	
	gtcgtaccac aggcattgtg atgg	24
	<210> 20	
	<211> 22	
40	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 20	
45	gcaatgcctg ggtacatggt gg	22
	<210> 21	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	

<220>
 <223> cebador

 <400> 21
 cccttattga cctcaactac atggt 25

 5 <210> 22
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 10 <223> cebador

 <400> 22
 gaggggccat ccacagtctt ctg 23

 <210> 23
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 23
 20 actccacgtg gaaatcaacg g 21

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

 25 <220>
 <223> cebador

 <400> 24
 tagtagacga tgggcagtgg 20

 <210> 25
 30 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 35 <400> 25
 atggctagrc tctgtgcttc ct 22

 <210> 26
 <211> 24
 <212> ADN
 40 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 26
 agggctctcc agayttctgc tctg 24

 45 <210> 27
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 50 <223> cebador

	<400> 27 catcaactat aagcagctcc a	21	
5	<210> 28 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador		
10	<400> 28 ttcaagtga gagcagttca g	21	
	<210> 29 <211> 61 <212> ARN <213> Artificial		
15	<220> <223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 29 agcuguacau ugacuuuagc cccacaccgg cuaaagucua uguacagcug cuucuucgga	60	
	a	61	
20	<210> 30 <211> 62 <212> ARN <213> Artificial <220> <223> molécula de ácido nucleico		
25	<400> 30 agcagcugua cauugacuuu agccccacac cggcuaaagu caauguacag cugcuucuuu	60	
	gg	62	
30	<210> 31 <211> 61 <212> ARN <213> Artificial <220> <223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 31 gcagcuguac auugacuuua gccccacacc ggcuaaaguc aauguacagc ugcuuucuu	60	
	g	61	
35	<210> 32 <211> 51 <212> ARN <213> Artificial <220> <223> molécula de ácido nucleico		
40	<400> 32 cagcuguaca uugacuuuag ccggcuaaag ucaauguaca gcugcuucga a	51	
45	<210> 33 <211> 50 <212> ARN <213> Artificial <220>		

	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 33	
	agcuguacau ugacuuuagc cggcuaaagu caauguacag cugcuucgaa	50
5	<210> 34	
	<211> 51	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
10	<400> 34	
	agcagcugua cauugacuuu agccggcuaa agucaaagua cagcugcuuc g	51
	<210> 35	
	<211> 50	
	<212> ARN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 35	
	gcagcuguac auugacuuua gccggcuaaa gucaauguac agcugcuucg	50
20	<210> 36	
	<211> 51	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 36	
	ugucagugcu cauuuacaag ccggcuugua aaugagcacu gacacuucga a	51
	<210> 37	
	<211> 63	
30	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 37	
	accaugagaa guaugacaac agccuucaag agaggcuguu gucauacuuc ucaugguuca	60
35	ugg	63
	<210> 38	
	<211> 51	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 38	
	ccaauaacga uaagugaaag ccggcuuua cuuauuguug auggcuucga a	51
	<210> 39	
45	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sense	

	<400> 39 gcagcuguac auugacuuua g	21	
5	<210> 40 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial		
	<220> <223> antisentido		
10	<400> 40 aaagucaaug uacagcugcu u	21	
	<210> 41 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial		
15	<220> <223> sense		
	<400> 41 gugucagugc ucauuuacaa g	21	
20	<210> 42 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial		
	<220> <223> antisentido		
25	<400> 42 uguaaaugag cacugacacu u	21	
	<210> 43 <211> 62 <212> ARN <213> Artificial		
30	<220> <223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 43 uguuuugucuc guuacaauau cccacacccg gauauuguaa cgagacaaac acuccuucgg	60	
	ga	62	
35	<210> 44 <211> 62 <212> ARN <213> Artificial		
	<220> <223> molécula de ácido nucleico		
40	<400> 44 aguguuuuguc ucguuacaau auccccacac cggauauugu aacgagacaa acacuccuuc	60	
	gg	62	
45	<210> 45 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial		
	<220> <223> cebador		

<400> 45
 aaagctgccca atgccctcg acc 23

 <210> 46
 <211> 22
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 46
 10 taggtgggtg gccctgtct tg 22

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

 15 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

 <400> 47
 cgucaccaaa aagcgcaauu cccacacccg gaauugcgcu uuuuggugac gcuucuucgg 60

 aa 62

 <210> 48
 20 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

 25 <400> 48
 agcgucacca aaaagcgcaa uccccacac cggaauugcg cuuuuuggug acgcuucuuc 60

 gg 62

 <210> 49
 30 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 35 <400> 49
 ctggacatca agctggccct ggac 24

 <210> 50
 <211> 24
 <212> ADN
 40 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 50
 caccagcttg cgcatggcca cttc 24

 45 <210> 51
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 50 <223> molécula de ácido nucleico

	<400> 51	
	aaccaugaga agaugacaa cagccccaca cggcuguug ucauacuucu caugguucuu	60
	cg	62
	<210> 52	
	<211> 62	
5	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 52	
	accaugagaa guaugacaac agccccacac cggcuguugu cauacuucuc augguucuc	60
10	gg	62
	<210> 53	
	<211> 62	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 53	
	ccaugagaag uaugacaaca gccccacacc ggcuguuguc auacuucua ugguucucg	60
	ga	62
	<210> 54	
20	<211> 62	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
25	<400> 54	
	augagaagua ugacaacagc cccacaccgg cuguugucau acuucucaug guucucgga	60
	ac	62
	<210> 55	
	<211> 62	
	<212> ARN	
30	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 55	
	ugagaaguau gacaacagcc ccacaccggc uguugucaua cuucucaugg uucucggaa	60
	cc	62
35	<210> 56	
	<211> 62	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 56	
	agaaguauga caacagcccc acaccggcug uugucauacu ucucaugguu cuucggaacc	60
	au	62
	<210> 57	

	<211> 62		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
5	<223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 57		
	aaguaugaca acagccccac accggcuguu gucauacuuc ucaugguucu ucggaacc	60	
	au		
	ga		62
	<210> 58		
	<211> 62		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 58		
	guaugacaac agccccacac cggcuguugu cauacuucuc augguucuuc ggaaccauga	60	
	au		
15	ga		62
	<210> 59		
	<211> 62		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
20	<220>		
	<223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 59		
	acaacagccc cacaccggcu guugucauac uucucauggu ucuucggaac caugagaagu	60	
	au		
	au		62
	<210> 60		
25	<211> 62		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> molécula de ácido nucleico		
30	<400> 60		
	aacagcccca caccggcugu ugucauacuu cucaugguuc uucggaacca ugagaaguau	60	
	ga		
	ga		62
	<210> 61		
	<211> 62		
	<212> ARN		
35	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> molécula de ácido nucleico		
	<400> 61		
	cagccccaca ccggcuguug ucauacuucu caugguucu cgggaaccaug agaaguauga	60	
	ca		
	ca		62
40	<210> 62		
	<211> 62		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		

	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 62	
	gccccacacc ggcuguuguc auacuucuca uggucuucg gaaccaugag aaguaugaca	60
	ac	62
5	<210> 63	
	<211> 62	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
10	<400> 63	
	ccccacaccg gcuguuguca uacuucucau gguucuucgg aaccaugaga aguaugacaa	60
	ca	62
	<210> 64	
	<211> 62	
	<212> ARN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 64	
	cccacaccgg cuguugucau acuucucaug guucuucgga accaugagaa guaugacaac	60
	ag	62
20	<210> 65	
	<211> 62	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 65	
	ccacaccggc uguugucaua cuucucaugg uucuucggaa ccaugagaag uaugacaaca	60
	gc	62
	<210> 66	
	<211> 64	
30	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 66	
	aaccaugaga aguaugacaa cagccccaca ccggcuguug ucauacuucu caugguucgu	60
35	ucgc	64
	<210> 67	
	<211> 60	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 67	
	accaugagaa guaugacaac agccccacacc gcuguuguca uacuucucau gguucuucgg	60

<210> 68
 <211> 58
 <212> ARN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 68
 ccaugagaag uaugacaaca gccacaccg cuguugucan acucucan guuuucga 58

10 <210> 69
 <211> 58
 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> molécula de ácido nucleico

15 <400> 69
 accaugagaa guaugacaac agccacacc uguugucan cuucucan guuuucg 58

20 <210> 70
 <211> 56
 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 70
 ccaugagaag uaugacaaca gccacaccu guugucan acucucan guuuucga 56

25 <210> 71
 <211> 54
 <212> ARN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 71
 caugagaagu augacaacag ccacaccug uugucan acucucan guuuucga 54

35 <210> 72
 <211> 54
 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> molécula de ácido nucleico

40 <400> 72
 ccaugagaag uaugacaaca ccacaccug uugucan acucucan guuuucga 54

<210> 73
 <211> 52
 <212> ARN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> molécula de ácido nucleico

<400> 73
 caugagaagu augacaacac cacaccug uugucan acucucan guuuucga 52

50 <210> 74
 <211> 63
 <212> ARN

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 74	
	aaccaugaga aguaugacaa cagccccaca ccggcuguug ucauacuucu caugguucuu	60
5	cgg	63
	<210> 75	
	<211> 61	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
10	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 75	
	ccaugagaag uaugacaaca gcccacacc ggcuguuguc auacuucua ugguucucg	60
	g	61
	<210> 76	
15	<211> 60	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
20	<400> 76	
	caugagaagu augacaacag cccacaccg gcuguuguca uacuucucu gguucucgg	60
	<210> 77	
	<211> 62	
	<212> ARN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 77	
	accaugagaa guaugacaac agccuucggg cuguugucau acuucucaug guuccacac	60
	cg	62
30	<210> 78	
	<211> 65	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 78	
	ggaaccauga gaaguaugac aacagccaag ucuuggcugu ugucauacuu cucaugguuc	60
	cucug	65
	<210> 79	
	<211> 63	
40	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 79	

	ggaaccauga gaaguaugac aacagccaag cuuggcuguu gucauacuuc ucaugguucc	60
	ucg	63
	<210> 80	
	<211> 62	
	<212> ARN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> molécula de ácido nucleico	
	<400> 80	
	cagcuguaca uugacuuuag cccacacccg gcuaaaguca auguacagcu gcuucucgg	60
	aa	62
10		

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ARN de cadena simple, que comprende:

solamente una secuencia inhibidora de expresión que inhibe la expresión de un gen diana, en donde el extremo 5' y el extremo 3' no están unidos entre sí,

5 la molécula de ARN de cadena simple comprende, en secuencia desde un lateral 5' a un lateral 3': una región lateral 5' (Xc); una región interna (Z), que comprende la secuencia inhibidora de expresión; y una región lateral 3' (Yc),

la región interna (Z) está compuesta por una región lateral interna 5' (X) y una región lateral interna 3' (Y) que están unidas entre sí,

10 la región lateral 5' (Xc) es complementaria a la región lateral interna 5' (X) y una doble cadena está formada por un repliegue de la región (Xc) hacia la región (X) y auto-renaturalización de las regiones (Xc) y (X),

la región lateral 3' (Yc) es complementaria a la región lateral interna 3' (Y) y una doble cadena está formada por un repliegue de la región (Yc) hacia la región (Y) y auto-renaturalización de las regiones (Yc) y (Y),

una región conectora (Lx) está presente entre la región lateral 5' (Xc) y la región lateral interna 5' (X),

15 la región lateral 5' (Xc) y la región lateral interna 5' (X) están unidas entre sí mediante la región conectora (Lx),

la región conectora (Lx) comprende un resto no nucleotídico,

una región conectora (Ly) está presente entre la región lateral 3' (Yc) y la región lateral interna 3' (Y),

la región lateral 3' (Yc) y la región lateral interna 3' (Y) están unidas entre sí mediante la región conectora (Ly), y

20 el número de bases (Z) en la región interna (Z), el número de bases (X) en la región lateral interna 5' (X), el número de bases (Y) en la región lateral interna 3' (Y), el número de bases (Xc) en la región lateral 5' (Xc) y el número de bases (Yc) en la región lateral 3' (Yc) satisfacen las condiciones (a) a (d):

(a) Se satisfacen las condiciones de las expresiones (1) y (2):

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

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

(b) $Z = 19$ a 30 ;

25 (c) $Xc = 1$ a 7 o $Yc = 1$ a 9 ; y

(d) $Z - (Xc + Yc) = 0$ o 1 a 10 .

2. La molécula de ARN de cadena simple según la reivindicación 1, en donde el número de bases (X) en la región lateral interna 5' (X), el número de bases (Xc) en la región lateral 5' (Xc), el número de bases (Y) en la región lateral interna 3' (Y), y el número de bases (Yc) en la región lateral 3' (Yc) satisfacen cualquiera de las condiciones (a) a (d):

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

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

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

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

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

35 $Y > Yc \quad \dots (6)$

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

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

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

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

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

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

5 3. La molécula de ARN de cadena simple según la reivindicación 2, en donde, en las condiciones (a) a (d), la diferencia entre el número de bases (X) en la región lateral interna 5' (X) y el número de bases (X_c) en la región lateral 5' (X_c), y la diferencia entre el número de bases (Y) en la región lateral interna 3' (Y) y el número de bases (Y_c) en la región lateral 3' (Y_c) satisfacen las siguientes condiciones:

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

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

10 $Y - Y_c = 0 \quad \dots (12)$

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

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

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

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

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

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

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

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

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

20 4. La molécula de ARN de cadena simple según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde:

(a) el número de bases (X_c) en la región lateral 5' (X_c) oscila entre 1 y 3; y/o

(c) el número de bases (Y_c) en la región lateral 3' (Y_c) oscila entre 1 y 7.

5. La molécula de ARN de cadena simple según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el número de bases (Y_c) en la región lateral 3' (Y_c) oscila entre 1 y 3.

25 6. La molécula de ARN de cadena simple según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la molécula de ácido nucleico de cadena simple:

(a) comprende por lo menos un resto modificado;

(b) comprende además una sustancia marcadora; y/o

(c) comprende además un isótopo estable.

30 7. La molécula de ARN de cadena simple según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la región conectora (L_x) está compuesta por un resto no nucleotídico o está compuesta por un resto nucleotídico y un resto no nucleotídico y/o la región conectora (L_y) está compuesta por al menos uno de un resto nucleotídico y un resto no nucleotídico, preferiblemente en donde el resto nucleotídico es un resto nucleotídico no modificado y/o un resto nucleotídico modificado.

35 8. La molécula de ARN de cadena simple según la reivindicación 7, en donde la región conectora (L_x) está compuesta por cualquiera de los restos (4) a (7) y/o la región conectora (L_y) está compuesta por cualquiera de los restos (1) a (7):

(1) un resto nucleotídico no modificado

(2) un resto nucleotídico modificado

40 (3) un resto nucleotídico no modificado y un resto nucleotídico modificado

(4) un resto no nucleotídico

(5) un resto no nucleotídico y un resto nucleotídico no modificado

(6) un resto no nucleotídico y un resto nucleotídico modificado

(7) un resto no nucleotídico, un resto nucleotídico no modificado y un resto nucleotídico modificado.

9. La molécula de ARN de cadena simple según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde

5 (a) el número total de bases en la molécula de ARN de cadena simple es 50 o más;

(b) la expresión del gen es inhibida mediante interferencia por ARN, y/o

(c) una secuencia de bases de la molécula de ARN de cadena simple es una cualquiera de las SEC. ID. NÚM: 13 y 32 a 35.

10. Una composición para inhibir la expresión de un gen diana, en donde la composición comprende:

10 la molécula de ARN de cadena simple según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Una composición farmacéutica que comprende:

la molécula de ARN de cadena simple según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

12. La composición farmacéutica según la reivindicación 11, para uso en el tratamiento de la inflamación.

13. Un método *in vitro* para inhibir la expresión de un gen diana, en donde el método comprende el paso de:

15 usar la molécula de ARN de cadena simple según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y

administrar la molécula de ARN de cadena simple a una célula, un tejido o un órgano, preferiblemente en donde la expresión del gen es inhibida mediante la interferencia por ARN.

14. Un método *in vitro* para inducir la interferencia por ARN que inhibe la expresión de un gen diana, en donde el método comprende el paso de:

20 usar la molécula de ARN de cadena simple según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

15. Una molécula de ácido nucleico para uso en el tratamiento de una enfermedad, en donde la molécula de ácido nucleico es la molécula de ARN de cadena simple según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y

la molécula de ARN de cadena simple comprende, como la secuencia inhibidora de expresión, una secuencia que inhibe la expresión de un gen que provoca la enfermedad.

25

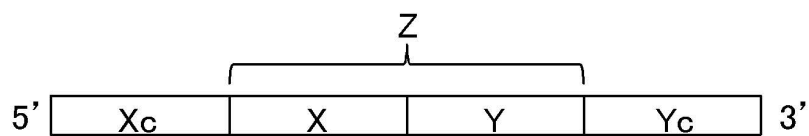


FIG. 1A

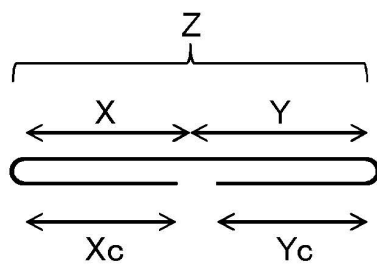


FIG. 1B

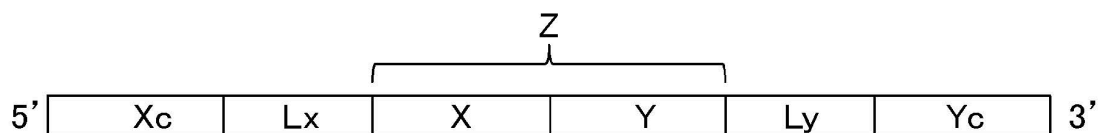


FIG. 2A

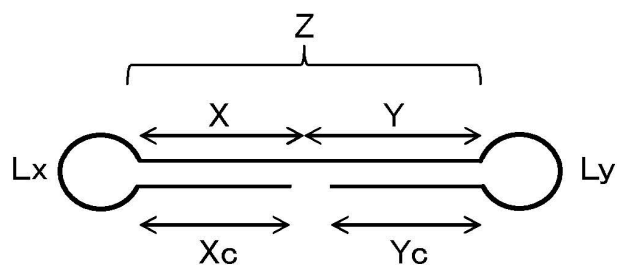


FIG. 2B

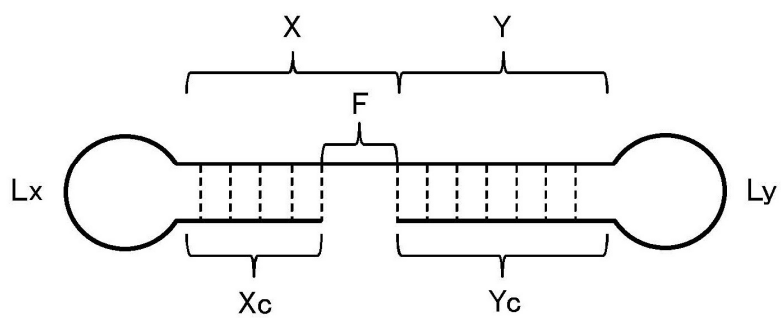


FIG. 3A

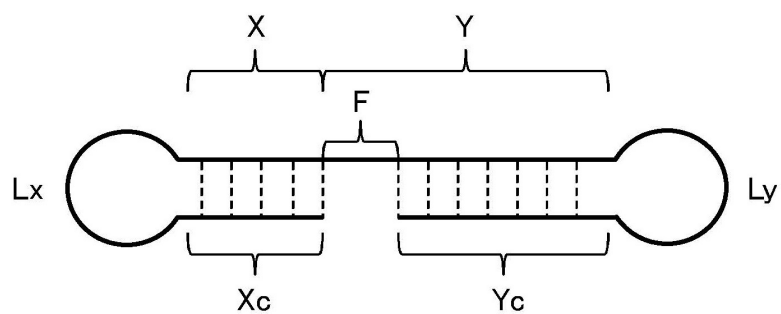


FIG. 3B

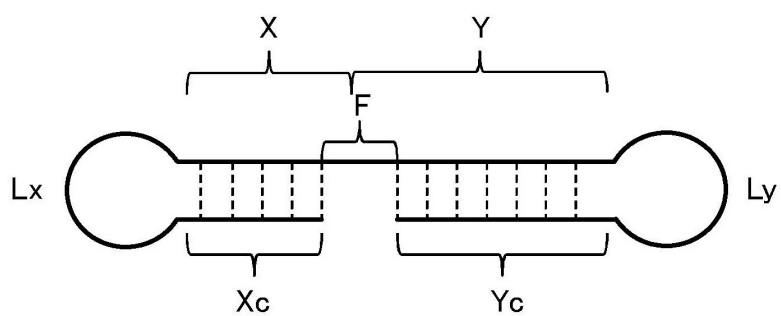


FIG. 3C

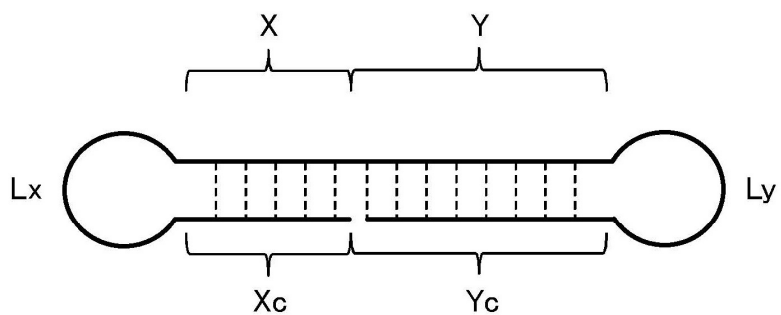


FIG. 3D

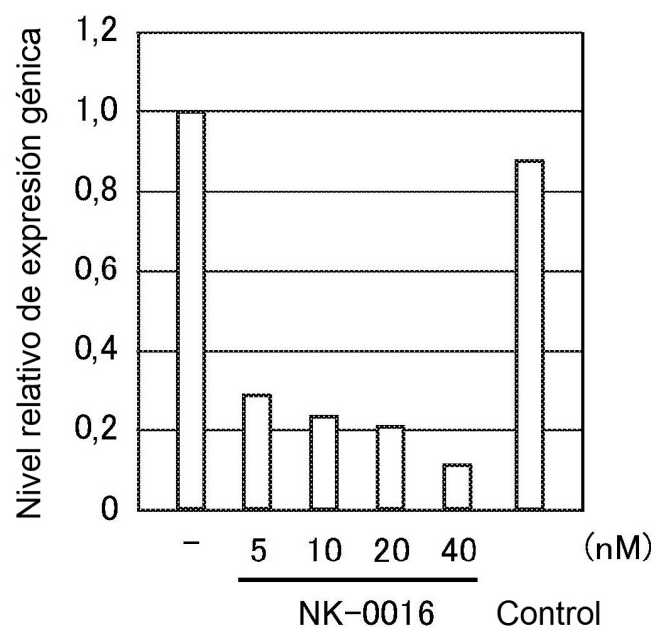


FIG. 4

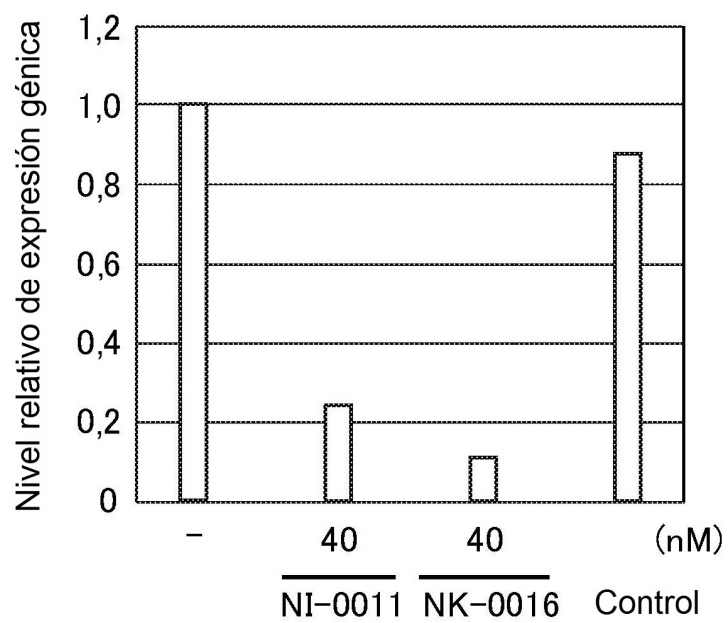


FIG. 5

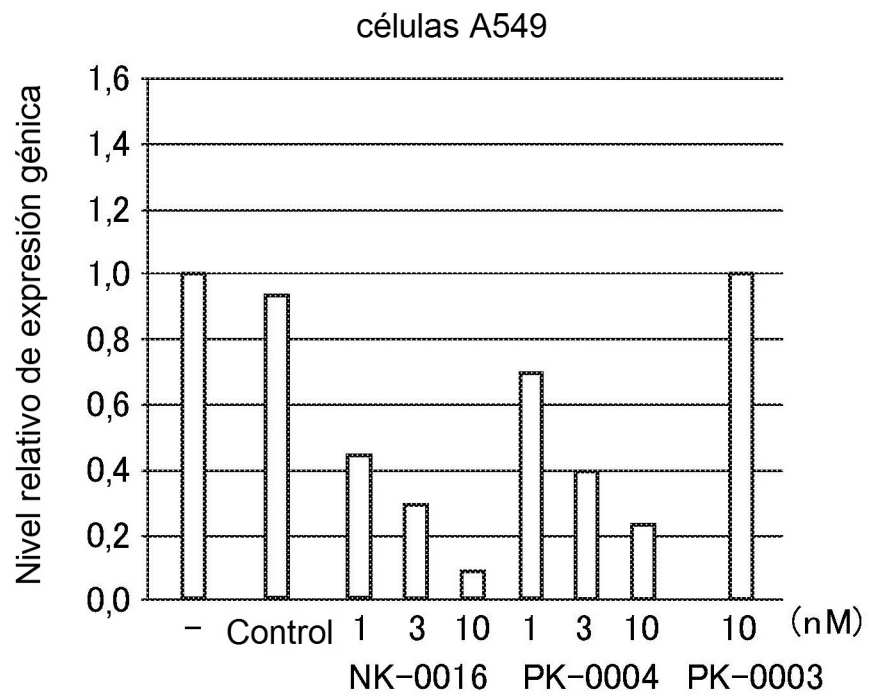


FIG. 6

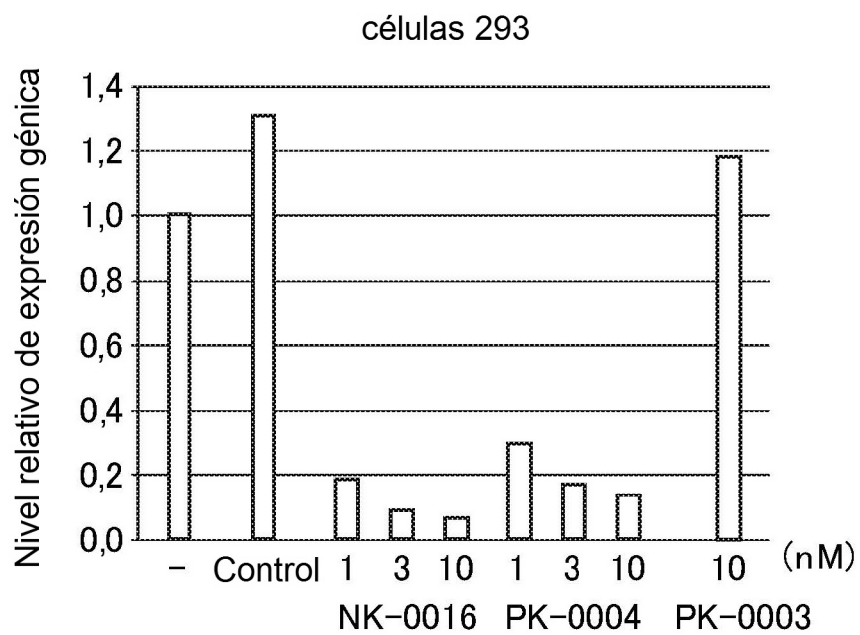


FIG. 7

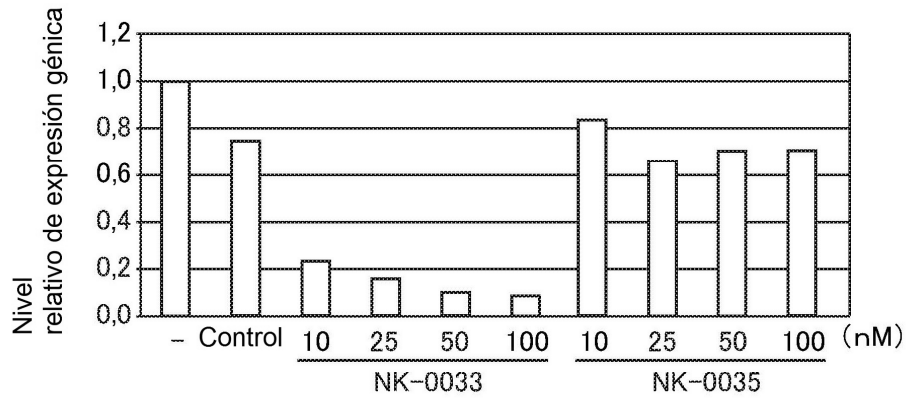


FIG. 8

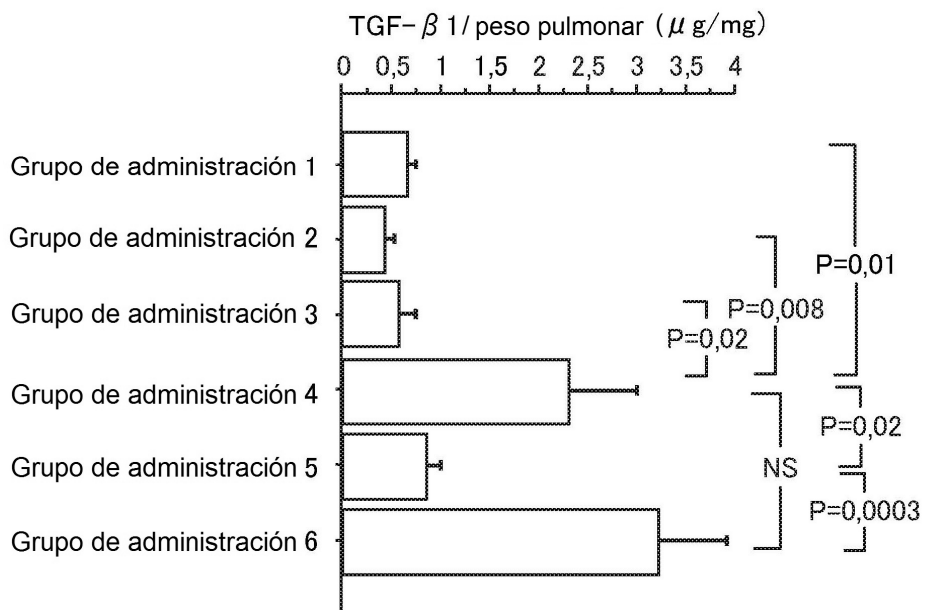


FIG. 9

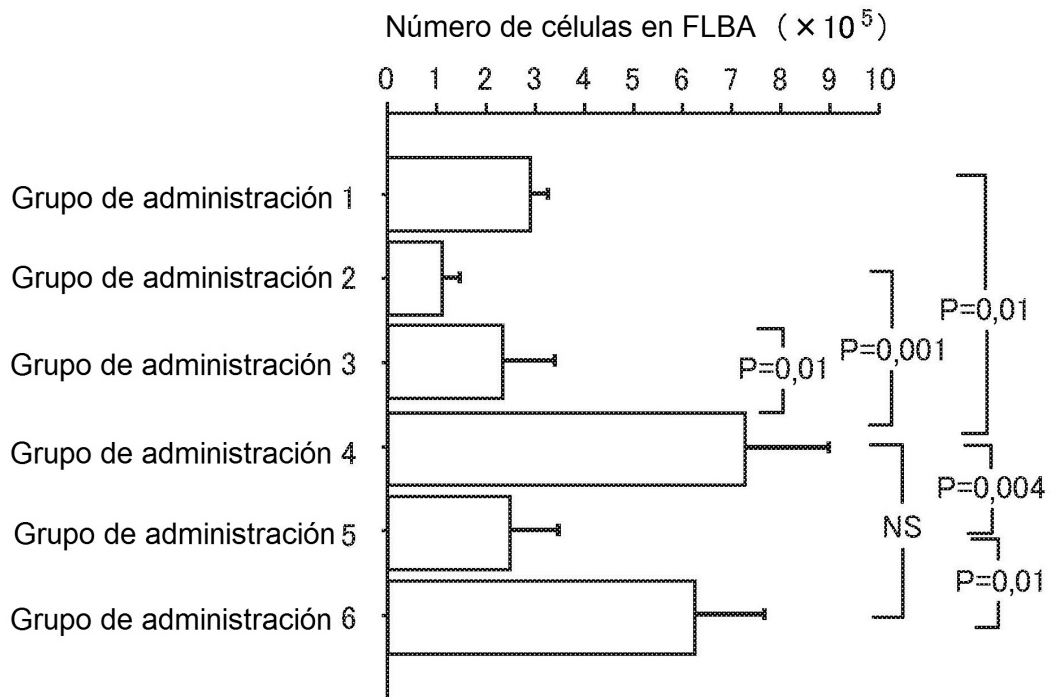


FIG. 10

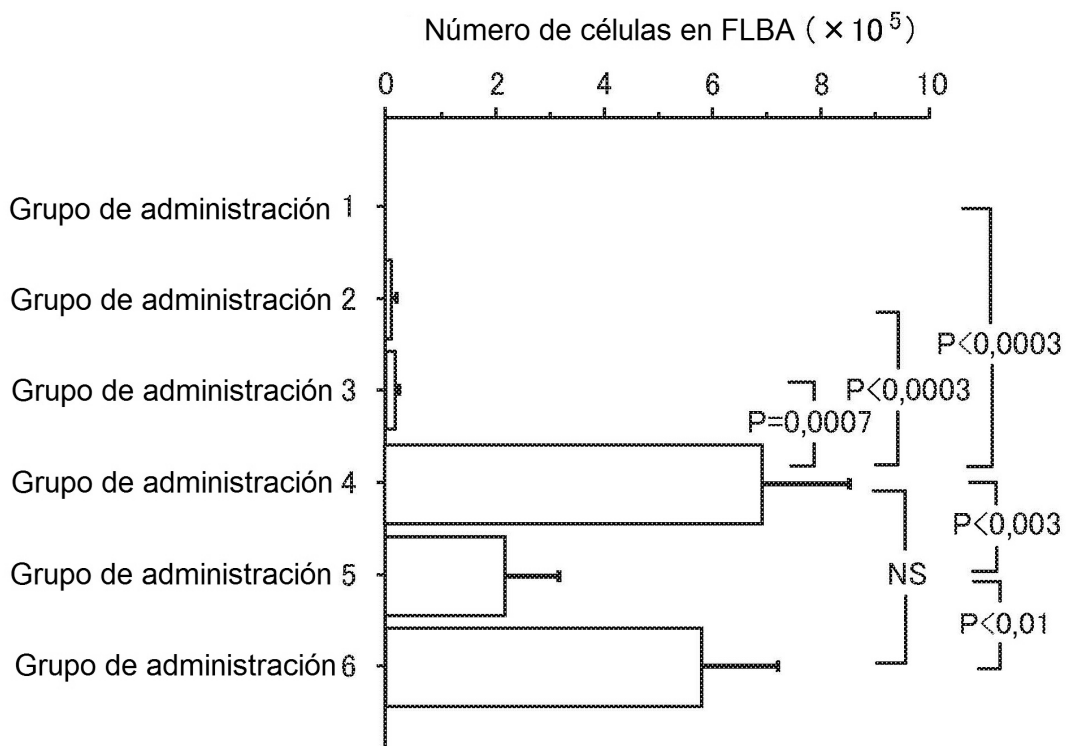


FIG. 11

ARNcs (-)

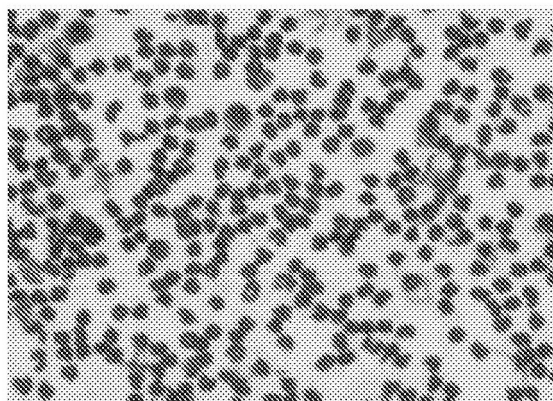


FIG. 12A

NK-0035 (+)

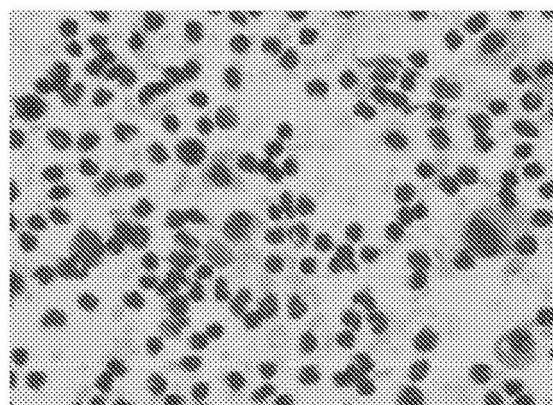


FIG. 12B

NK-0033 (+)

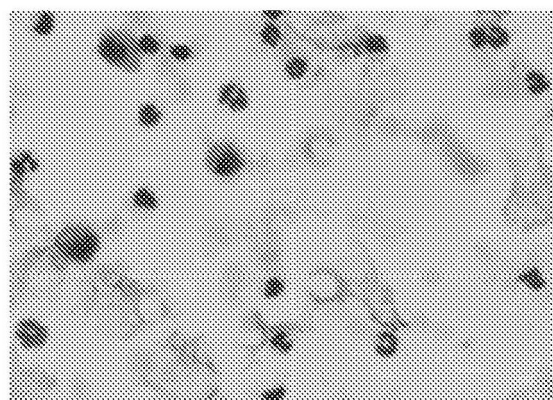


FIG. 12C

ARNcs (-)

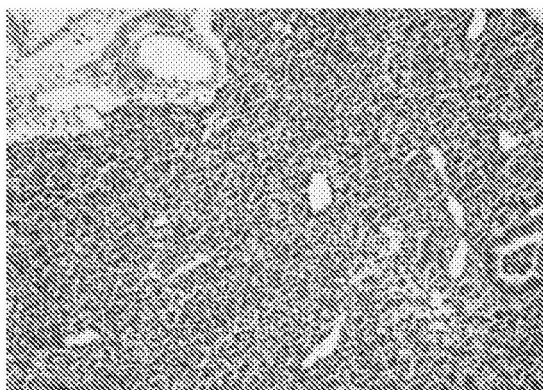


FIG. 13A

NK-0035 (+)

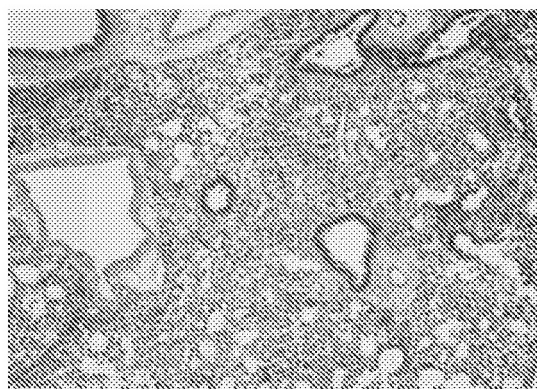


FIG. 13B

NK-0033 (+)

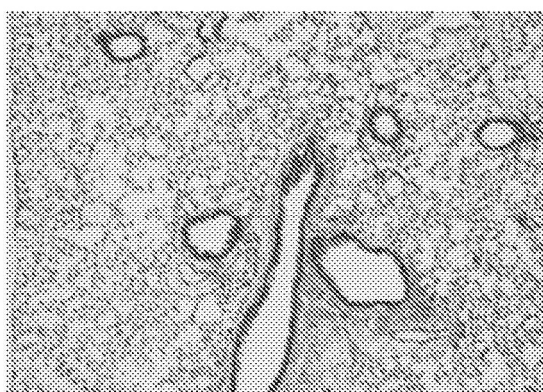


FIG. 13C

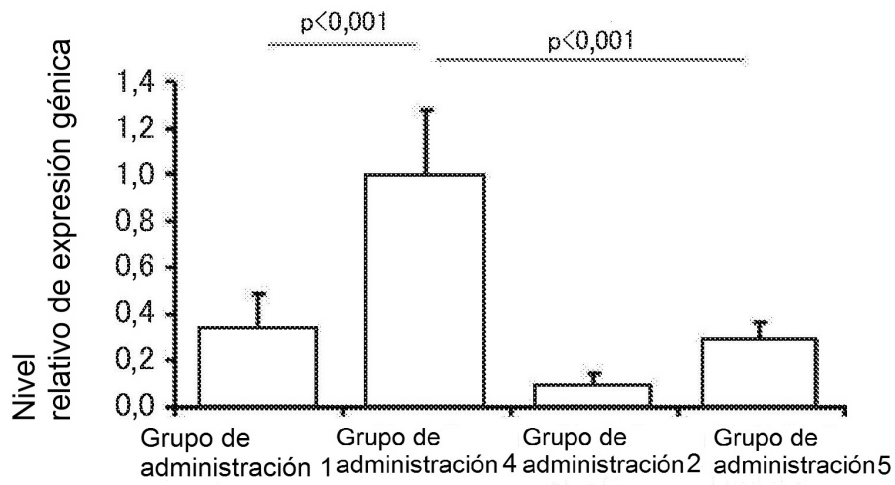


FIG. 14A

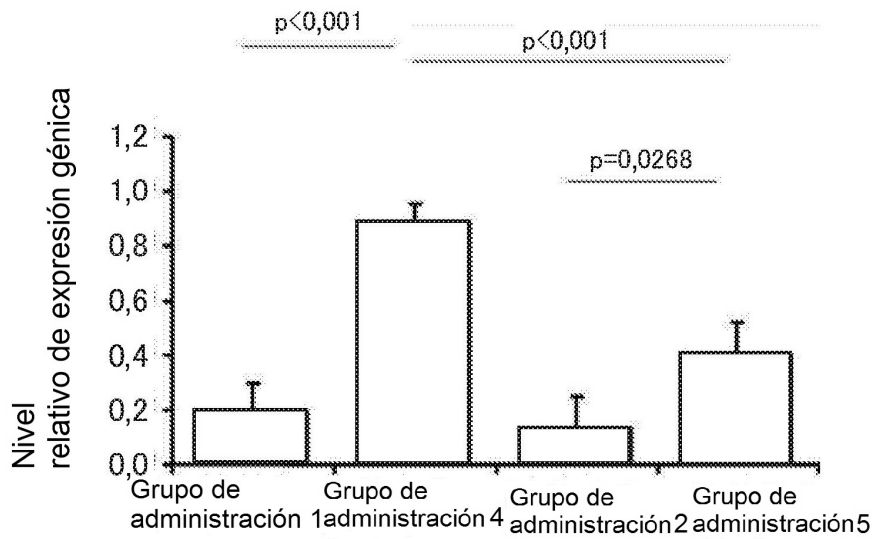


FIG. 14B

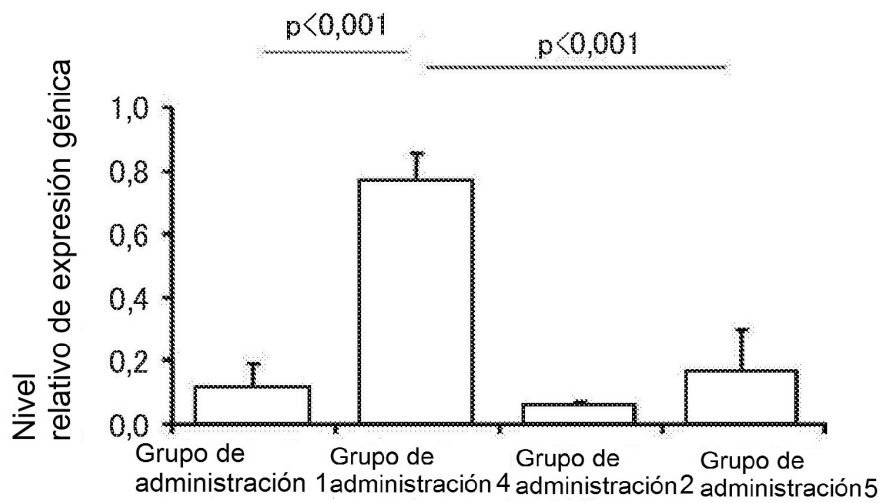


FIG. 14C

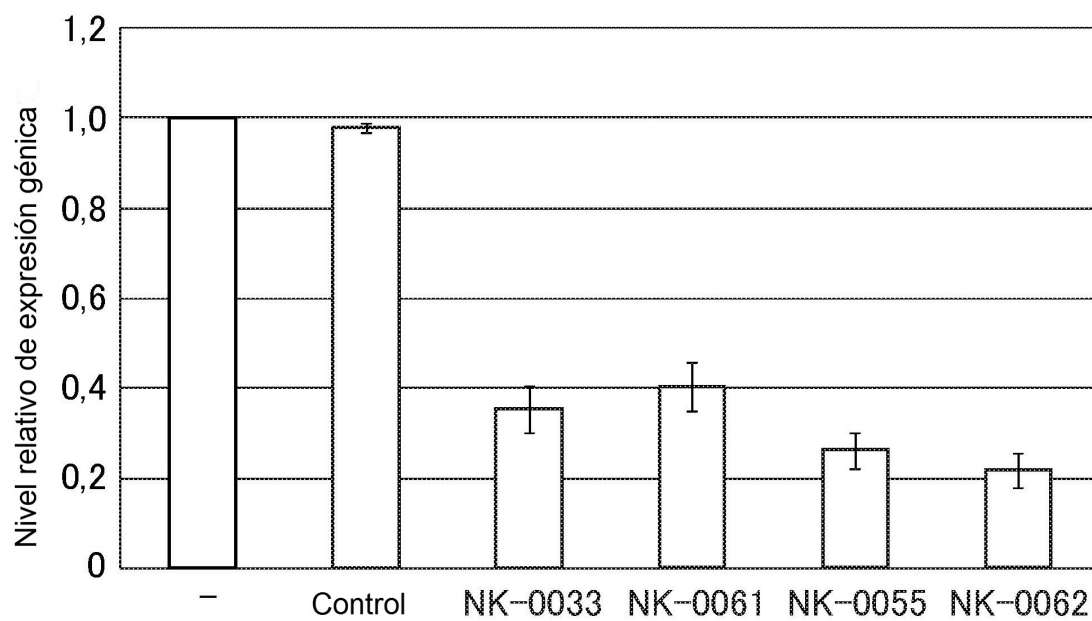


FIG. 15

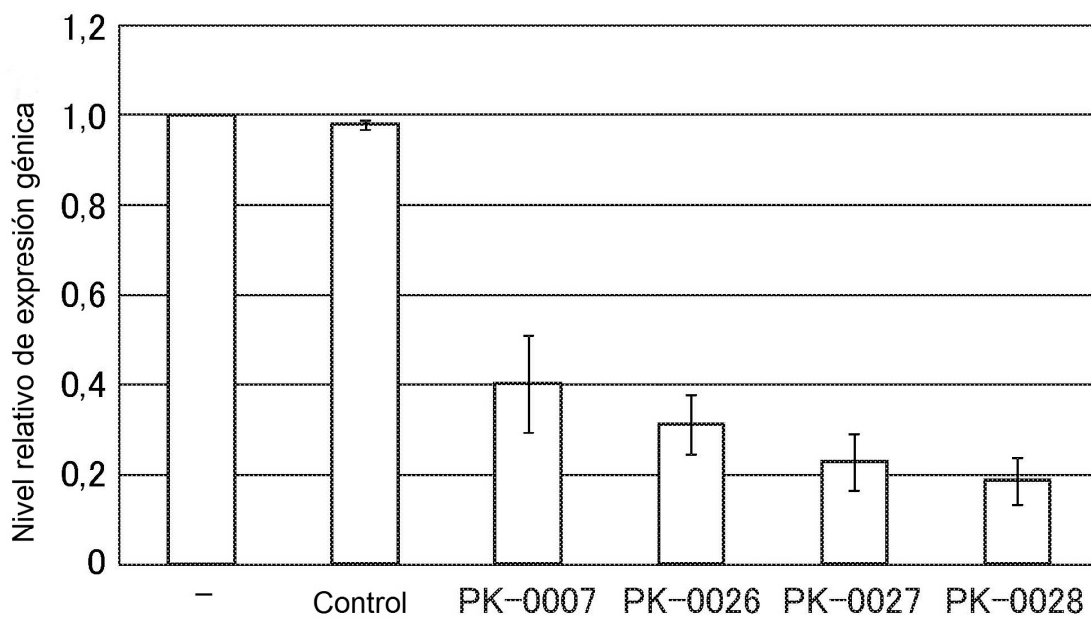


FIG. 16

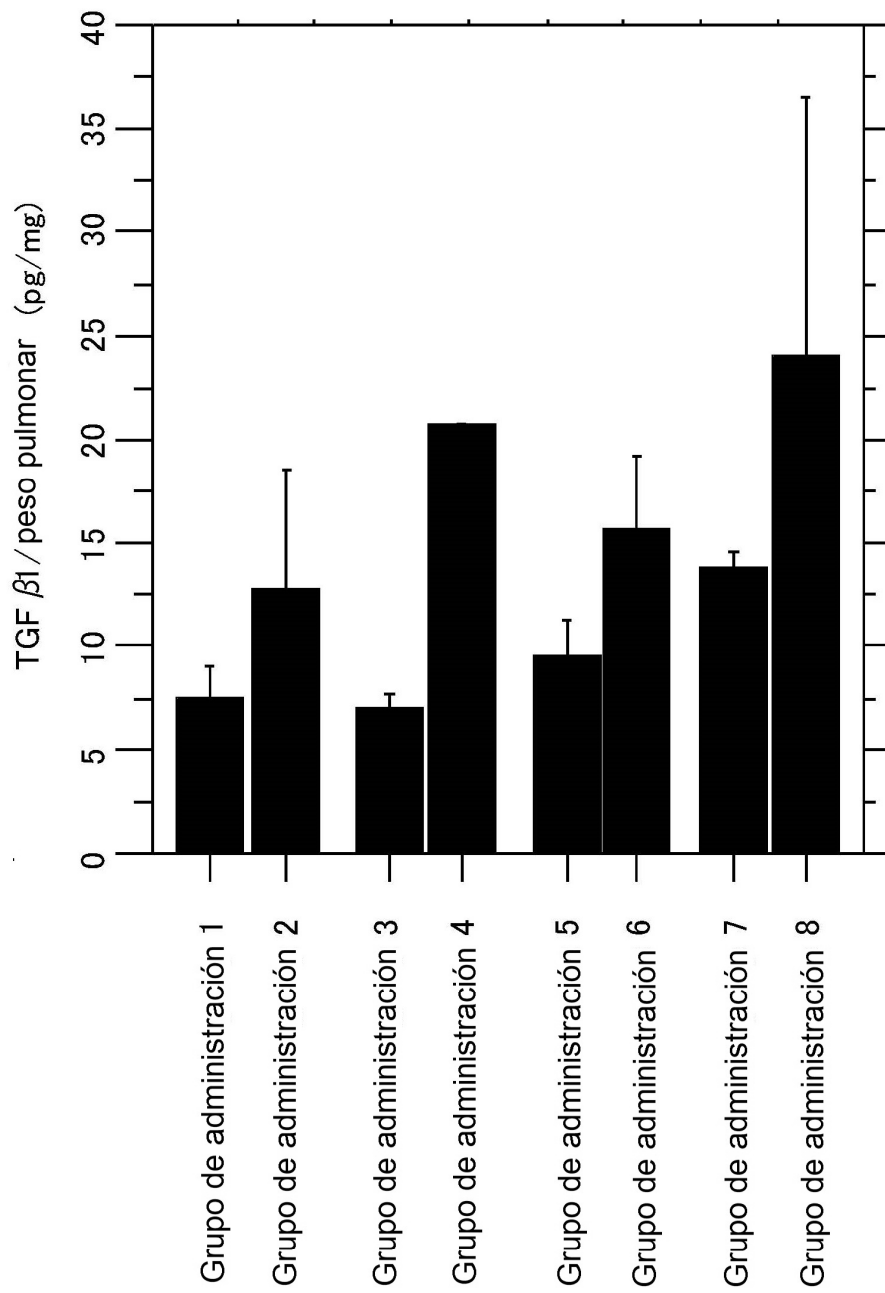


FIG. 17

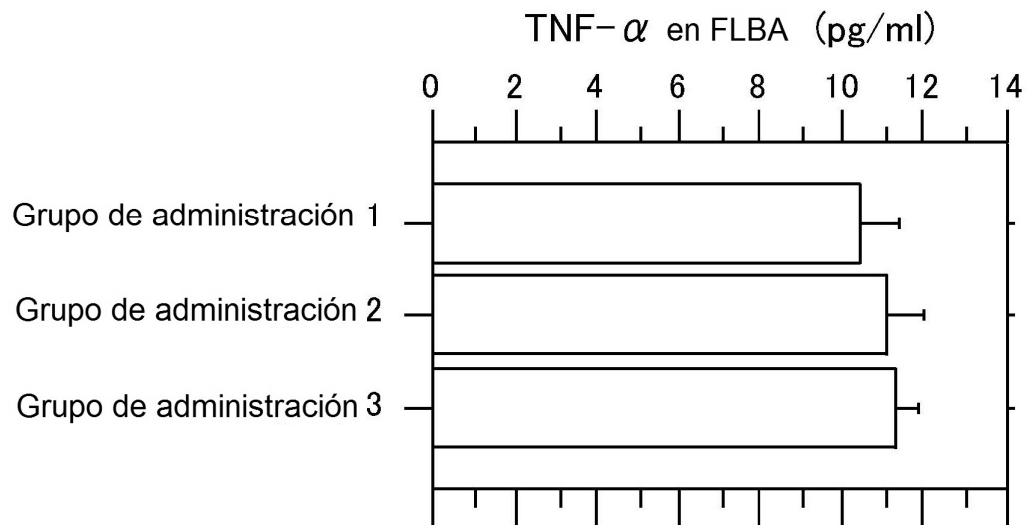


FIG. 18A

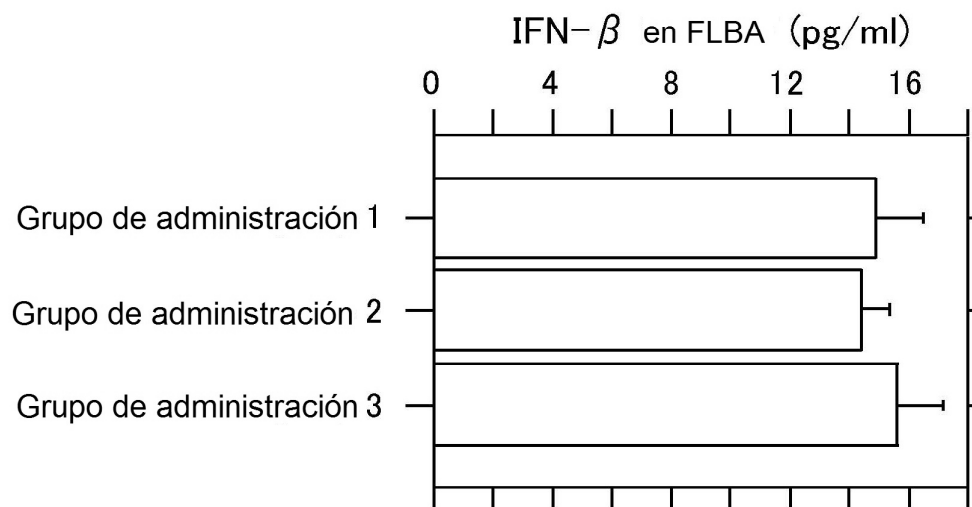


FIG. 18B

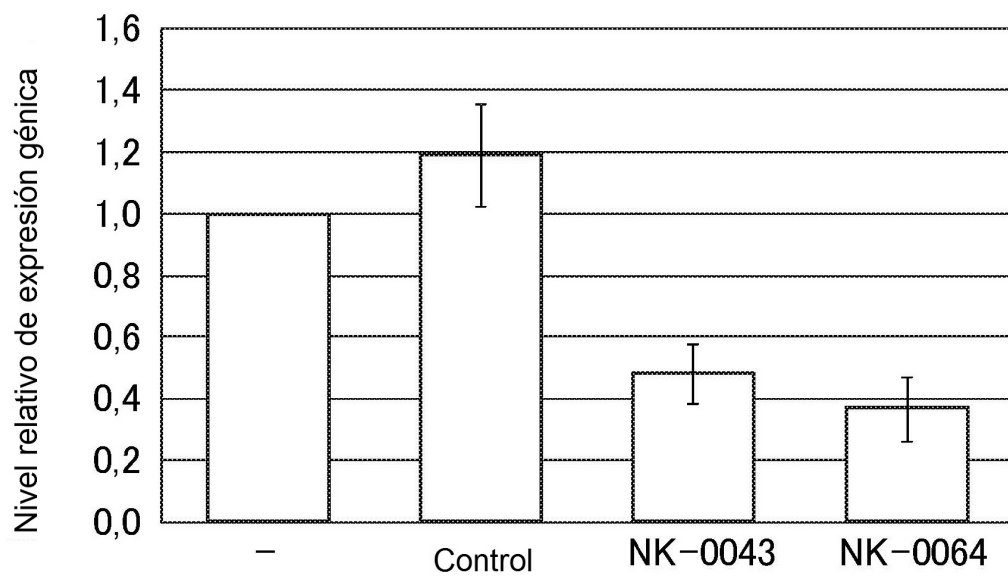


FIG. 19

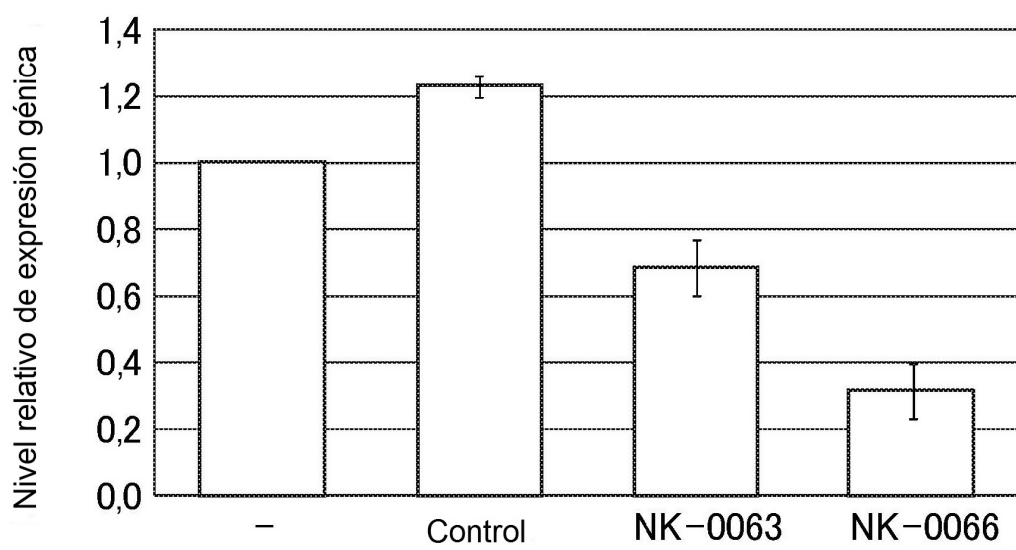


FIG. 20

FIG. 21



FIG. 22

Xc+Yc/X+Y			
NK-0047	26/27	5' - <u>aaccaugagaagaaquaugacaaacagcc</u> <u>CCACACCCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> [*] <u>GUUCGg</u> -3'	66
NK-0025	25/26	5' - <u>accaugagaagaaquaugacaaacagcc</u> <u>CCACACCCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> [*] <u>GUUCGg</u> -3'	52
NK-0048	24/25	5' - <u>accaugagaagaaquaugacaaacagcc</u> <u>CCACACCCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> [*] <u>GUUCGg</u> -3'	67
NK-0049	23/24	5' - <u>ccaugagaagaaquaugacaaacagcc</u> <u>CCACACCCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> [*] <u>GUUCGa</u> -3'	68
NK-0050	23/24	5' - <u>accaugagaagaaquaugacaaacagcc</u> <u>CCACACCCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> [*] <u>GUUCGg</u> -3'	69
NK-0051	22/23	5' - <u>ccaugagaagaaquaugacaaacagcc</u> <u>CCACACCCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> [*] <u>GUUCGa</u> -3'	70
NK-0052	21/22	5' - <u>caugagaagaaquaugacaaacagcc</u> <u>CCACACCCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> [*] <u>GUUCGa</u> -3'	71
NK-0053	21/22	5' - <u>ccaugagaagaaquaugacaaaca</u> <u>CCACACCCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> [*] <u>GUUCGa</u> -3'	72
NK-0054	20/21	5' - <u>caugagaagaaquaugacaaaca</u> <u>CCACACCCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> [*] <u>GUUCGa</u> -3'	73

FIG. 23

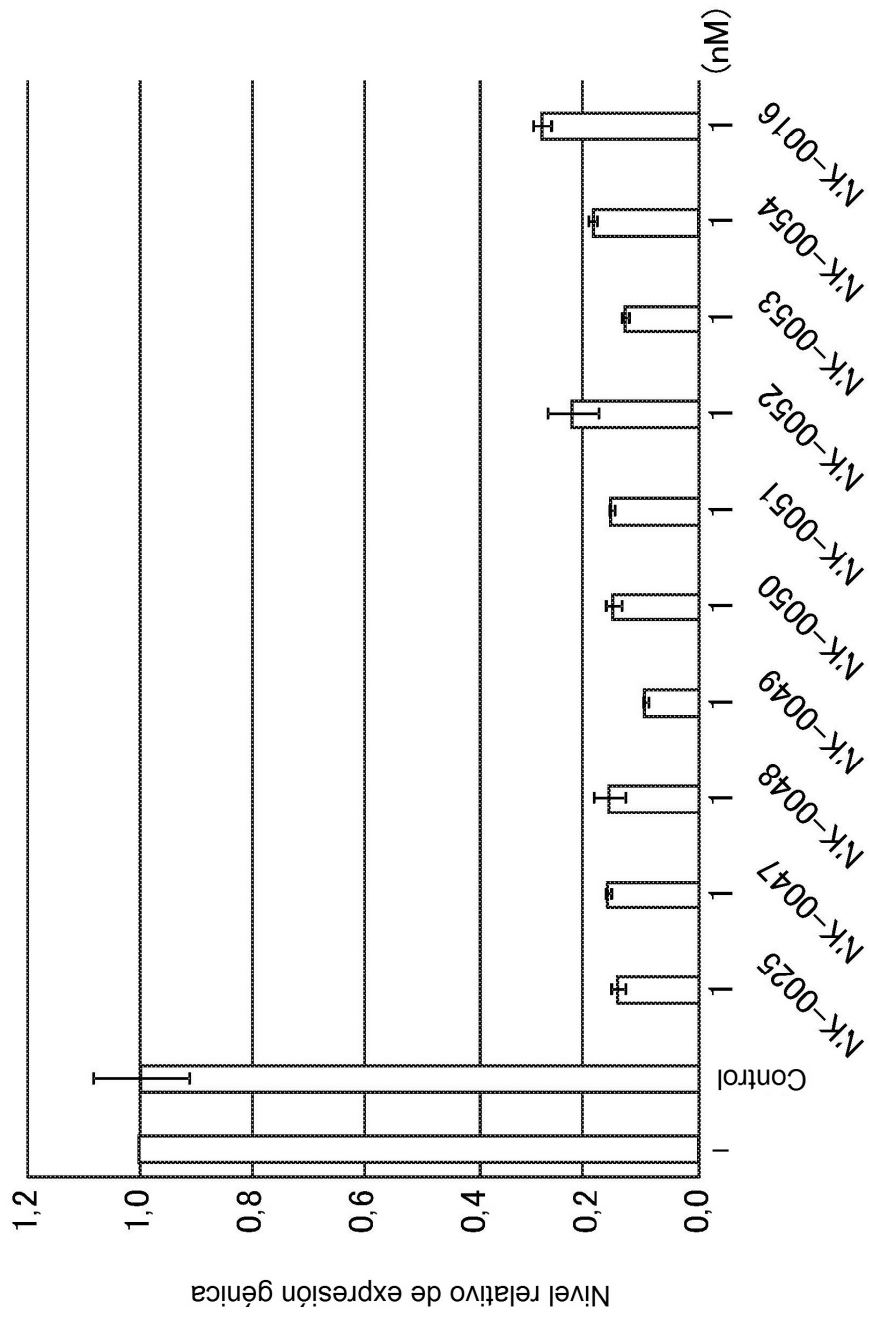


FIG. 24

	Xc/X	
NK-0001	25/25	5' – <u>aacc<u>au</u>gaagaa<u>ua</u>ugacaacaagcc</u> CCACACCC <u>GGCUGUUGUCAUA</u> CUUCUCA <u>UGGUUC</u> UUUGg – 3'
NK-0002	23/25	5' – <u>ccaugagaagaa<u>ua</u>ugacaacaagcc</u> CCACACCC <u>GGCUGUUGUCAUA</u> CUUCUCA <u>UGGUUC</u> ^{**} UUUGg – 3'
NK-0003	22/25	5' – <u>caugagaagaa<u>ua</u>ugacaacaagcc</u> CCACACCC <u>GGCUGUUGUCAUA</u> CUUCUCA <u>UGGUUC</u> ^{***} UUUGg – 3'

FIG. 25

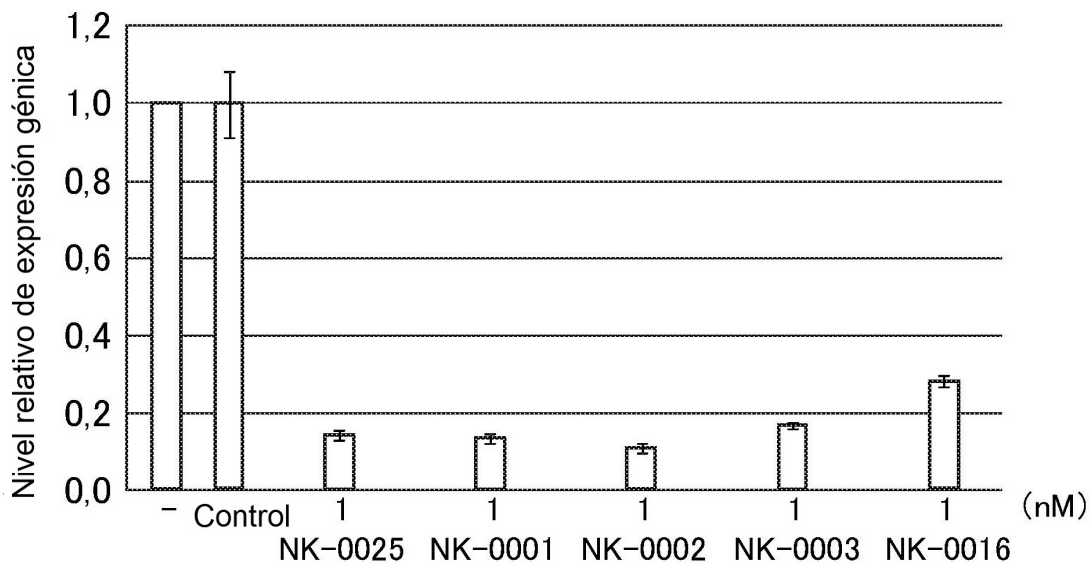


FIG. 26

NK-0079 (SEC ID NÚM:77) Lx/Ly=4/7

5' - accaugagaaguaugacaacagcccUUGCGGCUGLUGUCAUACUUCUCAUGGU^{*}CCACACCG-3'

Xc
Z
Yc

NK-0080 (SEC ID NÚM:78) Lx/Ly=1/1

5'- ggaaccaugagaaguanacaaacagccaagUCUUGGCGUGUGUCAUACUUCUCAUGGUUCCUCug -3'

Xc Z Yc

NK-0081 (SEC ID NÚM:79) Lx/Ly=0/0

5'-ggaaaccaugagaaguaugacaacagccaagCUUGGCGUUGUCAUACUCUCAUGGUUCCUC*-3'
Xc Zc Yc

NK-0082 (SEC ID NÚM:8) $L_x/L_y = 4/3$

5'-accangagaaguangacaacagccUCCGGCUGUUGUCAUAUCUCAUGGUCAUGg-3'

Xc Z Yc

NK-0083 (SEC ID NÚM:37) Lx/Ly=9/3

5'-accaugagaaguaugacaacagccUUCAAGAGAGGCGUGUCUAUACUUCUCAUGGUUC*AUGg-3'

FIG. 27

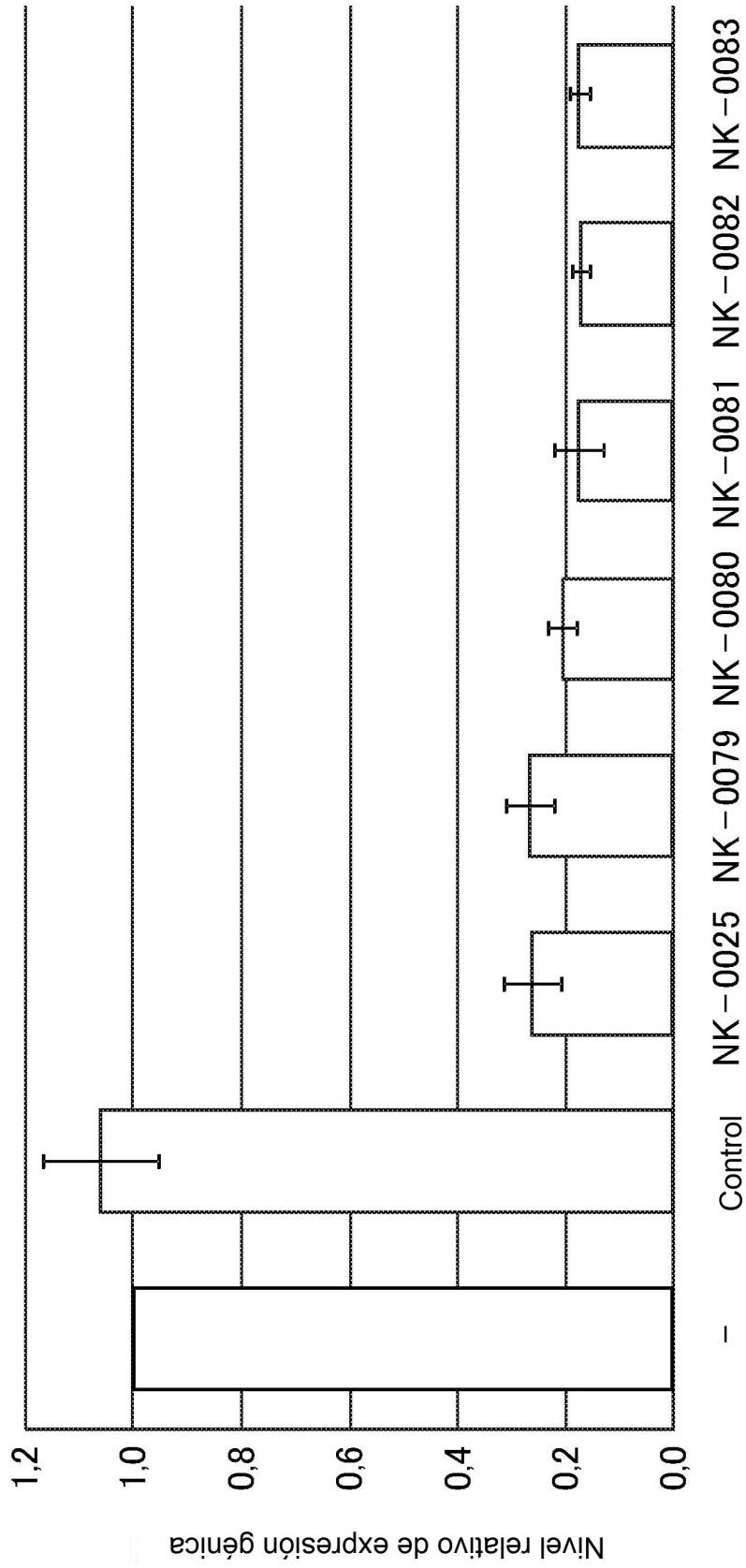


FIG. 28

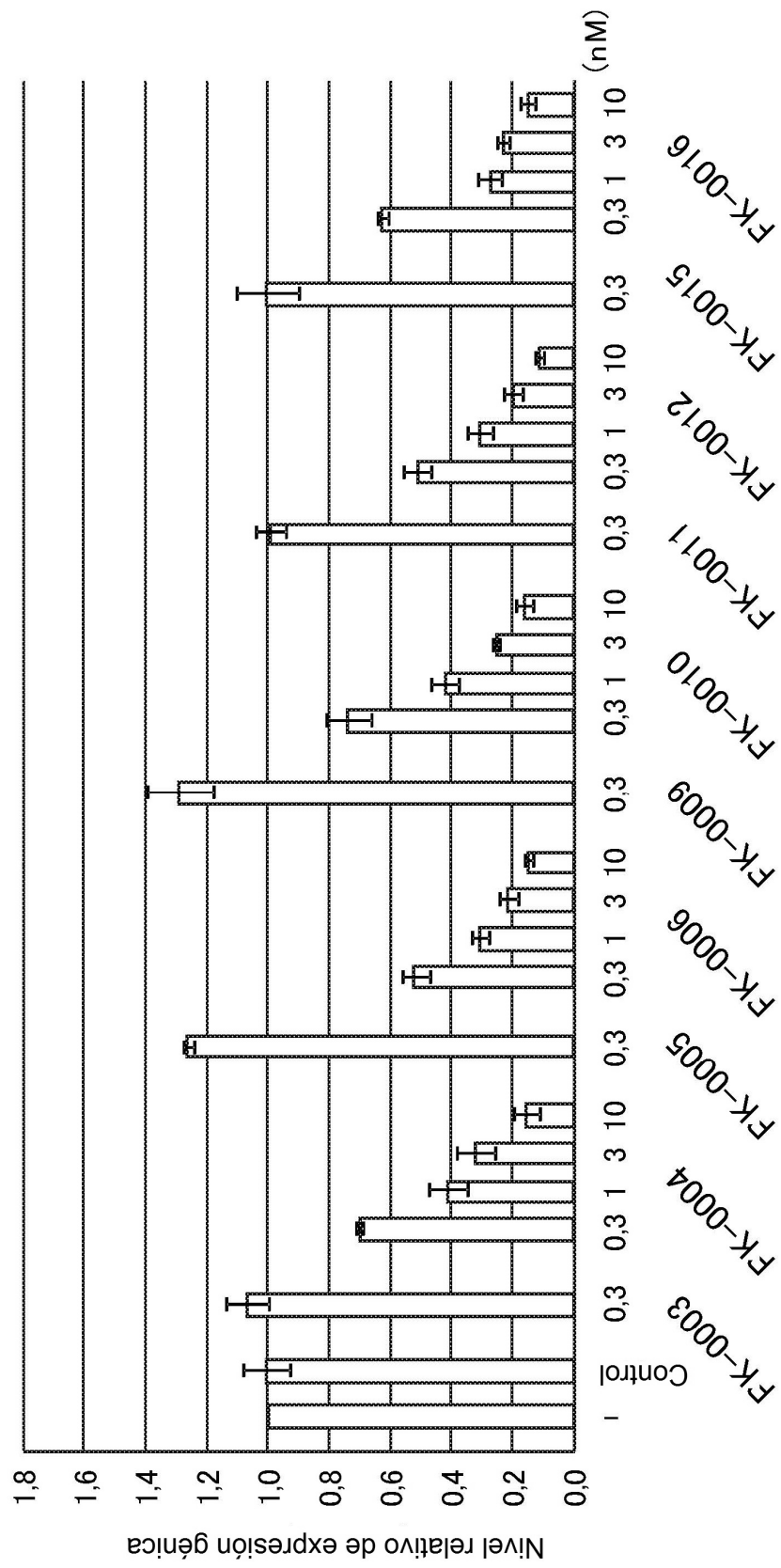


FIG. 29

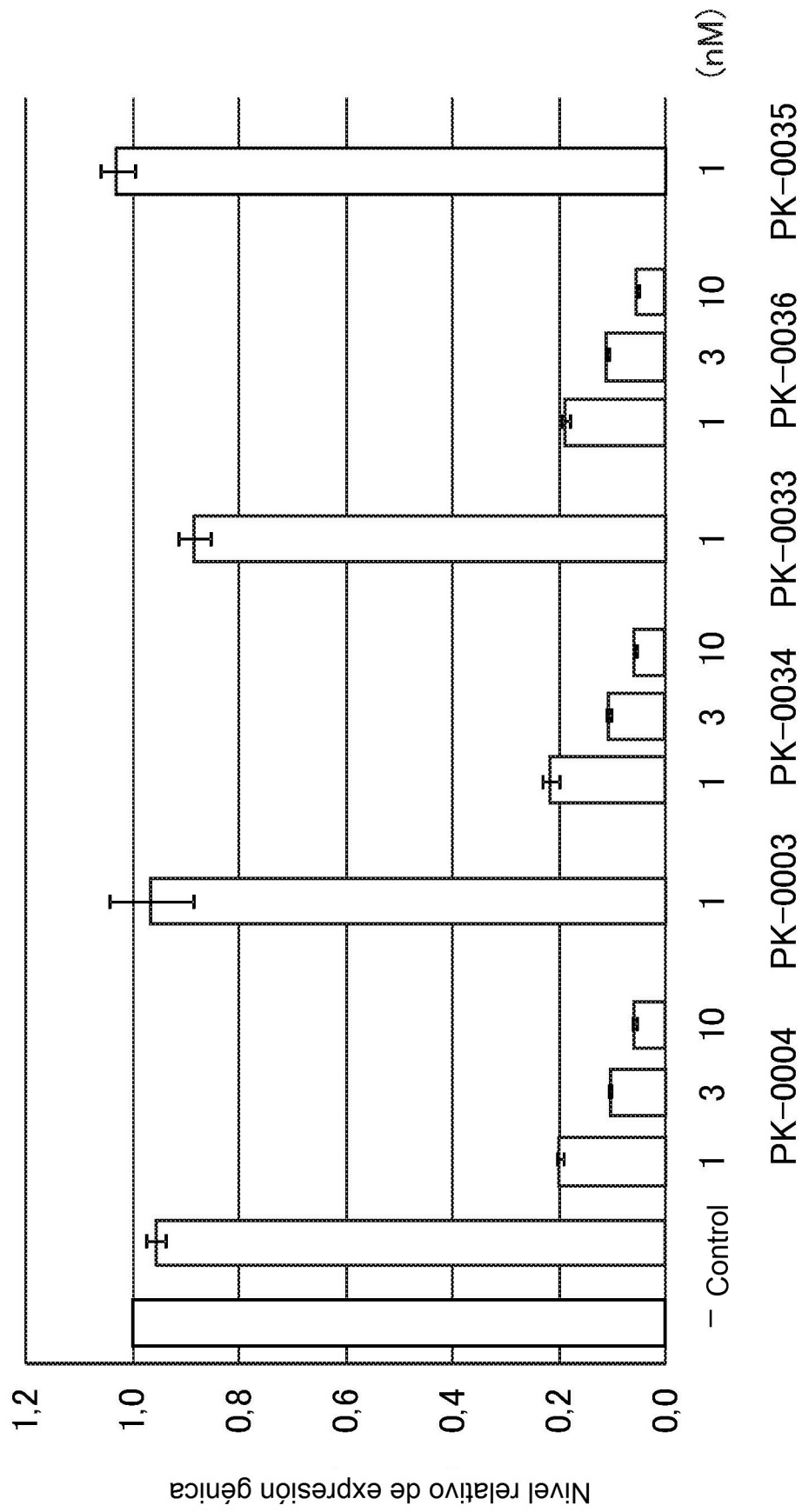


FIG. 30

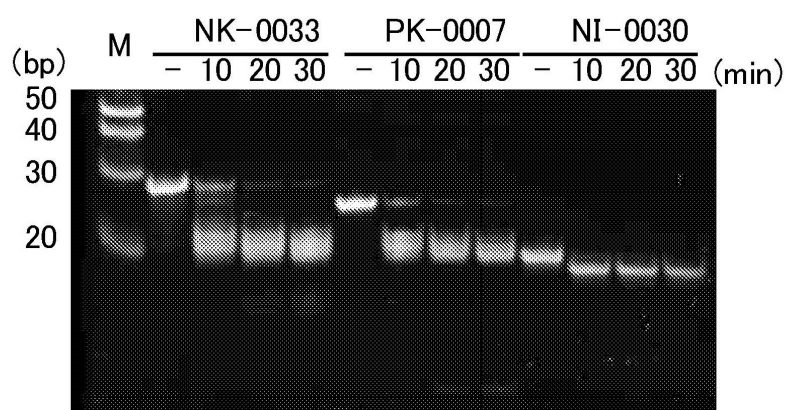


FIG. 31

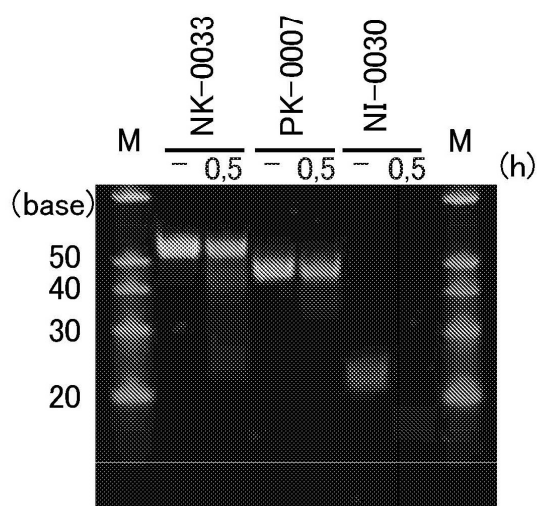


FIG. 32