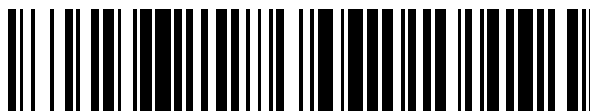


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 819**

51 Int. Cl.:

A61K 47/54 (2007.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2013** E 17184080 (4)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019** EP 3254700

54 Título: **Inhibidor de micro-ARN**

30 Prioridad:

04.03.2012 JP 2012047466

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

11.06.2020

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;
SHIROHZU, HISAO;
SUZUKI, HIROSHI;
HAMASAKI, TOMOHIRO y
MIZUTANI, TAKAYUKI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 765 819 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

Inhibidor de micro-ARN

Campo de la técnica

La presente invención se refiere a un monómero para la síntesis de una molécula de ácido nucleico.

5 **Antecedentes de la invención**

10 Un micro-ARN es un ARN pequeño de 18 a 25 nucleótidos que se transcribe desde el genoma y que regula la expresión del gen destinatario. Se sabe que la expresión anómala de micro-ARN está profundamente implicada en muchas enfermedades, tales como el cáncer y similares, y en los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios en los que los micro-ARN son diana para diagnósticos y tratamientos. Un método de inhibición de micro-ARN incluye un método que usa ANB (ácido nucleico bloqueado) y el método está en la fase clínica en Europa y en Estados Unidos. Otros métodos para inhibir los micro-ARN incluyen una técnica denominada esponja de micro-ARN (documento 1 que no es patente).

[Lista de documentos]

[Documento que no es patente]

15 Documento 1 que no es patente: *Nature Methods*, 4: 72

La solicitud de patente internacional WO 2011/117353 se refiere a oligonucleótidos antisentido bivalentes que comprenden un primer oligonucleótido conectado a un segundo oligonucleótido a través de un resto conector.

Compendio de la invención

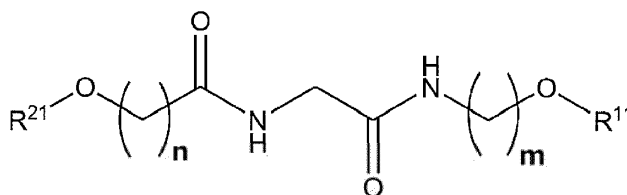
20 No obstante, ya que un método que usa ANB necesita que se use un ácido nucleico modificado especial, su utilidad no será muy amplia. Además, aunque la esponja de micro-ARN tenga una amplia utilidad, también tiene el problema relacionado con que la molécula de ARN se degrada con facilidad por la acción de enzimas de degradación.

En consonancia, en la presente memoria se describe un inhibidor de micro-ARN que tiene una amplia utilidad y es difícil de degradar.

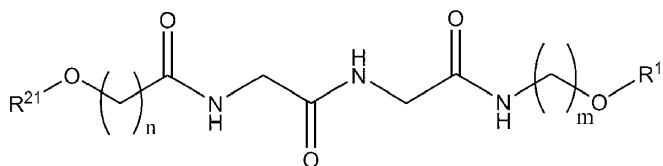
25 El inhibidor de micro-ARN descrito en la presente memoria se caracteriza por tener dos o más secuencias complementarias a la secuencia del micro-ARN destinatario de la inhibición, y las arriba mencionadas dos o más secuencias complementarias están conectadas a través de un resto conector.

30 Ya que el inhibidor de micro-ARN no necesita usar un ácido nucleico modificado especial, es mejor porque tiene mayor utilidad y es más difícil de degradar, ya que las secuencias complementarias antes mencionadas están conectadas a través de un resto conector.

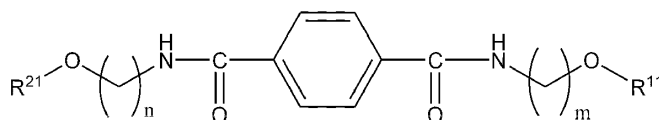
La presente invención se refiere a un monómero para la síntesis de una molécula de ácido nucleico, que tiene una estructura de las siguientes fórmulas químicas (II-1), (II-4) o (II-6):



(II-1)



(II-4)



(II - 6)

en las fórmulas químicas (II-1), (II-4) o (II-6) antes mencionadas, R¹¹ es H o un grupo protector y R²¹ es un grupo protector con fosfatos;

en donde, en dicha fórmula química (II-1), n = 11 y m = 12,

5 en donde, en dicha fórmula química (II-4), n = 5 y m = 4,

en donde, en dicha fórmula química (II-6), n = 4 y m = 4.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una constitución de ejemplo del inhibidor de micro-ARN descrito en la presente memoria.

La figura 2 muestra una secuencia de ejemplo del inhibidor de micro-ARN.

10 La figura 3 muestra esquemáticamente un ejemplo de una secuencia con discordancias.

La figura 4 se muestran los resultados que confirman el nivel de expresión del micro-ARN del ejemplo 1 por la qPCR.

La figura 5 es un esquema en el que se muestra la expresión del gen de la luciferasa de *Renilla* desde el plásmido que se utiliza en los ejemplos.

15 La figura 6 es un esquema en el que se muestra la expresión del gen de la luciferasa de luciérnaga desde un plásmido diferente que se utiliza en los ejemplos.

La figura 7 es un gráfico en el que se muestra el efecto supresor de la actividad del miR-16 que presenta el inhibidor de micro-ARN del ejemplo 2-1.

20 La figura 8 es un gráfico en el que se muestra el efecto supresor de la actividad del miR-16 que presenta el inhibidor de micro-ARN del ejemplo 2-2.

La figura 9 es un gráfico en el que se muestra el efecto supresor de la actividad del miR-16 que presenta el inhibidor de micro-ARN del ejemplo 2-3.

La figura 10 es un gráfico en el que se muestra el efecto supresor de la actividad del miR-16 que presenta el inhibidor de micro-ARN del ejemplo 3.

25 La figura 11 es un gráfico en el que se muestra la comparación de los efectos supresores de la actividad de miR-16 que presentan el oligo esponja de tipo Gly (inhibidor de micro-ARN) y el oligo esponja de tipo GlyGly (inhibidor de micro-ARN) mediante el uso de las células HCT116 en el ejemplo 4.

30 La figura 12 es un gráfico en el que se muestra la comparación de los efectos supresores de la actividad del miR-16 que presentan el oligo esponja de tipo GlyGly (inhibidor de micro-ARN) y el oligo esponja de tipo TPA (inhibidor de micro-ARN) mediante el uso de las células HCT116 en el ejemplo 4.

La figura 13 es otro gráfico en el que se muestra la comparación de los efectos supresores de la actividad del miR-16 que presentan el oligo esponja de tipo GlyGly (inhibidor de micro-ARN) y el oligo esponja de tipo TPA (inhibidor de micro-ARN) mediante el uso de las células HCT116 en el ejemplo 4.

35 La figura 14 es otro gráfico más en el que se muestra la comparación de los efectos supresores de la actividad del miR-16 que presentan el oligo esponja de tipo GlyGly (inhibidor de micro-ARN) y el oligo esponja de tipo TPA (inhibidor de micro-ARN) mediante el uso de las células HCT116 en el ejemplo 4.

La figura 15 es un gráfico en el que se muestra la comparación de los efectos supresores de la actividad del miR-16 que presentan el oligo esponja de tipo Gly (inhibidor de micro-ARN) y del oligo esponja de tipo GlyGly (inhibidor de micro-ARN) mediante el uso de las células HEK293T en el ejemplo 4.

40 La figura 16 es otro gráfico en el que se muestra la comparación de los efectos supresores de la actividad del miR-16 que presentan el oligo esponja de tipo Gly (inhibidor de micro-ARN) y el oligo esponja de tipo GlyGly

(inhibidor de micro-ARN) mediante el uso de las células HEK293T en el ejemplo 4.

La figura 17 es otro gráfico más en el que se muestra la comparación de los efectos supresores de la actividad del miR-16 que presentan el oligo esponja de tipo Gly (inhibidor de micro-ARN) y el oligo esponja de tipo GlyGly (inhibidor de micro-ARN) mediante el uso de las células HEK293T en el ejemplo 4.

5 La figura 18 es un gráfico en el que se muestra la comparación de los efectos supresores de la actividad del miR-16 que presenta el oligo esponja (inhibidor de micro-ARN) cuando la secuencia de fijación al miR-16 es de un tipo perfecto, un tipo burbuja o un tipo abultamiento mediante el uso de las células HCT116 en el ejemplo 5.

10 La figura 19 es un gráfico en el que se muestra la comparación de los efectos supresores de la actividad del miR-16 que presenta el oligo esponja (inhibidor de micro-ARN) cuando la secuencia de fijación al miR-16 es de un tipo perfecto, un tipo burbuja o un tipo abultamiento mediante el uso de las células HEK293T en el ejemplo 5.

Descripción de las realizaciones

15 El inhibidor de micro-ARN tiene preferiblemente un resto conector fijado a cada porción terminal de las secuencias complementarias anteriormente mencionadas presentes en ambos extremos del inhibidor de micro-ARN. Con esta forma, se puede suprimir además la degradación.

20 En el inhibidor de micro-ARN, el resto conector arriba mencionado contiene preferiblemente al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un resto aminoacídico, un resto poliamínico y un resto de ácido policarboxílico. El resto conector anteriormente mencionado puede que sí, o puede que no, contenga un resto diferente del resto aminoacídico, resto poliamínico y resto de ácido policarboxílico. Por ejemplo, el resto conector anteriormente mencionado puede ser cualquiera de un resto de ácido policarboxílico, un resto de ácido tereftálico y un resto aminoacídico.

25 Tal y como se describe en la presente memoria, la «poliamina» significa cualquier compuesto que contiene numerosos (dos, tres o más) grupos amino. El «grupo amino» anteriormente mencionado no se limita a un grupo $-NH_2$ y también incluye un grupo imino ($-NH-$). La poliamina anteriormente mencionada no está particularmente limitada y los ejemplos de la misma incluyen 1,4-diaminobenceno, 1,3-diaminobenceno, 1,2-diaminobenceno y similares. Además, el «ácido policarboxílico» significa cualquier compuesto que contiene numerosos (dos, tres o más) grupos carboxi. El ácido policarboxílico anteriormente mencionado no está particularmente limitado y los ejemplos del mismo incluyen 1,4-dicarboxibenceno (ácido tereftálico), 1,3-dicarboxibenceno (ácido isoftálico), 1,2-dicarboxibenceno (ácido ftálico) y similares. Además, el «aminoácido» significa cualquier compuesto orgánico que contiene uno o varios grupos amino y uno o varios grupos carboxi en una molécula, tal y como se menciona más adelante. El «grupo amino» anteriormente mencionado no se limita a un grupo $-NH_2$ y también incluye un grupo imino ($-NH-$).

35 En el inhibidor de micro-ARN, el resto aminoacídico presente entre las dos o más secuencias complementarias anteriormente mencionadas puede ser una gran cantidad de restos aminoacídicos interconectados. El resto aminoacídico que es una gran cantidad de restos aminoacídicos interconectados es, por ejemplo, un resto que contiene una estructura peptídica. Más específicamente, el resto aminoacídico anteriormente mencionado que es una gran cantidad de restos aminoacídicos interconectados es, por ejemplo, un resto aminoacídico de la fórmula química (I) mencionada más adelante, en donde la fórmula química (Ia) mencionada más adelante es un péptido (p. ej., dímero de glicina o trímero de glicina, etc.).

40 En el inhibidor de micro-ARN, el resto aminoacídico anteriormente mencionado puede ser un resto de glicina, un resto de tereftalamida o un resto de prolina.

45 En el inhibidor de micro-ARN, el resto aminoacídico unido a la porción terminal de la secuencia complementaria anteriormente mencionada puede ser una gran cantidad de restos aminoacídicos interconectados. De igual forma, en el inhibidor de micro-ARN, al menos uno de los restos aminoacídicos anteriormente mencionados presente entre dos o más secuencias complementarias y un resto aminoacídico unido a la porción terminal de la secuencia complementaria anteriormente mencionada puede ser un resto de dímero o trímero de glicina.

La secuencia complementaria anteriormente mencionada puede ser un ARN o un ADN.

50 El resto aminoacídico que conecta las dos o más secuencias complementarias anteriormente mencionadas no está particularmente limitado y, por ejemplo, se puede utilizar un resto de glicina, un resto de tereftalamida o un resto de prolina, tal y como se menciona más arriba. De igual modo, el resto aminoacídico anteriormente mencionado puede ser un resto de aminoácido modificado o un derivado de aminoácido. El resto aminoacídico que conecta (une) las dos o más secuencias complementarias anteriormente mencionadas puede ser un único resto aminoacídico, o dos o más restos aminoacídicos conectados unos a los otros.

55 Tal y como se menciona más arriba, las secuencias complementarias anteriormente mencionadas presentes

5 en ambos extremos del inhibidor de micro-ARN tienen preferiblemente el resto conector anteriormente mencionado conectado a cada porción terminal. El resto conector anteriormente mencionado puede ser, por ejemplo, un resto aminoacídico. Al no estar el resto aminoacídico anteriormente mencionado particularmente limitado, es, por ejemplo, un resto de glicina, un resto de tereftalamida o un resto de prolina. El resto aminoacídico que conecta las dos o más secuencias complementarias anteriormente mencionadas puede ser un resto aminoacídico único, o dos o más restos aminoacídicos.

10 La secuencia complementaria anteriormente mencionada es complementaria a todo o a una parte del micro-ARN cuya inhibición se desea. Cuando la secuencia es parcialmente complementaria, es preferiblemente complementaria a una secuencia en el extremo 3' o en el extremo 5' del bucle del micro-ARN. La secuencia complementaria anteriormente mencionada puede contener una secuencia complementaria a todo o a una parte de la parte del bucle del micro-ARN. El número de secuencias complementarias anteriormente mencionadas es dos o más, por ejemplo, de 2 a 10, preferiblemente de 3 a 8, más preferiblemente de 4 a 6. Mientras que el número de bases de la secuencia complementaria anteriormente mencionada no está particularmente limitado, puede ser, por ejemplo, aproximadamente de 20 a 25 bases. La secuencia complementaria anteriormente mencionada puede ser de ARN o de ADN, tal y como se mencionó más arriba, o puede ser una mezcla de ADN y ARN. El ácido nucleico que constituye la secuencia complementaria anteriormente mencionada es preferiblemente un ácido nucleico natural. Sin embargo, la presente descripción no se limita a este y puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico modificado. Además, un ácido nucleico que constituye la secuencia complementaria anteriormente mencionada puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico artificial, tal como ANB, APN y similares. A partir de los aspectos de amplia utilidad y de comodidad, es preferible un ácido nucleico natural, tal y como se menciona más arriba.

25 Un ejemplo de la constitución del inhibidor de micro-ARN se muestra en la figura 1. Tal y como se muestra en esta figura, en el inhibidor de micro-ARN 1 de este ejemplo, están conectadas tres secuencias complementarias 2 a través de dos restos conectores (p. ej., resto aminoacídico) 3, y el resto conector 3 también está conectado a cada porción terminal de las secuencias complementarias 2 en ambos extremos. De igual forma, en la figura 2 se muestra un ejemplo de la secuencia del inhibidor de micro-ARN cuando el hsa-miR-15a se usa de micro-ARN destinatario de la inhibición. En este ejemplo, la secuencia complementaria anteriormente mencionada (SEQ ID n.º 1) es complementaria de la secuencia completa de hsa-miR-15a.

5'-CACAAACCATGCCTGCTGCTA-3' (SEQ ID n.º 1).

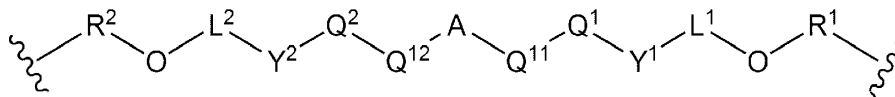
30 En el inhibidor de micro-ARN, la secuencia complementaria anteriormente mencionada puede ser completamente complementaria (concordancia total) a, por ejemplo, todo o parte del micro-ARN o puede contener una discordancia. Cuando el inhibidor de micro-ARN contiene una discordancia, se suprime la escisión por una enzima (Dicer, etc.) que escinde el ácido nucleico bicatenario y la degradación se vuelve preferiblemente más difícil. La discordancia anteriormente mencionada no está particularmente limitada. Por ejemplo, una discordancia de 1 base, o varias bases, puede estar presente en el centro de la secuencia complementaria anteriormente mencionada, o el centro de la secuencia complementaria anteriormente mencionada puede ser un abultamiento (además de la secuencia complementaria para la secuencia destinataria, que contiene una secuencia extra de 1 base, o varias bases [por ejemplo, aproximadamente 4 bases], en el centro). El «centro» anteriormente mencionado de la secuencia complementaria anteriormente mencionada no está particularmente limitado siempre y cuando sea diferente de la base en el extremo de la secuencia complementaria anteriormente mencionada. En la figura 3 se muestra esquemáticamente un ejemplo de discordancia junto con un ejemplo de concordancia completa. La figura 3(a) es un esquema en el que se muestra un ejemplo de concordancia total, la figura 3(b) es un esquema en el que se muestra un ejemplo del abultamiento anteriormente mencionado, y la figura 3(c) es un esquema en el que se muestra un ejemplo de la secuencia complementaria anteriormente mencionada que tiene una discordancia de 1 base, o de varias bases, en el centro de la misma. En cada una de las figuras 3(a) a (c), la cadena blanca de la parte inferior muestra una secuencia destinataria (todo o parte del micro-ARN), y la cadena negra de la parte superior muestra la secuencia complementaria anteriormente mencionada. Los ejemplos de la discordancia de la figura 3(b) y (c) (en concreto, figura 3(c)) a veces se denominan de tipo burbuja y similares. Como alternativa, el ejemplo de la concordancia total de la figura 3(a) a veces se denomina de tipo 'perfecto', el ejemplo de la figura 3(b) a veces se denomina de tipo 'abultamiento', y el ejemplo de la figura 3(c) a veces se denomina de tipo 'burbuja'.

El inhibidor de micro-ARN se puede producir mediante, por ejemplo, la síntesis química, tal y como se muestra a continuación.

55 El método de síntesis química anteriormente mencionado no está particularmente limitado y los ejemplos del mismo incluyen el método de fosforamiditas, el método de H-fosfonato y similares. En el método de síntesis química anteriormente mencionado, por ejemplo, se puede utilizar un sintetizador de ácidos nucleicos automático disponible en el mercado. En el método de síntesis química anteriormente mencionado, se puede utilizar una amidita. La amidita anteriormente mencionada no está particularmente limitada y los ejemplos de amiditas disponibles en el mercado incluyen fosforamiditas de ARN (2'-O-TBDMSi, nombre comercial, Samchully Pharm Co., Ltd.), amidita de ACE, amidita de TOM, amidita de CEE, amidita de CEM, amidita de

TEM y similares. El inhibidor de micro-ARN preferiblemente utiliza, por ejemplo, en la síntesis del resto aminoacídico anteriormente mencionado, el monómero mencionado más adelante de la presente invención.

En el inhibidor de micro-ARN, el resto conector anteriormente mencionado está representado por, por ejemplo, la siguiente fórmula química (I-0)



(I - 0)

5

en la fórmula química (I-0) anteriormente mencionada,

Q¹¹ y Q¹² son cada una de manera independiente un enlace simple, CH₂ (un grupo metileno), NH (un grupo imino), C=O (un grupo carbonilo), C=S (un grupo tiocarbonilo), C=NH (un grupo iminometileno), O o S,

10 Q¹ y Q² son cada una de manera independiente un enlace simple, CH₂ (un grupo metileno), NH (un grupo imino), C=O (un grupo carbonilo), C=S (un grupo tiocarbonilo), C=NH (un grupo iminometileno), O o S,

Y¹ e Y² son cada una de manera independiente un enlace simple, CH₂, NH, O o S;

L¹ es una cadena de alquileo que tiene n átomos de carbono, y un átomo de hidrógeno en un átomo de carbono alquilénico puede estar, o podría no estarlo, sustituido con OH, OR^a, NH₂, NHR^a, NR^aR^b, SH o SR^a, o,

15 L¹ es una cadena de poliéter obtenida por la sustitución de al menos un átomo de carbono en la cadena de alquileo anteriormente mencionada con un átomo de oxígeno,

siempre que: cuando Y¹ es NH, O o S, un átomo unido a Y¹ en L¹ es carbono, un átomo unido a OR¹ en L¹ es carbono, y los átomos de oxígeno no están adyacentes los unos a los otros;

L² es una cadena de alquileo que tiene m átomos de carbono, y un átomo de hidrógeno en un átomo de carbono alquilénico puede estar, o podría no estarlo, sustituido con OH, OR^c, NH₂, NHR^c, NR^cR^d, SH o SR^c, o

20 L² es una cadena de poliéter obtenida por sustitución de al menos un átomo de carbono en la cadena de alquileo anteriormente mencionada con un átomo de oxígeno,

siempre que: cuando Y² es NH, O o S, un átomo unido a Y² en L² es carbono, un átomo unido a OR² en L² es carbono, y los átomos de oxígeno no están adyacentes los unos a los otros;

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

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

n es un entero en el margen de 0 a 30;

una secuencia complementaria a la secuencia del micro-ARN anteriormente mencionado está unida al resto conector anteriormente mencionado a través de -OR¹- o bien de -OR²-,

30 cuando el resto conector anteriormente mencionado está presente entre las secuencias complementarias del micro-ARN anteriormente mencionado, R¹ y R² pueden o no pueden estar presentes, y cuando están presentes, R¹ y R² son cada uno de manera independiente un resto nucleotídico o la estructura (I-0) anteriormente mencionada;

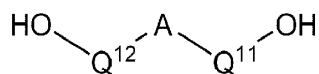
35 cuando el resto conector anteriormente mencionado está presente en la porción terminal de la secuencia complementaria del micro-ARN anteriormente mencionado presente en el extremo, R¹ y R² son cada uno de manera independiente H, un grupo protector o un grupo protector con fosfato; y

A es cualquier grupo atómico.

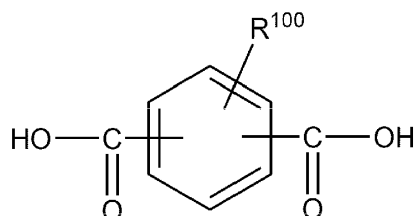
40 En la fórmula química (I-0) anteriormente mencionada, por ejemplo, Q¹¹ puede ser C=O (un grupo carbonilo) y Q¹ puede ser NH (un grupo imino). Además, por ejemplo, Q¹¹ puede ser NH (un grupo imino) y Q¹ puede ser C=O (un grupo carbonilo). Además, por ejemplo, Q¹² puede ser C=O (un grupo carbonilo) y Q² puede ser NH (un grupo imino). Además, por ejemplo, Q¹² puede ser NH (un grupo imino) y Q² puede ser C=O (un grupo carbonilo).

En la fórmula química (I-0) anteriormente mencionada, cada uno de Q¹¹ y Q¹² puede ser, por ejemplo, un grupo carbonilo. En este caso, cada uno de Q¹ y Q² es preferiblemente un grupo imino. Además, en este caso, la

estructura de la siguiente fórmula química (I α) está representada más preferiblemente por la siguiente fórmula química (I α 2).



(I α)

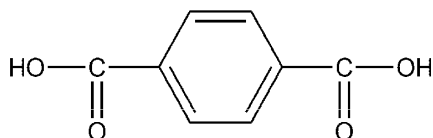


(I α 2)

5 En la fórmula química (I α 2) anteriormente mencionada,

R¹⁰⁰ es cualquier sustituyente, que puede estar presente o podría no estarlo. Cuando está presente, puede estar presente una única vez o varias veces. Cuando está presente muchas veces, puede ser el mismo o diferentes los unos de los otros. Ejemplos de cualquiera de los sustituyentes anteriormente mencionados para R¹⁰⁰ incluyen los sustituyentes mencionados a continuación ejemplificados como los R^a, R^b, R^c y R^d anteriormente mencionados. Ejemplos más específicos de los mismos incluyen halógeno, hidroxilo, alcoxi, amino, carboxi, sulfo, nitro, carbamoilo, sulfamoilo, alquilo, alquenoilo, alquinoilo, haloalquilo, arilo, arilalquilo, alquilarilo, cicloalquilo, cicloalquenoilo, cicloalquilalquilo, ciclilalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, aminoalquilo, sililo, siloxialquilo, pirrolilo, imidazolilo y similares. La estructura de la fórmula química (I α 2) anteriormente mencionada está representada más preferiblemente por la siguiente fórmula química (I α 3).

10



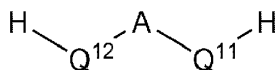
(I α 3)

15

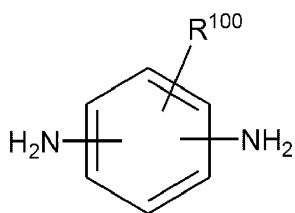
Cuando Q¹¹ y Q¹² son grupos carbonilo, y Q¹ y Q² son grupos imino, el resto conector de la fórmula química (I-0) anteriormente mencionada puede ser un resto amida de ácido carboxílico o un resto de ácido carboxílico. Por ejemplo, la estructura «TPA» en el ejemplo mencionado más adelante puede ser un resto de tereftalamida o un resto de ácido tereftálico representado por la fórmula química (I α 3) anteriormente mencionada.

20

En la fórmula química (I-0) anteriormente mencionada, cada uno de Q¹¹ y Q¹² puede ser un grupo imino. En este caso, cada uno de Q¹ y Q² es preferiblemente un grupo carbonilo. En este caso, la estructura de la fórmula química (I β) siguiente está representada más preferiblemente por la siguiente fórmula química (I β 2).



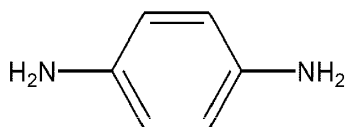
(I β)



(I β 2)

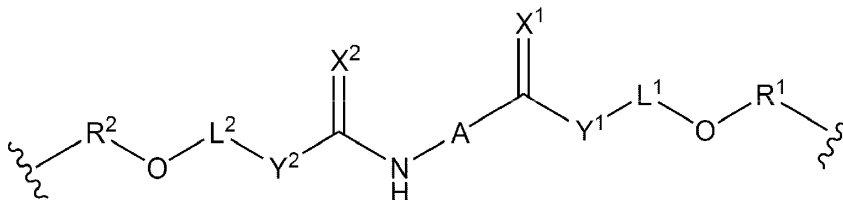
En la fórmula química (Iβ2) anteriormente mencionada,

5 R¹⁰⁰ es cualquier sustituyente, que puede estar presente o podría no estarlo. Cuando está presente, puede estar presente una sola vez o muchas veces. Cuando está presente muchas veces, pueden ser el mismo o diferentes los unos de los otros. Específicamente, por ejemplo, es lo mismo que R¹⁰⁰ en la fórmula química (Iα2) anteriormente mencionada. Además, la estructura de la fórmula química (Iβ2) anteriormente mencionada está representada más preferiblemente por la siguiente fórmula química (Iβ3).



(I β 3)

10 En el inhibidor de micro-ARN, cuando el resto conector anteriormente mencionado es un resto aminoacídico, el resto aminoacídico anteriormente mencionado está representado mediante, por ejemplo, la fórmula química (I) que viene a continuación. La estructura de la fórmula química (I) que viene a continuación es un ejemplo de la estructura representada por la fórmula química (I-0) anteriormente mencionada.



(I)

15 En la fórmula química (I) anteriormente mencionada, por ejemplo, X¹ y X² son cada uno de manera independiente H₂, O, S o NH;

Y¹ e Y² son cada uno de manera independiente un enlace simple, CH₂, NH, O o S;

L¹ es una cadena de alquileo que tiene n átomos de carbono, y un átomo de hidrógeno en un átomo de carbono alquilénico puede estar, o podría no estarlo, sustituido con OH, OR^a, NH₂, NHR^a, NR^aR^b, SH o SR^a, o,

20 L¹ es una cadena de poliéter obtenida por sustitución de al menos un átomo de carbono en la cadena de alquileo anteriormente mencionada con un átomo de oxígeno,

siempre que: cuando Y¹ es NH, O o S, un átomo unido a Y¹ en L¹ es carbono, un átomo unido a OR¹ en L¹ es carbono, y los átomos de oxígeno no están adyacentes los unos a los otros;

L² es una cadena de alquileo que tiene m átomos de carbono, y un átomo de hidrógeno en un átomo de carbono alquilénico puede estar, o puede no estarlo, sustituido con OH, OR^c, NH₂, NHR^c, NR^cR^d, SH o SR^c, o,

25 L² es una cadena de poliéter obtenida por sustitución de al menos un átomo de carbono en la cadena de alquileo anteriormente mencionada con un átomo de oxígeno,

siempre que: cuando Y² es NH, O o S, un átomo unido a Y² en L² es carbono, un átomo unido a OR² en L² es

carbono, y los átomos de oxígeno no están adyacentes los unos a los otros;

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

m es un entero en el margen de 0 a 30;

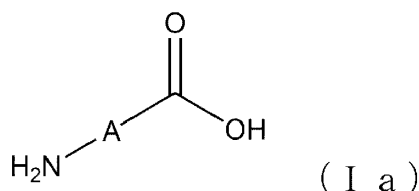
n es un entero en el margen de 0 a 30;

5 la secuencia complementaria a la secuencia del micro-ARN anteriormente mencionado está cada una unida al resto aminoacídico anteriormente mencionado a través de -OR¹- u -OR²-,

10 cuando el resto aminoacídico anteriormente mencionado está presente entre las secuencias complementarias del micro-ARN anteriormente mencionado, R¹ y R² pueden estar presentes o podrían no estarlo, y cuando están presentes, R¹ y R² son cada uno de manera independiente un resto nucleotídico o la estructura anteriormente mencionada (I);

cuando el resto aminoacídico anteriormente mencionado está presente en la porción terminal de la secuencia complementaria al micro-ARN anteriormente mencionado presente en el extremo, R¹ y R² son cada uno de manera independiente H, un grupo protector o un grupo protector con fosfato; y

A es cualquier grupo atómico, la fórmula química (Ia) siguiente es un aminoácido o péptido.



15 En la fórmula química (I) anteriormente mencionada, por ejemplo, X¹ y X² son cada uno de manera independiente H₂, O, S o NH. En la fórmula química (I) anteriormente mencionada, «X¹ es H₂» significa que X¹ forma CH₂ (un grupo metileno) junto con un átomo de carbono al cual está unido X¹. Lo mismo se aplica a X².

20 En la fórmula química (I) anteriormente mencionada, Y¹ e Y² son cada uno de manera independiente un enlace simple, CH₂, NH, O o S.

25 En las fórmulas químicas (I-0) e (I) anteriormente mencionadas, L¹ es una cadena de alquileo que tiene n átomos de carbono. Uno o varios átomos de hidrógeno sobre los átomos de carbono del alquileo anteriormente mencionados pueden estar, o podrían no estarlo, sustituidos con, por ejemplo, OH, OR^a, NH₂, NHR^a, NR^aR^b, SH o SR^a. Como alternativa, L¹ puede ser una cadena de poliéter obtenida por sustitución de al menos un átomo de carbono en la cadena de alquileo anteriormente mencionada con un átomo de oxígeno. La cadena de poliéter anteriormente mencionada es, por ejemplo, polietilenglicol. Cuando Y¹ es NH, O o S, un átomo unido a Y¹ en L¹ es carbono, un átomo unido a OR¹ en L¹ es carbono, y los átomos de oxígeno no están adyacentes los unos a los otros. Es decir, por ejemplo, cuando Y¹ es O, este átomo de oxígeno y el átomo de oxígeno en L¹ no están adyacentes el uno al otro, y el átomo de oxígeno en OR¹ y el átomo de oxígeno en L¹ no están adyacentes el uno al otro.

35 En las fórmulas químicas (I-0) y (I) anteriormente mencionadas, L² es una cadena de alquileo que tiene m átomos de carbono. Uno o varios átomos de hidrógeno sobre los átomos de carbono del alquileo anteriormente mencionado pueden estar, o pueden no estarlo, sustituidos con, por ejemplo, OH, OR^c, NH₂, NHR^c, NR^cR^d, SH o SR^c. Como alternativa, L² puede ser una cadena de poliéter obtenida por sustitución de al menos un átomo de carbono en la cadena de alquileo anteriormente mencionada con un átomo de oxígeno. Cuando Y² es NH, O o S, un átomo unido a Y² en L² es carbono, un átomo unido a OR² en L² es carbono, y los átomos de oxígeno no están adyacentes los unos a los otros. Es decir, por ejemplo, cuando Y² es O, este átomo de oxígeno y el átomo de oxígeno en L² no están adyacentes el uno al otro, y el átomo de oxígeno en OR² y el átomo de oxígeno en L² no están adyacentes el uno al otro.

40 El entero n de L¹ y el entero m de L² no están particularmente limitados y el límite inferior de cada uno de ellos puede ser 0, por ejemplo, y el límite superior de los mismos no está particularmente limitado. Por ejemplo, n y m pueden establecerse como sea apropiado según una longitud deseada del resto aminoacídico anteriormente mencionado. Por ejemplo, desde el punto de vista del coste de fabricación, rendimiento y similares, n y m son cada uno preferiblemente de 0 a 30, más preferiblemente de 0 a 20 y aún más preferiblemente de 0 a 15. n y m pueden ser iguales (n = m) o diferentes. El rango de n + m es, por ejemplo, de 0 a 30, preferiblemente de 0 a 20 y más preferiblemente de 0 a 15.

45 Por ejemplo, R^a, R^b, R^c y R^d son cada uno de manera independiente un sustituyente o un grupo protector y pueden ser iguales o diferentes. Ejemplos de sustituyente anteriormente mencionado incluyen hidroxilo, carboxilo,

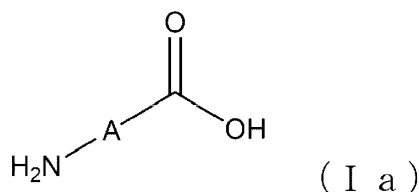
5 sulfuro, halógeno, haluro de alquilo (haloalquilo, p. ej., CF_3 , CH_2CF_3 , CH_2CCl_3), nitro, nitroso, ciano, alquilo (p. ej., metilo, etilo, isopropilo, *tert*-butilo), alqueno (p. ej., vinilo), alquino (p. ej., etinilo), cicloalquilo (p. ej., ciclopropilo, adamantilo), cicloalquilalquilo (p. ej., ciclohexilmetilo, adamantilmetilo), cicloalqueno (p. ej., ciclopropeno), ciclilalquilo, hidroxialquilo (p. ej., hidroximetilo, hidroxietilo), alcoxialquilo (p. ej., metoximetilo, etoximetilo, etoxietilo), arilo (p. ej., fenilo, naftilo), arilalquilo (p. ej., bencilo, fenetilo), alquilarilo (p. ej., *p*-metilfenilo), heteroarilo (p. ej., piridilo, furilo), heteroarilalquilo (p. ej., piridilmetilo), heterociclilo (p. ej., piperidilo), heterociclilalqueno, heterociclilalquilo (p. ej., morfollilmetilo), alcoxi (p. ej., metoxi, etoxi, propoxi, butoxi), alcoxi halogenado (p. ej., OCF_3), alquenoiloxi (p. ej., viniloxi, aliloxi), ariloxi (p. ej., feniloxi), alquiloxycarbonilo (p. ej., metoxycarbonilo, etoxycarbonilo, *tert*-butoxycarbonilo), arilalquiloxi (p. ej., benciloxi), amino [alquilamino (p. ej., metilamino, etilamino, dimetilamino), acilamino (p. ej., acetilamino, benzoilamino), arilalquilamino (p. ej., bencilamino, tritilamino), hidroxiamino], aminoalquilo (p. ej., aminometilo), alquilaminoalquilo (p. ej., dietilaminometilo), carbamoilo, sulfamoilo, oxo, sililo, sililoxialquilo y similares. Estos sustituyentes están optativamente sustituidos por uno o varios sustituyentes o más grupos protectores. Mientras que el sustituyente anteriormente mencionado no está particularmente limitado, puede ser, por ejemplo, un sustituyente ejemplificado más arriba. El otro grupo protector anteriormente mencionado no está particularmente limitado y puede ser, por ejemplo, un grupo protector ejemplificado más abajo. Lo mismo se aplica de aquí en adelante.

20 El grupo protector anteriormente mencionado (o el otro grupo protector anteriormente mencionado) es un grupo funcional que inactiva, por ejemplo, un grupo funcional muy reactivo. Los ejemplos de grupo protector incluyen grupos protectores conocidos. Con respecto al grupo protector anteriormente mencionado, se puede mencionar, por ejemplo, la descripción en la bibliografía (J. F. W. McOmie, «Protecting Groups in Organic Chemistry», Plenum Press, Londres y Nueva York, 1973). El grupo protector anteriormente mencionado no está particularmente limitado y los ejemplos del mismo incluyen un grupo *tert*-butildimetilsililo (TBDMS), un grupo bis(2-acetoxietiloxi)metilo (ACE), un grupo triisopropilsililoximetilo (TOM), un grupo 1-(2-cianoetoxi)etilo (CEE), un grupo 2-cianoetoximetilo (CEM), un grupo toilsulfoniletoximetilo (TEM) y un grupo dimetoxitritilo (DMTr). Otros ejemplos de grupo protector incluyen grupos que contienen sililo representados por las fórmulas químicas (P1) y (P2) que se mostrarán más adelante. Lo mismo se aplica de aquí en adelante.

En las fórmulas químicas (I-0) y (I) anteriormente mencionadas, hay átomos de hidrógeno que pueden estar sustituidos de manera independiente cada uno con, por ejemplo, un halógeno, tal como F, Cl, Br o I.

30 En el inhibidor de micro-ARN, la secuencia complementaria anteriormente mencionada está cada una fijada al resto conector anteriormente mencionado (p. ej., resto aminoácido) mediante, por ejemplo, $-\text{OR}^1-$ u $-\text{OR}^2-$. R^1 y R^2 pueden estar presentes o podrían no estarlo. Cuando R^1 y R^2 están presentes, R^1 y R^2 pueden ser cada uno de manera independiente un resto nucleotídico o la estructura representada por las fórmulas químicas (I-0) o (I) anteriormente mencionadas. Cuando R^1 y/o R^2 son/es el resto nucleotídico anteriormente mencionado, el resto conector anteriormente mencionado (p. ej., resto aminoácido) está compuesto por, por ejemplo, el resto no nucleotídico anteriormente mencionado que tiene la estructura de la fórmula química (I-0) o (I) anteriormente mencionada, excluido el resto nucleotídico R^1 y/o R^2 y los restos nucleotídicos anteriormente mencionados. Cuando R^1 y/o R^2 son/es la estructura representada por la fórmula química (I-0) o (I) anteriormente mencionada, la estructura del resto conector anteriormente mencionado (p. ej., resto aminoácido) es tal que, por ejemplo, están unidos los unos a los otros dos o más de los restos no nucleotídicos anteriormente mencionados que tienen la estructura de la fórmula química (I-0) o (I) anteriormente mencionada. El número de estructuras de la fórmula química (I-0) o (I) anteriormente mencionada puede ser, p. ej., 1, 2, 3 o 4. Cuando el resto conector (p. ej., resto aminoácido) incluye numerosas estructuras de las anteriormente mencionadas, las estructuras de la fórmula química (I-0) o (I) anteriormente mencionada pueden estar unidas, por ejemplo, bien directamente o mediante el resto o restos nucleotídicos anteriormente mencionados. Por otra parte, cuando R^1 y R^2 no están presentes, el resto conector anteriormente mencionado (p. ej., resto aminoácido) está compuesto únicamente por, por ejemplo, el resto no nucleotídico anteriormente mencionado que tiene la estructura de la fórmula química (I-0) o (I) anteriormente mencionada.

50 El grupo atómico A en la fórmula química (I) anteriormente mencionada no está particularmente limitado y se elige arbitrariamente; no obstante, la fórmula química (Ia) siguiente muestra un aminoácido o un péptido, tal y como se menciona más arriba.



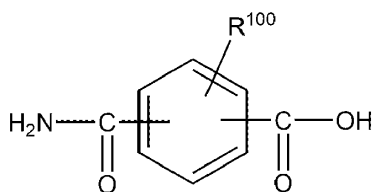
55 El grupo atómico A en la fórmula química (I), (IA) o (Ia) anteriormente mencionada puede contener, o puede que no contenga, por ejemplo, al menos uno seleccionado del grupo que consiste en el grupo atómico de la cadena, grupo atómico alicíclico, grupo atómico aromático, grupo atómico heteroaromático y grupo atómico heteroalíclico. Mientras que el grupo atómico de cadena anteriormente mencionado no está particularmente

5 limitado, se pueden mencionar, por ejemplo, alquilo, alqueno, alquino, haloalquilo, hidroxialquilo, alcóxialquilo, aminoalquilo, sililo, sililoxialquilo y similares. Mientras que el grupo atómico alicíclico anteriormente mencionado no está particularmente limitado, se pueden mencionar, por ejemplo, cicloalquilo, cicloalqueno, cicloalquilalquilo, cicloalquino y similares. Mientras que el grupo atómico aromático no está particularmente limitado, se pueden mencionar, por ejemplo, arilo, arilalquilo, alquilarilo, arilo de anillo condensado, arilalquilo de anillo condensado, alquilarilo de anillo condensado y similares. El grupo atómico heteroaromático anteriormente mencionado no está particularmente limitado y los ejemplos del mismo incluyen heteroarilo, heteroarilalquilo, alquilheteroarilo, heteroarilo cíclico condensado, heteroarilalquilo cíclico condensado, alquilheteroarilo cíclico condensado, y similares. En el grupo atómico A en la fórmula química (I), (IA) o (Ia) anteriormente mencionada, cada uno de los grupos atómicos anteriormente mencionados pueden tener, o pueden no tenerlo, otro sustituyente o un grupo protector. Cuando el sustituyente o el grupo protector anteriormente mencionado aparecen muchas veces, pueden ser iguales o diferentes. Los sustituyentes anteriormente mencionados son, por ejemplo, los ejemplificados para los R^a, R^b, R^c y R^d anteriormente mencionados, más específicamente, por ejemplo, halógeno, hidroxilo, alcoxi, amino, carboxi, sulfo, nitro, carbamoilo, sulfamoilo, alquilo, alqueno, alquino, haloalquilo, arilo, arilalquilo, alquilarilo, cicloalquilo, cicloalqueno, cicloalquilalquilo, cicloalquino, hidroxialquilo, alcóxialquilo, aminoalquilo, sililo, sililoxialquilo, pirrolilo, imidazolilo, y similares. Los grupos protectores anteriormente mencionados son, por ejemplo, los mismos que los ejemplificados para los R^a, R^b, R^c y R^d anteriormente mencionados.

20 El «aminoácido» se refiere a cualquier compuesto orgánico que contiene al menos un grupo amino y al menos un grupo carboxi en una molécula, tal y como se menciona más arriba. El «grupo amino» anteriormente mencionado no se limita a un grupo -NH₂ y también incluye un grupo imino (-NH-). Por ejemplo, la prolina, la hidroxiprolina y similares no contienen un grupo -NH₂ en una molécula, sino que contienen un grupo imino (-NH-) y están incluidos en la definición del «aminoácido». El «aminoácido» anteriormente mencionado puede ser, tal y como se menciona a continuación, un aminoácido natural o un aminoácido artificial. Por ejemplo, un compuesto representado por la fórmula química (Ia2) o (Ia3) mencionada a continuación también contiene un grupo amino y un grupo carboxi en la molécula y, por lo tanto, queda incluida en la definición del «aminoácido». Por lo tanto, por ejemplo, la estructura de la fórmula química (I) anteriormente mencionada, en donde el grupo atómico A se representa mediante la fórmula química (A2) o la fórmula química (A2a) que se mencionan a continuación, queda incluida en la definición del «resto aminoacídico». Además, por ejemplo, la estructura del «TPA» en el ejemplo mencionado más adelante también está incluida en la definición de «resto aminoacídico». Además, el «péptido» se refiere a un compuesto orgánico que tiene una estructura en donde no menos de 2 moléculas de aminoácidos están unidas mediante un enlace peptídico. El enlace peptídico anteriormente mencionado puede ser una estructura de una amida ácida o una estructura de imida ácida. Cuando están presentes varios grupos amino en el aminoácido o en la molécula peptídica representada por la fórmula química (Ia) anteriormente mencionada, el grupo amino mostrado con claridad en la fórmula química (Ia) anteriormente mencionada puede ser cualquier grupo amino. Además, cuando están presentes varios grupos carboxi en la molécula aminoacídica o peptídica representada por la fórmula química (Ia) anteriormente mencionada, el grupo carboxi mostrado con claridad en la fórmula química (Ia) anteriormente mencionada puede ser cualquier grupo carboxi.

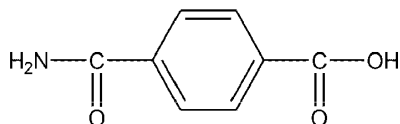
40 En el resto aminoacídico anteriormente mencionado del inhibidor de micro-ARN, el aminoácido anteriormente mencionado podría ser, por ejemplo, tal y como se menciona más arriba, un aminoácido natural o un aminoácido artificial. El «aminoácido natural» se refiere a un aminoácido que tiene una estructura que se produce de forma natural o un isómero óptico del mismo. El método de producción del aminoácido natural anteriormente mencionado no está particularmente limitado y, por ejemplo, se puede extraer de la naturaleza o se puede sintetizar. Además, el «aminoácido artificial» se refiere a un aminoácido que tiene una estructura que no se produce de forma natural. Es decir, el aminoácido artificial anteriormente mencionado es un aminoácido, a saber, un derivado de ácido carboxílico que contiene un grupo amino (compuesto orgánico que contiene al menos un grupo amino y al menos un grupo carboxi en una molécula) y que tiene una estructura que no se produce de forma natural. El aminoácido artificial anteriormente mencionado no contiene preferiblemente, por ejemplo, un heterociclo. El aminoácido anteriormente mencionado puede ser un aminoácido que forma parte de, por ejemplo, una proteína. El aminoácido anteriormente mencionado puede ser, por ejemplo, al menos una clase seleccionada del grupo que consiste en glicina, α-alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, cistina, glutamina, ácido glutámico, histidina, isoleucina, leucina, lisina, hidroxilisina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, tirosina, valina, prolina, 4-hidroxiprolina, triptófano, β-alanina, 1-amino-2-carboxiciclopentano, ácido aminobenzoico, ácido aminopirididincarboxílico y aminoácido representado por la siguiente fórmula química (Ia2), y puede tener, o puede no tener, además un sustituyente o un grupo protector. Los ejemplos de sustituyentes anteriormente mencionados incluyen los sustituyentes ejemplificados para los R^a, R^b, R^c y R^d anteriormente mencionados. Más específicamente, se pueden mencionar, por ejemplo, halógeno, hidroxilo, alcoxi, amino, carboxi, sulfo, nitro, carbamoilo, sulfamoilo, alquilo, alqueno, alquino, haloalquilo, arilo, arilalquilo, alquilarilo, cicloalquilo, cicloalqueno, cicloalquilalquilo, cicloalquino, hidroxialquilo, alcóxialquilo, aminoalquilo, sililo, sililoxialquilo, pirrolilo, imidazolilo y similares. El grupo protector anteriormente mencionado es el mismo que, por ejemplo, los grupos protectores ejemplificados para los R^a, R^b, R^c y R^d anteriormente mencionados. Cuando el aminoácido de la fórmula química (Ia) anteriormente mencionada, que no es un péptido, contiene isómeros tales como isómero óptico, isómero

geométrico, estereoisómero y similares, se puede utilizar cualquier isómero.



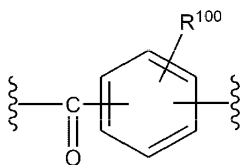
(I a 2)

5 En la fórmula química (Ia2) anteriormente mencionada, R^{100} es cualquier sustituyente, y puede estar presente o puede no estarlo. Cuando está presente, puede ser uno solo o varios. Cuando está presente varias veces, pueden ser iguales o diferentes los unos de los otros. Los ejemplos de cualquier sustituyente anteriormente mencionado para R^{100} incluyen los ejemplificados como los R^a , R^b , R^c y R^d anteriormente mencionados. Los ejemplos más específicos de los mismos incluyen halógeno, hidroxilo, alcoxi, amino, carboxi, sulfo, nitro, carbamoilo, sulfamoilo, alquilo, alqueno, alquino, haloalquilo, arilo, arilalquilo, alquilarilo, cicloalquilo, cicloalqueno, cicloalquilalquilo, ciclilalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, aminoalquilo, sililo, sililoxialquilo, pirrolilo, imidazolilo y similares. Además, la estructura de la fórmula química (Ia2) anteriormente mencionada puede ser, por ejemplo, la fórmula química (Ia3) que viene a continuación.



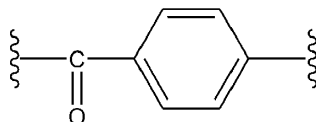
(I a 3)

15 Cuando la estructura de la fórmula química (Ia) anteriormente mencionada es la fórmula química (Ia2) anteriormente mencionada, la estructura del grupo atómico A en la fórmula química (I) anteriormente mencionada está representada por la fórmula química (A2) que viene a continuación. R^{100} en la fórmula química (A2) que viene a continuación es el mismo que R^{100} en la fórmula química (Ia2) anteriormente mencionada. Además, cuando la estructura de la fórmula química (Ia) anteriormente mencionada es la fórmula química (Ia3) anteriormente mencionada, la estructura del grupo atómico A en la fórmula química (I) anteriormente mencionada está representada por la fórmula química (A2a) que viene a continuación.



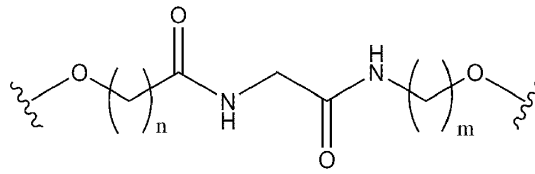
(A 2)

20

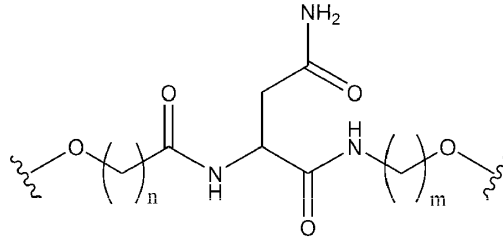


(A 2 a)

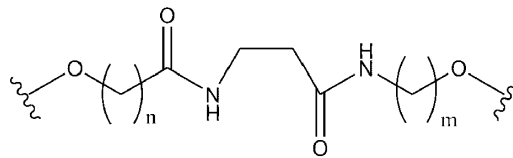
Los ejemplos de la estructura de la fórmula química (I) anteriormente mencionada incluyen las fórmulas químicas (I-1) a (I-6) que vienen a continuación. En las fórmulas químicas (I-1) a (I-6) siguientes, n y m son lo mismo que en la fórmula química (I) anteriormente mencionada.



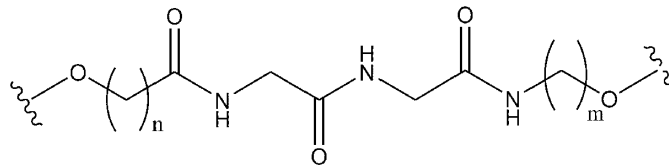
(I - 1)



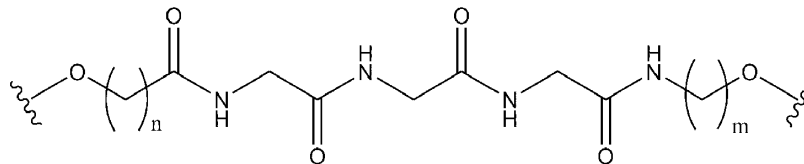
(I - 2)



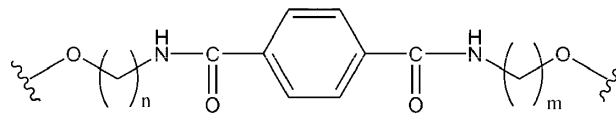
(I - 3)



(I - 4)



(I - 5)

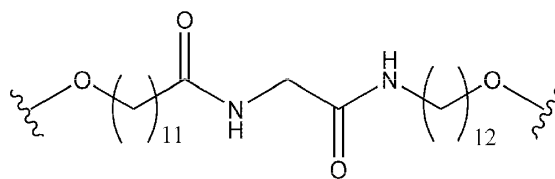


(I - 6)

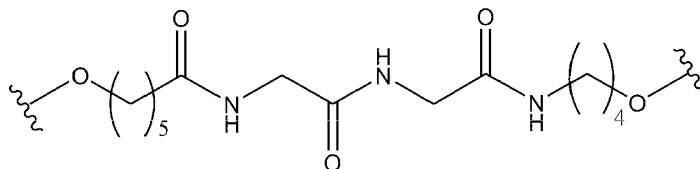
5

10

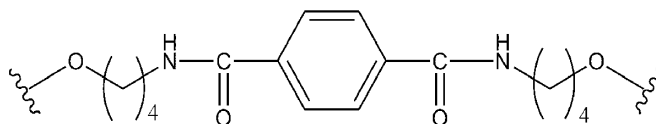
En las fórmulas químicas (I-1) a (I-6) anteriormente mencionadas, n y m no están particularmente limitados y son tal y como se describen más arriba. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen n = 11 y m = 12 en la fórmula química (I-1) anteriormente mencionada, n = 5 y m = 4 en la fórmula química (I-4) anteriormente mencionada, y n = 4 y m = 4 en la fórmula química (I-6) anteriormente mencionada. Las estructuras se muestran mediante las fórmulas químicas (I-1a), (I-4a) y (I-6a) que vienen a continuación.



(I - 1 a)



(I - 4 a)



(I - 6 a)

5 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «alquilo» incluye, por ejemplo, grupo alquilo lineal o ramificado. El número de carbonos del alquilo anteriormente mencionado no está particularmente limitado y, por ejemplo, es 1-30, preferiblemente 1-6, más preferiblemente 1-4. Los ejemplos del grupo alquilo anteriormente mencionado incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, *sec*-butilo y *tert*-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, isohexilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo, n-decilo y similares. Preferiblemente, se pueden mencionar, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *tert*-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, isohexilo y similares.

15 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «alqueno» incluye, por ejemplo, alqueno lineal o ramificado. El alqueno anteriormente mencionado es, por ejemplo, el alquilo anteriormente mencionado que contiene uno o varios enlaces dobles y similares. El número de carbonos del alqueno anteriormente mencionado no está particularmente limitado y, por ejemplo, es el mismo que para el alquilo anteriormente mencionado y preferiblemente 2-8. Los ejemplos del alqueno anteriormente mencionado incluyen vinilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 1,3-butadienilo, 3-metil-2-butenilo y similares.

20 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «alquino» incluye, por ejemplo, un alquino lineal o ramificado. El alquino anteriormente mencionado es, por ejemplo, el alquilo anteriormente mencionado que contiene uno o varios triples enlaces y similares. El número de carbonos del alquino anteriormente mencionado no está particularmente limitado y, por ejemplo, es el mismo que para el alquilo anteriormente mencionado y preferiblemente 2-8. Los ejemplos del alquino anteriormente mencionado incluyen etinilo, propinilo, butinilo y similares. El alquino anteriormente mencionado puede además tener, por ejemplo, uno o varios dobles enlaces.

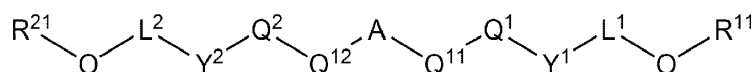
25 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «arilo» incluye, por ejemplo, un grupo hidrocarburo aromático monocíclico y un grupo hidrocarburo aromático policíclico. Los ejemplos del grupo hidrocarburo aromático monocíclico anteriormente mencionado incluyen fenilo y similares. Los ejemplos del grupo hidrocarburo aromático policíclico anteriormente mencionado incluyen 1-naftilo, 2-naftilo, 1-antrilo, 2-antrilo, 9-antrilo, 1-fenantrilo, 2-fenantrilo, 3-fenantrilo, 4-fenantrilo, 9-fenantrilo y similares. Preferiblemente, por ejemplo, se pueden mencionar fenilo, naftilo, tal como 1-naftilo y 2-naftilo, y similares.

30 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «heteroarilo» incluye, por ejemplo, un grupo heterocíclico aromático monocíclico y un grupo heterocíclico aromático fusionado. Los ejemplos del heteroarilo anteriormente mencionado incluyen furilo (p. ej., 2-furilo, 3-furilo), tienilo (p. ej., 2-tienilo, 3-tienilo), pirrolilo (p. ej., 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo), imidazolilo (p. ej., 1-imidazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo), pirazolilo (p. ej., 1-pirazolilo, 3-pirazolilo, 4-pirazolilo), triazolilo (p. ej., 1,2,4-triazol-1-ilo, 1,2,4-triazol-3-ilo, 1,2,4-triazol-4-ilo), tetrazolilo (p. ej., 1-tetrazolilo, 2-tetrazolilo, 5-tetrazolilo), oxazolilo (p. ej., 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 5-oxazolilo), isoxazolilo (p. ej., 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo), tiazolilo (p. ej., 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo), tiadiazolilo, isotiazolilo (p. ej., 3-isotiazolilo, 4-isotiazolilo, 5-isotiazolilo), piridilo (p. ej., 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo), piridazinilo (p. ej., 3-piridazinilo, 4-piridazinilo), pirimidinilo (p. ej., 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo),

- furazanilo (p. ej., 3-furazanilo), pirazinilo (p. ej., 2-pirazinilo), oxadiazolilo (p. ej., 1,3,4-oxadiazol-2-ilo), benzofurilo (p. ej., 2-benzo[b]furilo, 3-benzo[b]furilo, 4-benzo[b]furilo, 5-benzo[b]furilo, 6-benzo[b]furilo, 7-benzo[b]furilo), benzotienilo (p. ej., 2-benzo[b]tienilo, 3-benzo[b]tienilo, 4-benzo[b]tienilo, 5-benzo[b]tienilo, 6-benzo[b]tienilo, 7-benzo[b]tienilo), bencimidazolilo (p. ej., 1-bencimidazolilo, 2-bencimidazolilo, 4-bencimidazolilo, 5-bencimidazolilo), dibenzofurilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, quinoxalilo (p. ej., 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 6-quinoxalinilo), cinolinilo (p. ej., 3-cinolinilo, 4-cinolinilo, 5-cinolinilo, 6-cinolinilo, 7-cinolinilo, 8-cinolinilo), quinazolilo (p. ej., 2-quinazolinilo, 4-quinazolinilo, 5-quinazolinilo, 6-quinazolinilo, 7-quinazolinilo, 8-quinazolinilo), quinolilo (p. ej., 2-quinolilo, 3-quinolilo, 4-quinolilo, 5-quinolilo, 6-quinolilo, 7-quinolilo, 8-quinolilo), ftalazinilo (p. ej., 1-ftalazinilo, 5-ftalazinilo, 6-ftalazinilo), isoquinolilo (p. ej., 1-isoquinolilo, 3-isoquinolilo, 4-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 6-isoquinolilo, 7-isoquinolilo, 8-isoquinolilo), purilo, pteridinilo (p. ej., pteridinilo, 4-pteridinilo, 6-pteridinilo, 7-pteridinilo), carbazolilo, fenantridinilo, acridinilo (p. ej., 1-acridinilo, 2-acridinilo, 3-acridinilo, 4-acridinilo, 9-acridinilo), indolilo (p. ej., 1-indolilo, 2-indolilo, 3-indolilo, 4-indolilo, 5-indolilo, 6-indolilo, 7-indolilo), isoindolilo, fenazinilo (p. ej., 1-fenanzinilo, 2-fenazinilo) o fenotiazinilo (p. ej., 1-fenotiazinilo, 2-fenotiazinilo, 3-fenotiazinilo, 4-fenotiazinilo) y similares.
- 5 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «cicloalquilo» es, por ejemplo, un grupo hidrocarburo saturado cíclico y el número de carbonos es, por ejemplo, de 3 a 15. Los ejemplos del cicloalquilo anteriormente mencionado incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, grupo hidrocarburo cíclico con puente, grupo hidrocarburo espiro y similares, preferiblemente, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, grupo hidrocarburo cíclico con puente y similares.
- 10 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el «grupo hidrocarburo cíclico con puente» es, por ejemplo, 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, 2-adamantilo o similares.
- Tal y como se utiliza en la presente memoria, el «grupo hidrocarburo espiro» es, por ejemplo, espiro[3.4]octilo o similares.
- 25 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «cicloalqueno» incluye, por ejemplo, un grupo hidrocarburo alifático insaturado cíclico y el número de carbonos es, por ejemplo, de 3 a 7. Los ejemplos del cicloalqueno anteriormente mencionado incluyen ciclopropeno, ciclobuteno, ciclopenteno, ciclohexeno, ciclohepteno y similares, preferiblemente, ciclopropeno, ciclobuteno, ciclopenteno, ciclohexeno y similares. El cicloalqueno anteriormente mencionado incluye, por ejemplo, un grupo hidrocarburo cíclico con puente y un grupo hidrocarburo espiro que tiene un enlace insaturado en el anillo.
- 30 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «arilalquilo» es, por ejemplo, bencilo, 2-fenetilo, naftalenilmetilo o similares, «cicloalquilalquilo» o «cicilalquilo» es, por ejemplo, ciclohexilmetilo, adamantilmetilo o similares, e «hidroxialquilo» es, por ejemplo, hidroximetilo y 2-hidroxi-etilo, o similares.
- 35 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «alcoxi» incluye, por ejemplo, el grupo alquil-O- anteriormente mencionado y, por ejemplo, se pueden mencionar metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi y similares, y «alcoxialquilo» es, por ejemplo, metoximetilo o similares, y «aminoalquilo» es, por ejemplo, 2-aminoetil o similares.
- 40 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «heterociclilo» es, por ejemplo, 1-pirrolinilo, 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, 1-pirrolidinilo, 2-pirrolidinilo, 3-pirrolidinilo, pirrolidinona, 1-imidazolinilo, 2-imidazolinilo, 4-imidazolinilo, 1-imidazolidinilo, 2-imidazolidinilo, 4-imidazolidinilo, imidazolidinona, 1-pirazolinilo, 3-pirazolinilo, 4-pirazolinilo, 1-pirazolidinilo, 3-pirazolidinilo, 4-pirazolidinilo, piperidinona, piperidino, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-piperidinilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo, piperazinona, 2-morfolinilo, 3-morfolinilo, morfolino, tetrahidropirano, tetrahidrofuranilo o similares.
- 45 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «heterocicilalquilo» incluye, por ejemplo, piperidinilmetilo, piperazinilmetilo y similares, «heterocicilalqueno» incluye, por ejemplo, 2-piperidiniletlenilo y similares, y «heteroarilalquilo» incluye, por ejemplo, piridilmetilo, quinolín-3-ilmetilo y similares.
- 50 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «sililo» incluye un grupo representado por la fórmula química R_3Si- , en donde R se puede, de manera independiente, seleccionar de los anteriormente mencionados alquilo, arilo y cicloalquilo y, por ejemplo, se pueden mencionar un grupo trimetilsililo, un grupo *tert*-butildimetilsililo y similares. El «sililoxi» es, por ejemplo, un grupo trimetilsililoxi y similares, y «sililoxialquilo», por ejemplo, trimetilsililoximetilo o similares.
- Tal y como se utiliza en la presente memoria, «alquileo» es, por ejemplo, metileno, etileno, propileno o similares.
- 55 Los diferentes grupos anteriormente mencionados están optativamente sustituidos. Los ejemplos del sustituyente anteriormente mencionado incluyen hidroxilo, carboxilo, sulfuro, halógeno, haluro de alquilo (haloalquilo, p. ej., CF_3 , CH_2CF_3 , CH_2CCl_3), nitro, nitroso, ciano, alquilo (p. ej., metilo, etilo, isopropilo, *tert*-butilo), alqueno

(p. ej., vinilo), alquinilo (p. ej., etinilo), cicloalquilo (p. ej., ciclopropilo, adamantilo), cicloalquilalquilo (p. ej., ciclohexilmetilo, adamantilmetilo), cicloalquenilo (p. ej., ciclopropenilo), ciclilalquilo, hidroxialquilo (p. ej., hidroximetilo, hidroxietilo), alcoxialquilo (p. ej., metoximetilo, etoximetilo, etoxietilo), arilo (p. ej., fenilo, naftilo), arilalquilo (p. ej., bencilo, fenetilo), alquilarilo (p. ej., p-metilfenilo), heteroarilo (p. ej., piridilo, furilo), heteroarilalquilo (p. ej., piridilmetilo), heterocicliilo (p. ej., piperidilo), heterociclilalquenilo, heterociclilalquilo (p. ej., morfolilmetilo), alcoxi (p. ej., metoxi, etoxi, propoxi, butoxi), alcoxi halogenado (p. ej., OCF₃), alqueniloxi (p. ej., viniloxi, aliloxi), ariloxi (p. ej., feniloxi), alquilocarbonilo (p. ej., metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, *tert*-butoxicarbonilo), arilalquiloxi (p. ej., benciloxi), amino[alquilamino (p. ej., metilamino, etilamino, dimetilamino), acilamino (p. ej., acetilamino, benzoilamino), arilalquilamino (p. ej., bencilamino, tritilamino), hidroxiamino], aminoalquilo (p. ej., aminometilo), alquilaminoalquilo (p. ej., dietilaminometilo), carbamoilo, sulfamoilo, oxo, sililo, sililoxialquilo y similares.

Una molécula para la introducción del resto conector anteriormente mencionado (de aquí en adelante se denominará «monómero») tiene, opcionalmente, por ejemplo, la estructura de la fórmula química (II-0) que viene a continuación. A menos que se indique en particular, se puede citar la explicación en el resto conector representado mediante la fórmula química (I-0) anteriormente mencionada para que el monómero tenga la estructura de la siguiente fórmula química (II-0).



(I I - 0)

En la fórmula química (II-0) anteriormente mencionada,

Q¹¹ y Q¹² son cada uno de manera independiente un enlace simple, CH₂ (un grupo metileno), NH (un grupo imino), C=O (un grupo carbonilo), C=S (un grupo tiocarbonilo), C=NH (un grupo iminometileno), O o S,

Q¹ y Q² son cada uno de manera independiente un enlace simple, CH₂ (grupo metileno), NH (un grupo imino), C=O (un grupo carbonilo), C=S (un grupo tiocarbonilo), C=NH (un grupo iminometileno), O o S,

Y¹ e Y² son cada uno de manera independiente un enlace simple, CH₂, NH, O o S;

R¹¹ y R²¹ son cada uno de manera independiente H, un grupo protector o un grupo protector con fosfato;

L¹ es una cadena de alquileo que tiene n átomos de carbono, y un átomo de hidrógeno en un átomo de carbono alquilénico puede estar sustituido, o puede no estarlo, con OH, OR^a, NH₂, NHR^a, NR^aR^b, SH o SR^a, o

L¹ es una cadena de poliéter obtenida mediante la sustitución de al menos un átomo de carbono en la cadena de alquileo anteriormente mencionada con un átomo de oxígeno,

siempre que: cuando Y¹ es NH, O o S, un átomo unido a Y¹ en L¹ es carbono, un átomo unido a OR¹¹ en L¹ es carbono y los átomos de oxígeno no están adyacentes los unos a los otros;

L² es una cadena de alquileo que tiene m átomos de carbono, y un átomo de hidrógeno en un átomo de carbono alquilénico puede estar sustituido, o puede no estarlo, con OH, OR^c, NH₂, NHR^c, NR^aR^d, SH o SR^c, o

L² es una cadena de poliéter obtenida por sustitución de al menos un átomo de carbono en la cadena de alquileo anteriormente mencionada con un átomo de oxígeno,

siempre que: cuando Y² es NH, O o S, un átomo unido a Y² en L² es carbono, un átomo unido a OR²¹ en L² es carbono, y los átomos de oxígeno no están adyacentes los unos a los otros;

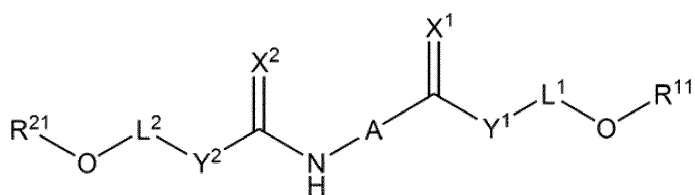
R^a, R^b, R^c y R^d son cada uno de manera independiente un sustituyente o un grupo protector;

m es un entero en el margen de 0 a 30;

n es un entero en el margen de 0 a 30; y

A es cualquier grupo atómico.

El monómero (molécula para introducir el resto conector anteriormente mencionado) tiene, optativamente, por ejemplo, la estructura de la fórmula química (II) que viene a continuación. A menos que se indique en particular, se puede citar la explicación en el resto conector (resto aminoacídico) representado por la fórmula química (I) anteriormente mencionada para que el monómero tenga la estructura de la siguiente fórmula química (II).



(I I)

En la fórmula química (II) anteriormente mencionada,

X¹ y X² son cada uno de manera independiente H₂, O, S o NH;

Y¹ e Y² son cada uno de manera independiente un enlace simple, CH₂, NH, O o S;

5 R¹¹ y R²¹ son cada uno de manera independiente H, un grupo protector o un grupo protector con fosfato;

L¹ es una cadena de alquileo que tiene n átomos de carbono, y un átomo de hidrógeno en un átomo de carbono alquilénico puede estar sustituido, o puede no estarlo, con OH, OR^a, NH₂, NHR^a, NR^aR^b, SH o SR^a, o

L¹ es una cadena de poliéter obtenida por sustitución de al menos un átomo de carbono en la cadena de alquileo anteriormente mencionada con un átomo de oxígeno,

10 siempre que: cuando Y¹ es NH, O o S, un átomo unido a Y¹ en L¹ es carbono, un átomo unido a OR¹¹ en L¹ es carbono, y los átomos de oxígeno no están adyacentes los unos a los otros;

L² es una cadena de alquileo que tiene m átomos de carbono, y un átomo de hidrógeno en un átomo de carbono alquilénico puede estar sustituido, o puede no estarlo, con OH, OR^c, NH₂, NHR^c, NR^cR^d, SH o SR^c, o

15 L² es una cadena de poliéter obtenida por sustitución de al menos un átomo de carbono en la cadena de alquileo anteriormente mencionada con un átomo de oxígeno,

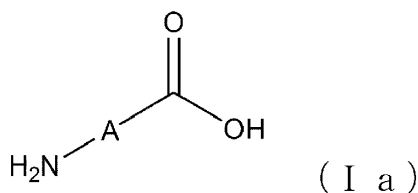
siempre que: cuando Y² es NH, O o S, un átomo unido a Y² en L² es carbono, un átomo unido a OR²¹ en L² es carbono, y los átomos de oxígeno no están adyacentes los unos a los otros;

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

m es un entero en el margen de 0 a 30;

20 n es un entero en el margen de 0 a 30;

A es cualquier grupo atómico, la fórmula química (Ia) que viene a continuación es un aminoácido o un péptido.



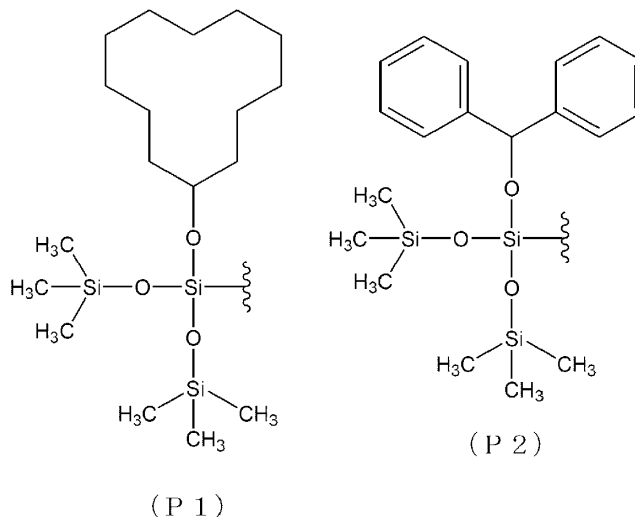
(I a)

25 Mediante el uso del monómero representado mediante la fórmula química (II-0) o (II) anteriormente mencionada, por ejemplo, en la síntesis del inhibidor de micro-ARN descrito en la presente memoria, se puede sintetizar con facilidad el resto aminoacídico representado por la fórmula química (I-0) o (I) anteriormente mencionada. El monómero puede utilizar una amidita para la síntesis automatizada del ácido nucleico, por ejemplo, en la síntesis del inhibidor de micro-ARN, y es aplicable a, por ejemplo, los sintetizadores automáticos generales de ácidos nucleicos. Los ejemplos del método de síntesis anteriormente mencionado incluyen un método de fosforamiditas y un método de h-fosfonato.

30 En la fórmula química (II-0) o (II) anteriormente mencionada, se puede citar la explicación en la fórmula química (I-0) o (I) anteriormente mencionada para la misma porción que en la fórmula química (I-0) o (I) anteriormente mencionada. En concreto, en la fórmula química (II-0) o (II) anteriormente mencionada, por ejemplo, se puede citar la explicación en la fórmula química (I-0) o (I) anteriormente mencionada para X¹, X², Y¹, Y², L¹, L², m, n y A.

35 En la fórmula química (II-0) o (II) anteriormente mencionada, R¹¹ y R²¹ son, tal y como se menciona más arriba, cada uno de manera independiente H, un grupo protector o un grupo protector con fosfato.

La explicación en los grupos protectores anteriormente mencionados es la misma que en, por ejemplo, la fórmula química (I-0) o (I) anteriormente mencionada, y los ejemplos específicos de los mismos se pueden seleccionar de, por ejemplo, el siguiente grupo I. El grupo I anteriormente mencionado incluye el grupo de DMTr, grupo de TBDMS, grupo de ACE, grupo de TOM, grupo de CEE, grupo de CEM, grupo de TEM y grupo que contiene sililo representado por la fórmula química (P1) o (P2) que vienen a continuación. El grupo protector anteriormente mencionado es particular y preferiblemente cualquiera de los anteriormente mencionados grupo de DMTr y grupo que contiene sililo.



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



En la fórmula química (P3) anteriormente mencionada, R^6 es un átomo de hidrógeno o cualquier sustituyente. Por ejemplo, el sustituyente R^6 es preferiblemente un grupo hidrocarburo y el grupo hidrocarburo anteriormente mencionado puede estar sustituido, o puede no estarlo, con un grupo que retira electrones. Los ejemplos del sustituyente R^6 incluyen halógenos, haloalquilos, heteroarilos, hidroxialquilos, alcoxilalquilos, aminoalquilos, sililos, sililoxialquilos, heterociclilalquenos, heterociclilalquenos, heteroarilalquilos e hidrocarburos, tales como alquilos, alquenos, alquinos, arilos, arilalquilos, cicloalquilos, cicloalquenos, cicloalquilalquilos y ciclilalquilos, que pueden estar sustituidos, o pueden no estarlo, con un grupo que retira electrones. Los ejemplos específicos de sustituyente R^6 incluyen un grupo β -cianoetilo, un grupo nitrofeniletilo y un grupo metilo.

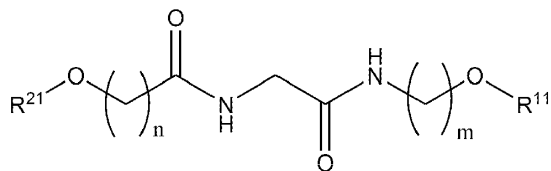
R^7 y R^8 son cada uno un átomo de hidrógeno o cualquier sustituyente, y pueden ser iguales o diferentes. Los sustituyentes R^7 y R^8 son preferiblemente, por ejemplo, grupos hidrocarburo, y el grupo hidrocarburo anteriormente mencionado puede estar, o puede no estarlo, sustituido adicionalmente con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

Los ejemplos específicos del grupo protector con fosfato representado por la fórmula química anteriormente mencionada (P3) incluyen los seleccionados del siguiente grupo II. El grupo II consiste en $-P(OCH_2CH_2CN)(N(iPr)_2)$ y $-P(OCH_3)(N(iPr)_2)$. En las fórmulas químicas anteriormente mencionadas, iPr es isopropilo.

En la fórmula química (II-0) o (II) anteriormente mencionadas, por ejemplo, uno de R^1 y R^2 puede ser H o un grupo protector y el otro puede ser H o un grupo protector con fosfato. Cuando R^{11} es el grupo protector anteriormente mencionado, R^{21} es preferiblemente H o el grupo protector con fosfato anteriormente mencionado. Cuando R^{11} se selecciona del grupo I anteriormente mencionado, R^{21} es preferiblemente H o se selecciona del grupo protector con fosfato anteriormente mencionado representado por la fórmula química (P3), más preferiblemente H, o se selecciona del grupo II anteriormente mencionado. Cuando R^{11} es el grupo protector con fosfato anteriormente mencionado, R^{21} es preferiblemente H o el grupo protector anteriormente mencionado. Cuando R^{11} es un grupo protector con fosfato representado por la fórmula química (P3) anteriormente mencionada o se selecciona del grupo II anteriormente mencionado, R^{21} es preferiblemente H o

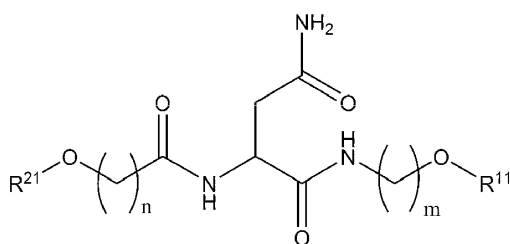
se selecciona del grupo I anteriormente mencionado.

Los ejemplos de la estructura de la fórmula química (II-0) o (II) anteriormente mencionadas incluyen las siguientes fórmulas químicas (II-1) a (II-6). En las siguientes fórmulas químicas (II-1) a (II-6), n y m son lo mismo que en las fórmulas químicas (II-0) o (II) anteriormente mencionadas.

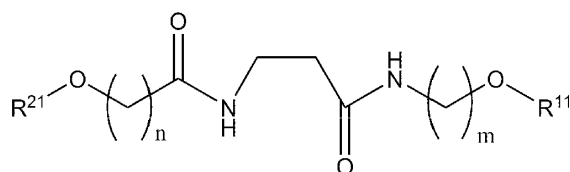


(II-1)

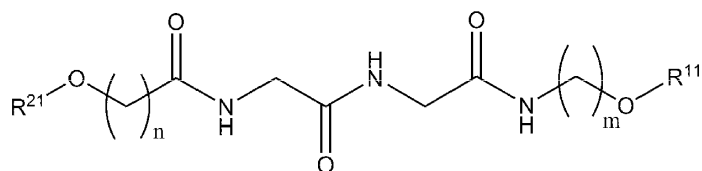
5



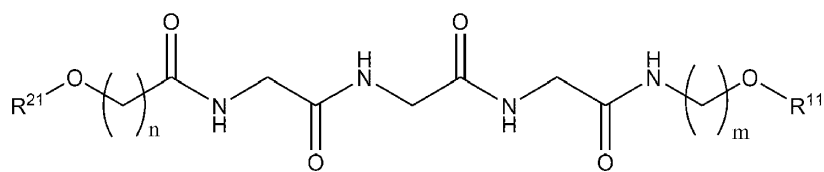
(II-2)



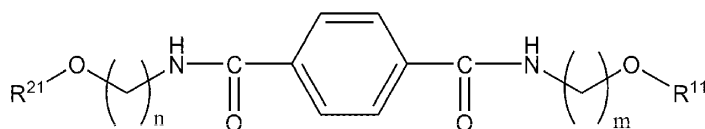
(II-3)



(II-4)



(II-5)

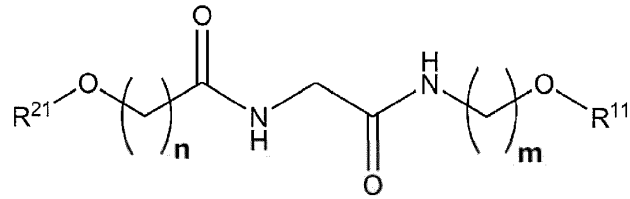


(II-6)

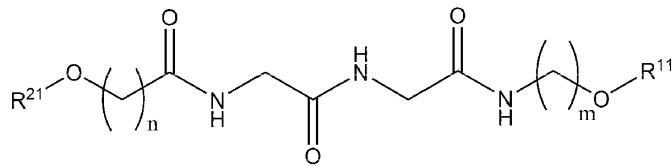
10

En las fórmulas químicas (II-1) a (II-6) anteriormente mencionadas, n y m no están particularmente limitados y son tal y como está descrito más arriba. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen n = 11 y m = 12 en la fórmula química (II-1) anteriormente mencionada, n = 5 y m = 4 en la fórmula química (II-1) anteriormente mencionada, y n = 4 y m = 4 en la fórmula química (II-6) anteriormente mencionada.

El monómero de la presente invención tiene una estructura de la fórmula química (II-1), (II-4) o (II-6) que viene a continuación:

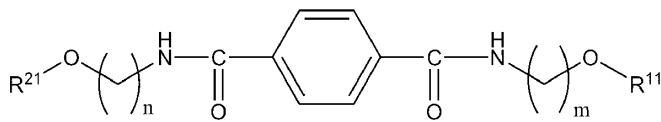


(II-1)



(II-4)

5



(II-6)

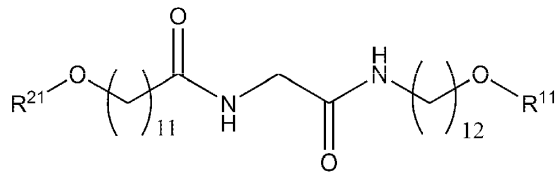
en las fórmulas químicas (II-1), (II-4) o (II-6) anteriormente mencionadas, R¹¹ es H o un grupo protector y R²¹ es un grupo protector con fosfato;

en donde, en dicha fórmula química (II-1), n = 11 y m = 12,

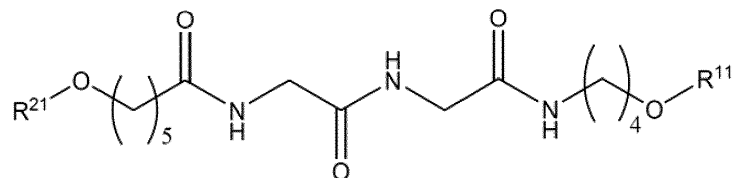
10 en donde, en dicha fórmula química (II-4), n = 5 y m = 4,

en donde, en dicha fórmula química (II-6), n = 4 y m = 4.

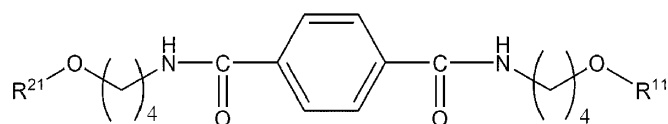
Las estructuras se muestran mediante las fórmulas químicas (II-1a), (II-4a) y (II-6a) que vienen a continuación.



(II-1a)

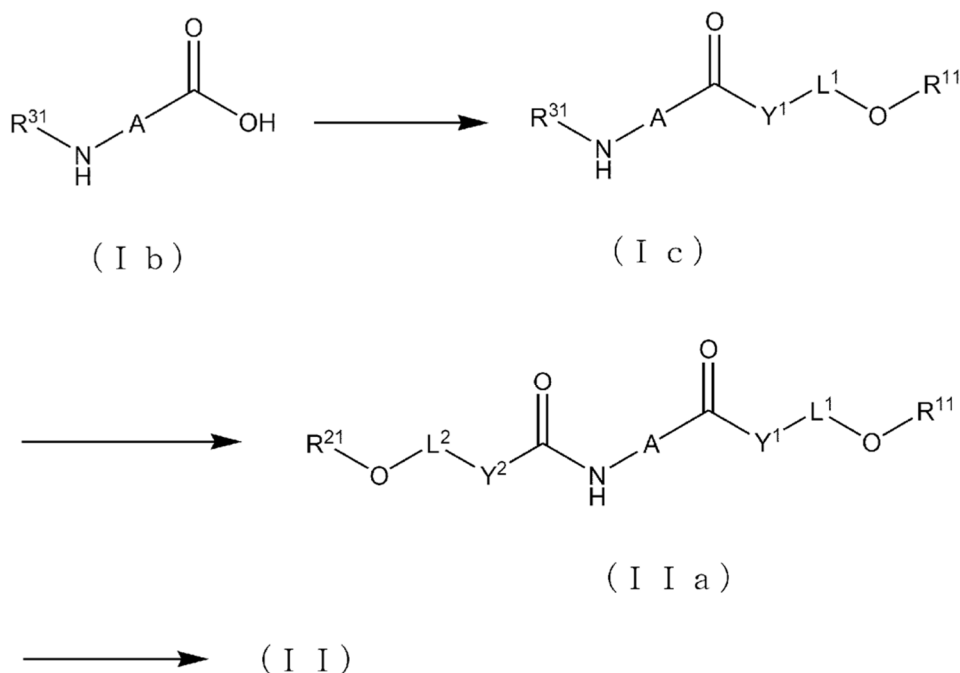


(II-4a)



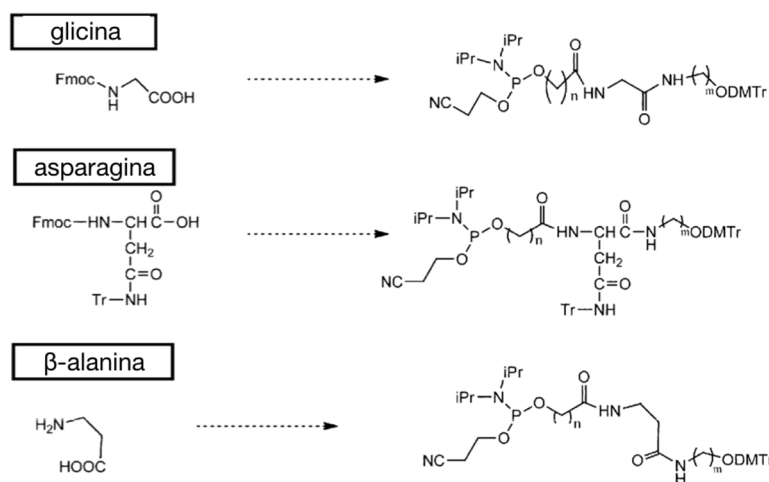
(II - 6 a)

Mientras que el método de producción de un monómero en la presente invención no está particularmente limitado, por ejemplo, tal y como se muestra en el esquema 1 que viene a continuación, el compuesto (Ic) que viene a continuación se puede producir a partir del compuesto (Ib), en donde el grupo amino del aminoácido anteriormente mencionado (Ia) está protegido por un grupo protector R³¹, mediante una reacción de condensación, (IIa) se produce a partir de (Ic), y (IIa) se convierte en (II). El esquema 1 que viene a continuación es un ejemplo y la presente invención no se limita a ello. En las fórmulas químicas (Ib) y (Ic) que vienen a continuación, el grupo protector R³¹ es, por ejemplo, Fmoc (grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo), Z (benciloxycarbonilo), BOC (*t*-butoxicarbonilo) y similares. En las fórmulas químicas (Ib), (Ic) y (IIa) que vienen a continuación, Y¹, Y², L¹, L², R¹¹ y R²¹ son tal y como están definidos para la fórmula química (II) anteriormente mencionada. El compuesto (IIa) que viene a continuación es un compuesto de la fórmula química (II) anteriormente mencionada en donde X¹ es O y X² es O. El oxígeno carbonílico en la fórmula química (IIa) que viene a continuación se puede convertir de manera adecuada en X¹ y X² en la fórmula química (II) anteriormente mencionada. Cuando la conversión no es necesaria, el compuesto (IIa) que viene a continuación se puede utilizar directamente como el compuesto (II). Mientras que el método de producción del monómero representado mediante la fórmula química (II-0) anteriormente mencionada no está particularmente limitado, puede ser, por ejemplo, el método de producción del esquema 1 que viene a continuación. En particular, por ejemplo, el monómero representado por la fórmula química (II-0) anteriormente mencionada también se puede producir mediante un método de producción similar al del esquema 1 que viene a continuación, salvo que se utilizan poliamina o ácido policarboxílico y similares en vez del aminoácido de la fórmula química (Ib) que viene a continuación.

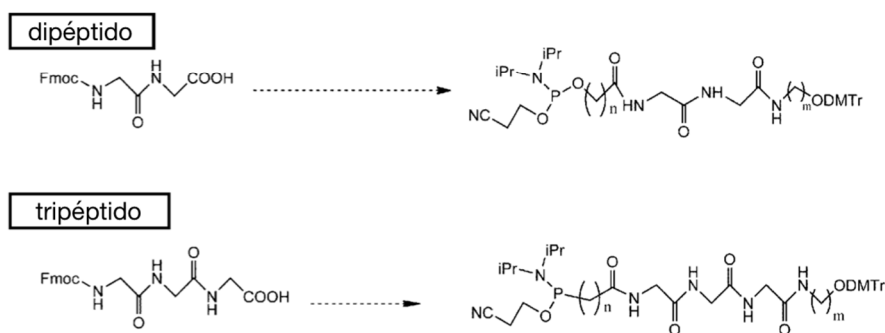


esquema 1

El monómero y el método de producción del mismo en la presente invención se ejemplifican además de manera específica mediante los esquemas 2 y 2a que viene a continuación. Sin embargo, los esquemas 2 y 2a que viene a continuación son ejemplos y la presente invención no se limita a ellos. En los esquemas 2 y 2a que viene a continuación, «Fmoc» es un grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo, «iPr» es un grupo isopropilo, «Tr» es un grupo tritilo o grupo trifenilmetilo, y «ODMTr» es un grupo 4,4'-dimetoxitritiloxi. De aquí en adelante será siempre así.



esquema 2

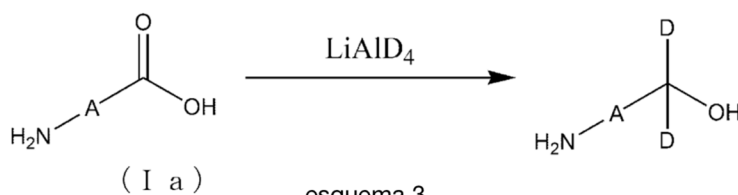


esquema 2a

El monómero de la presente invención incluye preferiblemente, por ejemplo, la sustancia de marcación. Es particularmente preferible que el monómero de la presente invención incluya el isótopo estable.

- 5 Cuando el monómero de la presente invención incluye un isótopo, tal como el isótopo estable anteriormente mencionado, el isótopo anteriormente mencionado se puede introducir con facilidad en la molécula del inhibidor de micro-ARN de la presente invención. El monómero anteriormente mencionado que incluye un isótopo se puede sintetizar, por ejemplo, a partir de un material bruto del aminoácido (Ia) en el cual se introduce el isótopo anteriormente mencionado. En la presente invención, no está particularmente limitado un método para obtener el aminoácido (Ia) en el cual se ha introducido un isótopo. Por ejemplo, se puede producir mediante un método adecuado o se puede utilizar el producto disponible en el mercado.
- 10

A modo de aminoácido en el cual se introduce el isótopo estable anteriormente mencionado, por ejemplo, un aminoácido en el cual se introduce un hidrógeno pesado (D) se puede producir al tratar el aminoácido (Ia) con LiAlD_4 , tal y como se muestra en el esquema 3 que viene a continuación y además oxidando el grupo OH.

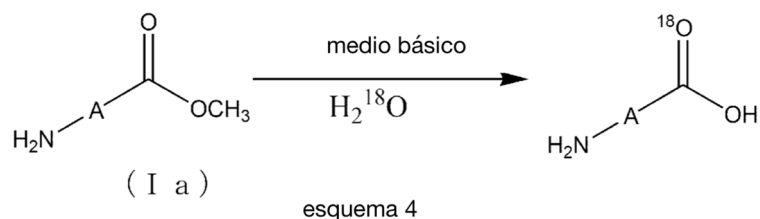


esquema 3

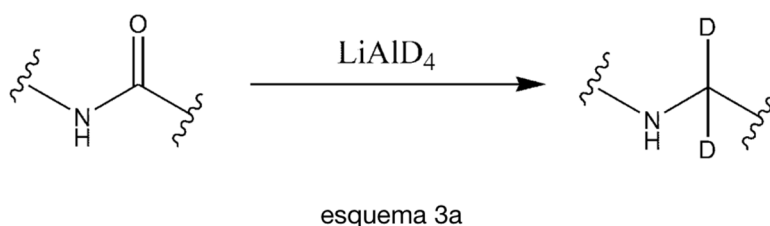
15

A modo de aminoácido en el cual se introduce otro isótopo estable, por ejemplo, un aminoácido en el cual se introduce un oxígeno pesado (^{18}O) se puede producir al hacer reaccionar el éster de metilo del aminoácido (Ia)

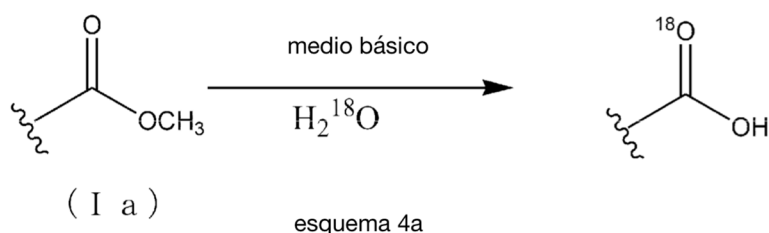
con $H_2^{18}O$ en un medio básico, tal y como se muestra en el esquema 4 siguiente.



5 A modo de péptido al que se le introduce un isótopo estable, por ejemplo, un péptido que lleva introducido deuterio (D) se puede producir, por ejemplo, al tratar un enlace peptídico con $LiAlD_4$ tal y como se muestra en el siguiente esquema 3a.



10 A modo de péptido al que se le introduce un isótopo estable, por ejemplo, un péptido que lleva introducido oxígeno pesado (^{18}O) se puede producir, por ejemplo, tal y como se muestra en el esquema 4a que viene a continuación, en un medio básico, al hacer reaccionar el carboxilato de metilo con $H_2^{18}O$ y, después, condensar el ácido carboxílico de la fórmula química que viene a continuación con un grupo amino o un grupo imino para formar un enlace peptídico.



15 Además, el método de producción del aminoácido o del péptido que incluye la introducción de nitrógeno pesado (^{15}N) o de carbono pesado (^{13}C) y similares no está particularmente limitado y se puede producir mediante un método adecuado.

20 Un monómero que tiene un isótopo estable introducido en él se puede sintetizar de la manera descrita más arriba. Mediante el uso del monómero anteriormente mencionado como amidita para la síntesis, se puede sintetizar el inhibidor de micro-ARN descrito en la presente memoria en el cual se introduce un isótopo estable para el resto aminoacídico anteriormente mencionado. La estructura de la porción terminal del inhibidor de micro-ARN puede ser un ácido nucleico. No obstante, es preferible un resto conector y es más preferible un resto aminoacídico (aminoácido o péptido).

25 Mientras que el uso del monómero de la presente invención no está particularmente limitado, es preferible una síntesis automática de ácido nucleico. Como alternativa, el monómero de la presente invención se utiliza preferiblemente para producir una molécula de ácido nucleico, y la molécula de ácido nucleico anteriormente mencionada es más preferiblemente el inhibidor de micro-ARN anteriormente mencionado.

Ejemplos

La presente invención se explica en detalle a continuación al hacer referencia a los ejemplos y similares, que no se debe considerar que la limitan.

[Síntesis de la molécula para la introducción del resto de glicina (Gly)]

30 En los oligonucleótidos (inhibidores de micro-ARN) de cada uno de los ejemplos y ejemplos de referencia mencionados a continuación, la molécula para la introducción del resto de glicina (Gly) (el monómero de la presente invención) se sintetiza tal y como se describe a continuación.

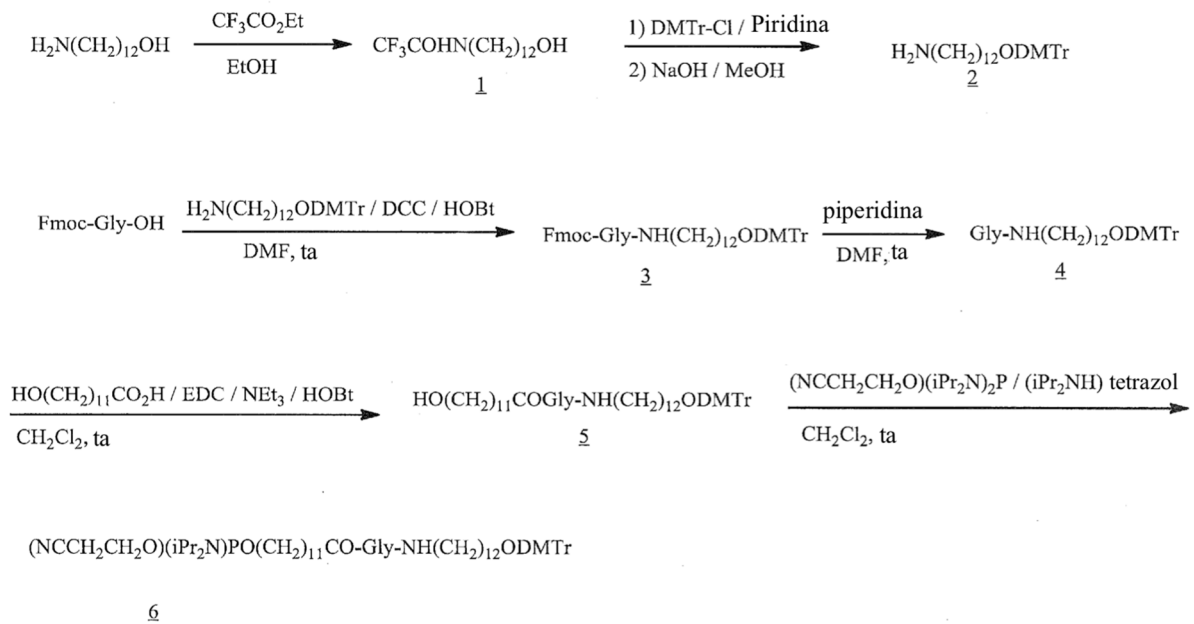
Esto es, de acuerdo con el esquema 5 que viene a continuación, se sintetizó la dodecamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamidofosforamidita (6). El compuesto (6) es una molécula para la introducción del resto de glicina (Gly) y es una realización del monómero anteriormente mencionado de la presente invención. En el esquema 5 que viene a continuación, «Gly» es una estructura representada por la fórmula química que viene a continuación, a saber, un grupo de átomos que tiene una estructura en donde se han retirado de la glicina un átomo de hidrógeno del grupo amino y el OH del grupo carboxi. A continuación, a menos que se especifique de otra manera, «Gly» muestra la estructura de la fórmula química que viene a continuación. En el esquema 5 que viene a continuación, el lado NH de la Gly está unido a Fmoc o el carbono carbonilo, y el lado del carbono carbonilo (CO) de Gly está unido al OH o al átomo de N.

5

10

((Gly) -HN-CH₂-CO- (GlyGly))

-HN-CH₂-CO-



esquema 5

(1) 12-trifluoroacetamidododecanol (compuesto 1)

15

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

(2) 12-(4,4'-dimetoxitritiloxi)dodecanamina (compuesto 2)

20

El compuesto 1 (3,00 g, 10,08 mmol) se secó tres veces por destilación azeotrópica con piridina anhidra. Al residuo de la destilación azeotrópica se le añadieron cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (4,32 g, 12,1 mmol) y piridina anhidra (50 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. A la mezcla de reacción obtenida se le añadió metanol (10 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. El solvente se evaporó a presión reducida a temperatura ambiente hasta que la mezcla se volvió de aproximadamente de 30 ml. Después se le añadió diclorometano (200 ml) y la mezcla se lavó tres veces con hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado y se lavó además con salmuera saturada. La mezcla se secó sobre sulfato de sodio y el solvente se evaporó a presión reducida. A una solución (100 ml) en metanol del residuo sin purificar así obtenido se le añadió hidróxido de sodio (2,02 g, 50,40 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida hasta que se volvió de aproximadamente de 30 ml. Se le añadieron agua (100 ml) y diclorometano (200 ml) y se fraccionó la capa orgánica. La capa orgánica fraccionada se lavó con salmuera saturada y se secó sobre sulfato de sodio. A continuación, se retiró por filtración el desecante (sulfato de sodio) y el solvente se evaporó a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: diclorometano-metanol (95:5) más piridina al 0,05%) para dar la 12-(4,4'-dimetoxitritiloxi)dodecanamina (2) (5,19 g, q.). Los valores del análisis instrumental de la 12-(4,4'-dimetoxitritiloxi)dodecanamina (2) se muestran a continuación.

25

30

35

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

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

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

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

15 (4) glicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamida (compuesto 4)

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

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

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

25 (5) hidroxidodecanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamida (compuesto 5)

El compuesto 4 (3,15 g, 5,62 mmol) se secó tres veces por destilación azeotrópica con piridina anhidra, se le añadieron ácido 12-hidroxidodecanoico (3,41 g, 6,74 mmol), hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (1,29 g, 6,74 mmol), monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol (2,06 g, 13,48 mmol) y diclorometano anhidro (50 ml) a temperatura ambiente en una atmósfera de argón, y la mezcla se agitó durante 10 min. A la mezcla obtenida así se le añadió trietilamina (2,05 g, 20,22 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche en una atmósfera de argón. A la mezcla de reacción obtenida se le añadió diclorometano (200 ml), y la mezcla se lavó tres veces con hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado y se lavó además una vez con salmuera saturada. Se fraccionó la capa orgánica, se secó sobre sulfato de sodio y el solvente se evaporó a presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: diclorometano-metanol (95:5) más piridina al 0,05%) para dar la hidroxidodecanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamida (5) (2,97 g, 70%) como un jarabe incoloro. Los valores del análisis instrumental de la hidroxidodecanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamida (5) se muestran a continuación.

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

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

(6) dodecanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamidofosforamidita (compuesto 6)

45 El compuesto 5 (2,78 g, 3,76 mmol) se secó tres veces por destilación azeotrópica con piridina anhidra. A continuación, se le añadió tetrazoluro de diisopropilamonio (772 mg, 4,51 mmol), la mezcla se dejó sin aire a presión reducida, se llenó con argón gaseoso y se le añadió acetónitrilo anhidro (3 ml). Además, se le añadió una solución (3 ml) de 2-cianoetoxi-*N,N,N',N'*-tetraisopropilfosforamidita (1,36 g, 4,51 mmol) en diclorometano-acetonitrilo anhidro, y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 4 h en una atmósfera de argón. A la mezcla de reacción obtenida se le añadió diclorometano (150 ml) y la mezcla se lavó dos veces con hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado y se lavó además una vez con salmuera saturada. Se fraccionó la capa orgánica, se secó sobre sulfato de sodio y el solvente se evaporó a presión reducida. El residuo se sometió a una cromatografía en columna de sílice con amina (eluyente: n-hexano-acetona (7:3) más piridina al 0,05%) para dar la dodecanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamidofosforamidita (6) (2,72 g, 77%, HPLC 98,5%). Los valores del análisis instrumental de la dodecanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamidofosforamidita (6) se muestran a continuación.

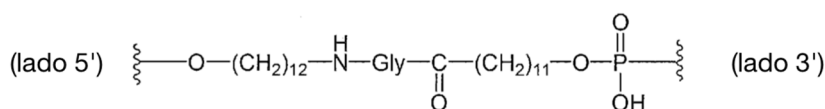
55

dodecanamidoglicina-4,4'-dimetoxitritiloxidodecanamidofosforamidita (6);

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

P-RMN (CDCl₃): δ = 146,62.

En los oligonucleótidos de los correspondientes ejemplos y de los correspondientes ejemplos de referencia, «Gly» realmente se representa por la siguiente fórmula química (G1). Es decir, en la fórmula estructural (secuencia) de los oligonucleótidos de cada uno de los ejemplos y de los ejemplos de referencia que vienen a continuación, se omite la parte diferente a Gly en la fórmula química (G1) que viene a continuación para simplificarla. El átomo de N de la fórmula química (G1) que viene a continuación está unido al lado del carbono carbonilo (CO) de la Gly, y el carbono de carbonilo de la fórmula química (G1) que viene a continuación está unido al lado NH de la Gly. De igual modo, en el oligonucleótido de cada uno de los ejemplos y ejemplos de referencia mencionados a continuación, cuando no está unida ninguna base (no se describe) al extremo 5' de la Gly (a saber, la (G1) que viene a continuación), está unido un átomo de hidrógeno (H) al extremo en 5'.



(G 1)

[Síntesis de la molécula para la introducción del resto del dímero de glicinas (GlyGly)]

En el oligonucleótido (inhibidor de micro-ARN) de cada uno de los ejemplos y ejemplos de referencia mencionados más adelante, se sintetizó una molécula para la introducción del resto del dímero de glicinas (GlyGly) (el monómero de la presente invención) tal y como se describe a continuación.

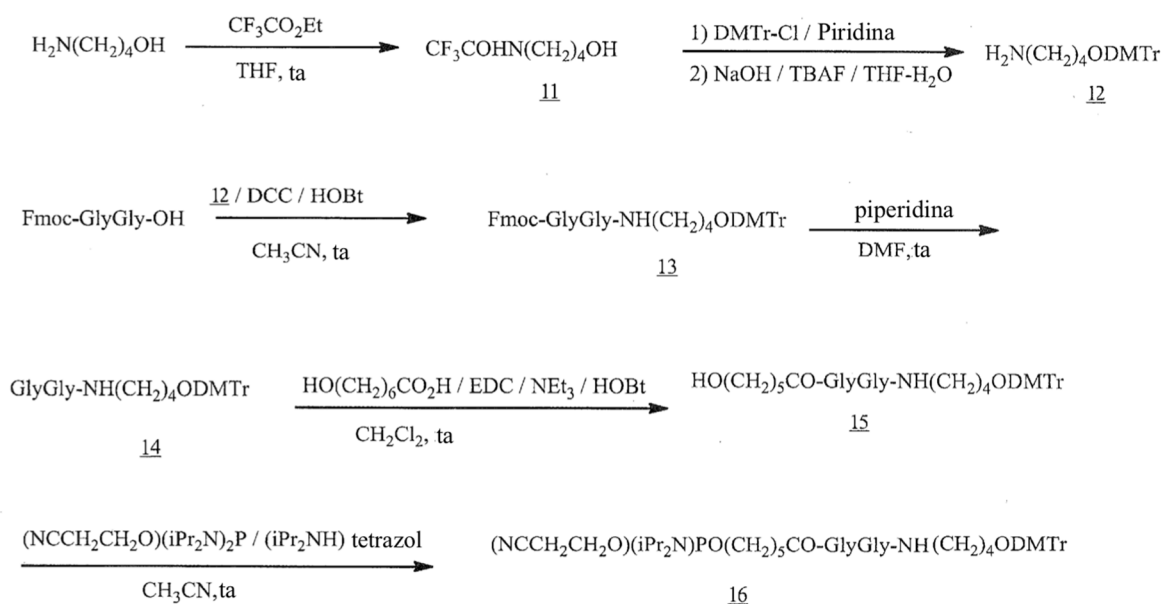
Esto es, se sintetizó la hexanamidoglicilglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutilamidofosforamidita (16) de acuerdo con el esquema 6 que viene a continuación. El compuesto (16) es una molécula para la introducción del resto del dímero de glicinas (GlyGly) y es un ejemplo de monómero anteriormente mencionado de la presente invención. La «Gly» en el esquema 6 que viene a continuación, al igual que se mencionó más arriba, muestra una estructura representada por la fórmula química que viene a continuación; es decir, un grupo atómico que tiene una estructura en donde se han retirado de la glicina un átomo de hidrógeno del grupo amino y el OH del grupo carboxi. A menos que se especifique de otra manera, en el esquema 6 que viene a continuación, la «GlyGly» tiene una estructura en la que se unen dos Gly para formar un enlace peptídico (véase más abajo). En el esquema 6 que viene a continuación, el Fmoc o el carbono carbonilo se unen al lado de NH del GlyGly y el OH o el átomo de N está unido al lado del carbono carbonilo (CO) de la Gly.

(Gly)

-HN-CH₂-CO-

(GlyGly)

-HN-CH₂-CO-HN-CH₂-CO-



esquema 6

(1) 4-trifluoroacetamidobutanol (compuesto 11)

Una solución (100 ml) de 4-aminobutanol (2,50 g, 28,05 mmol) y trifluoroacetato de etilo (19,92 g, 140,26 mmol) en etanol se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar el 4-trifluoroacetamidobutanol (11) (5,44 g, q.) como un jarabe incoloro.

(2) 4-(4,4'-dimetoxitritiloxi)butilamina (compuesto 12)

El compuesto 11 (4,15 g, 22,40 mmol) se secó tres veces por destilación azeotrópica con piridina anhidra. Al residuo de la destilación azeotrópica se le añadieron cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (9,60 g, 28,3 mmol) y piridina anhidra (100 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. A la mezcla de reacción obtenida se le añadió metanol (10 ml), se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min y el solvente se evaporó a presión reducida a temperatura ambiente hasta que quedaban aproximadamente 20 ml. Después se le añadió diclorometano (200 ml) y la mezcla se lavó tres veces con hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado y se lavó además con salmuera saturada. La mezcla se secó sobre sulfato de sodio y el solvente se evaporó a presión reducida. A una solución (50 ml) del residuo sin purificar así obtenido (9,00 g) en tetrahydrofurano se le añadió una solución (70 ml) de hidróxido de sodio (3,71 g, 92,7 mmol) en agua. Mientras que la mezcla se agitaba vigorosamente a temperatura ambiente, se le añadió trihidrato de fluoruro de tetrabutilamonio (180 mg) y la mezcla además se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante una noche. A la mezcla de reacción obtenida se le añadieron acetato de etilo (200 ml) y agua (100 ml), y se fraccionó la capa orgánica. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con acetato de etilo y el extracto se combinó con la capa orgánica fraccionada con antelación y se secó sobre sulfato de sodio. Luego se retiró por filtración el desecante (sulfato de sodio) y el solvente se evaporó a presión reducida. El residuo obtenido se sometió a una cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: diclorometano-metanol (9:1) más piridina al 0,05%) para dar la 4-(4,4'-dimetoxitritiloxi)butilamina (12) (6,36 g, 87%). Los valores del análisis instrumental de la 4-(4,4'-dimetoxitritiloxi)butilamina (12) se muestran a continuación.

4-(4,4'-dimetoxitritiloxi)butilamina (2);

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): $\delta = 7,42\text{-}7,45$ (m, 2H), $7,26\text{-}7,34$ (m, 12H), $7,17\text{-}7,20$ (m, 1H), $6,80\text{-}6,84$ (m, 4H), $3,79$ (s, 6H), $3,48$ (s, 2H, NH_2), $3,06$ (t, $J = 6,8$ Hz, 2H, CH_2), $2,67$ (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, CH_2), $1,60\text{-}1,65$ (m, 2H, CH_2), $1,49\text{-}1,55$ (m, 2H, CH_2).

(13) Fmoc-glicilglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutilamida (compuesto 13)

A una solución (70 ml) de Fmoc-glicilglicina (Fmoc-GlyGly-OH, comprada a China Langchem) (2,50 g, 7,05 mmol), dicitohexilcarbodiimida (1,75 g, 8,46 mmol) y monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol (2,59 g, 16,92 mmol) en N,N -dimetilformamida anhidra se le añadió una solución (50 ml) del compuesto 12 (3,31 g, 8,46 mmol) en N,N -dimetilformamida anhidra enfriándola en hielo en una atmósfera de argón. Después de retirar el baño

de hielo, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche en una atmósfera de argón. El precipitado resultante se retiró por filtración y el filtrado se concentró a 35 °C a presión reducida. Al residuo obtenido se le añadió diclorometano (200 ml) y la mezcla se lavó dos veces con salmuera saturada. Se fraccionó la capa orgánica, se secó sobre sulfato de sodio y el solvente se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: diclorometano-metanol (95:5) más piridina al 0,05% y, a continuación, diclorometano-metanol (9:1) más piridina al 0,05%) para dar la Fmoc-glicilglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutilamida (13) (3,49 g, 68%) como un jarabe incoloro.

(14) glicilglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutilamida (compuesto 14)

Al compuesto 13 (3,00 g, 4,12 mmol) se le añadieron acetonitrilo (5 ml) y piperidina (2,4 ml) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El solvente se evaporó a presión reducida y el residuo obtenido se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: diclorometano-metanol (9:1) más piridina al 0,05%) para dar la glicilglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutilamida (14) (1,13 g, 54%). Los valores del análisis instrumental de la glicilglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutilamida (14) se muestran a continuación.

glicilglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutilamida (14);

¹H-RMN (CDCl₃): δ = 7,40-7,42 (m, 2H), 7,25-7,31 (m, 12H), 7,19-7,21 (m, 1H), 6,80-6,84 (m, 4H), 3,89 (d, J = 5,9 Hz, 2H), 3,79 (s, 6H), 3,37 (s, 2H), 3,25 (t, J = 5,8 Hz, 2H, CH₂), 2,67 (t, J = 5,8 Hz, 2H, CH₂), 1,57-1,65 (m, 4H, CH₂).

(15) hidroxihexanamidoglicilglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutilamida (compuesto 15)

El compuesto 14 (1,07 g, 2,11 mmol) se secó tres veces por destilación azeotrópica con acetonitrilo anhidro, se le añadieron ácido 6-hidroxihexanoico (336 mg, 2,54 mmol), hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (487 mg, 2,54 mmol), monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol (778 mg, 5,08 mmol) y diclorometano anhidro (20 ml) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó durante 10 min en una atmósfera de argón. A la mezcla así obtenida se le añadió trietilamina (778 mg, 5,08 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche en una atmósfera de argón. A la mezcla de reacción obtenida se le añadió diclorometano (150 ml) y la mezcla se lavó tres veces con hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado y se lavó además una vez con salmuera saturada. Se fraccionó la capa orgánica y se secó sobre sulfato de sodio, y el solvente se evaporó a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: diclorometano-metanol (95:5) más piridina al 0,05%) para dar la hidroxihexanamidoglicilglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutilamida (15) (890 mg, 68%) como un jarabe incoloro. Los valores del análisis instrumental de la hidroxihexanamidoglicilglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutilamida (15) se muestran a continuación.

hidroxihexanamidoglicilglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutilamida (15);

¹H-RMN (CDCl₃): δ = 7,41-7,42 (m, 2H), 7,27-7,34 (m, 12H), 7,18-7,21 (m, 1H), 6,81-6,83 (m, 4H), 3,92 (d, J = 5,43 Hz, 2H, CH₂), 3,84 (d, J = 5,9 Hz, 2H), 3,79 (s, 6H), 3,60 (m, 2H, CH₂), 3,23-3,28 (m, 2H, CH₂), 3,05-3,10 (m, 2H, CH₂), 3,23-3,28 (m, 2H, CH₂), 3,05-3,10 (m, 2H, CH₂), 2,56 (t, J = 7,3 Hz, 2H, CH₂), 1,50-1,72 (m, 8H), 1,30-1,45 (m, 2H, CH₂).

(16) hexanamidoglicilglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutilamidofosforamidita (compuesto 16)

El compuesto 15 (824 mg, 1,33 mmol) se secó tres veces por destilación azeotrópica con piridina anhidra. A continuación, se le añadió tetrazoluro de diisopropilamonio (274 mg, 1,60 mmol), se retiró el aire de la mezcla a presión reducida, se llenó con argón gaseoso y se le añadió acetonitrilo anhidro (1 ml). Además, se le añadió una solución (1 ml) de 2-cianoetoxi-*N,N,N',N'*-tetraisopropilfosforamidita (482 mg, 1,60 mmol) en acetonitrilo anhidro y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h en una atmósfera de argón. A la mezcla de reacción obtenida se le añadió diclorometano (100 ml) y la mezcla se lavó dos veces con hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado y se lavó además una vez con salmuera saturada. Se fraccionó la capa orgánica, se secó sobre sulfato de sodio y el solvente se evaporó a presión reducida. El residuo se sometió a una cromatografía en columna de sílice con amino (eluyente: diclorometano-acetona (7:3) más piridina al 0,05%) para dar la hexanamidoglicilglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutilamidofosforamidita (16) (938 mg, 86%, HPLC 98,2%). Los valores del análisis instrumental de la hexanamidoglicilglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutilamidofosforamidita (16) se muestran a continuación.

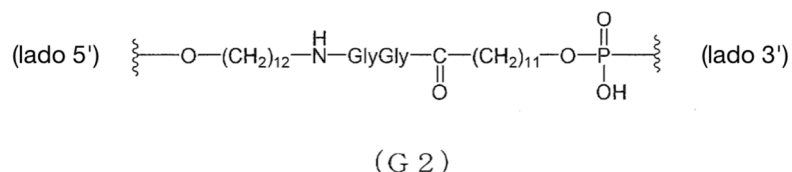
hexanamidoglicilglicina-4,4'-dimetoxitritiloxibutilamidofosforamidita (16);

¹H-RMN (CDCl₃): δ = 7,36-7,47 (m, 3H), 7,24-7,30 (m, 5H), 7,18-7,19 (m, 1H), 6,80-6,82 (m, 4H), 3,92 (d, J = 4,9 Hz, 2H, CH₂), 3,84 (d, J = 5,4 Hz, 2H), 3,76 (s, 6H), 3,73-3,85 (m, 4H), 3,54-3,64 (m, 4H), 3,18-3,25 (m, 2H, CH₂), 3,05-3,10 (m, 2H, CH₂), 2,60 (t, J = 6,3 Hz, 2H, CH₂), 2,23 (t, J = 7,4 Hz, 2H, CH₂), 1,55-1,68 (m, 8H), 1,30-1,45 (m, 2H, CH₂). 1,15-1,18 (m, 12H):

P-RMN (CDCl₃): δ = 146,57.

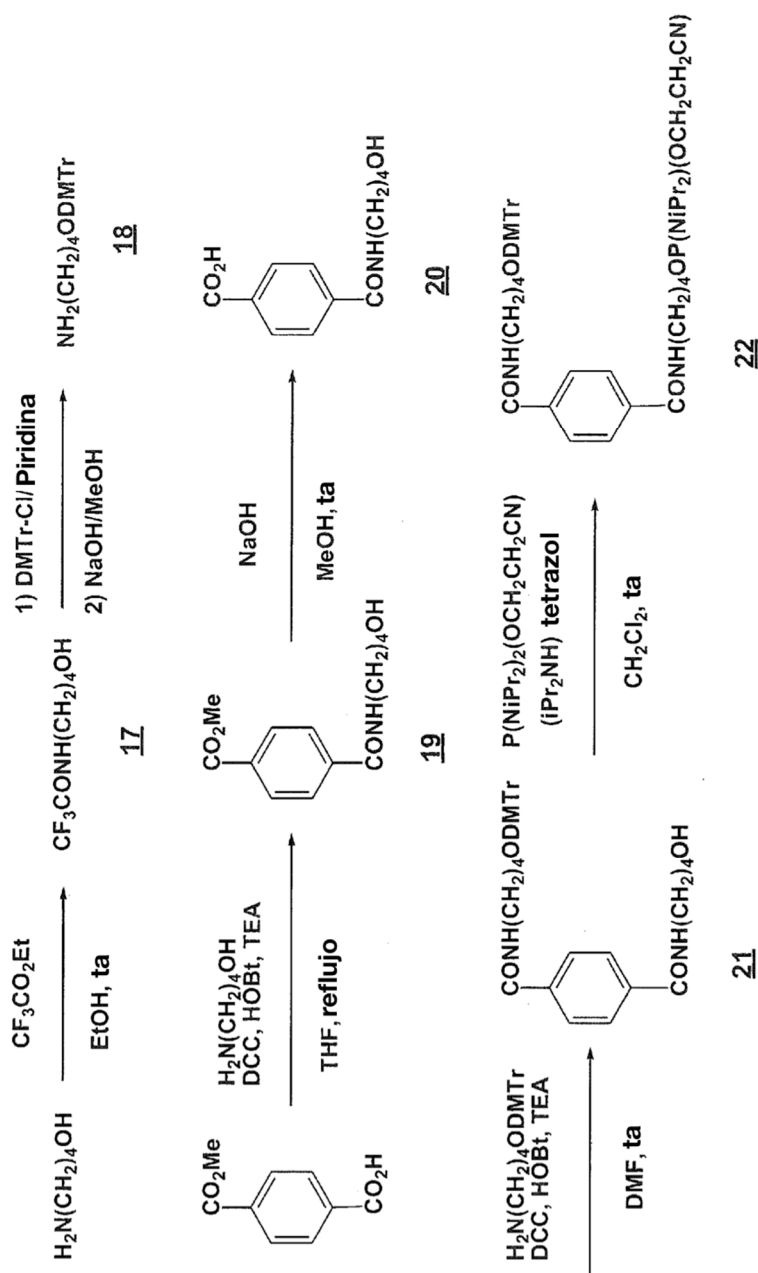
HPLC: Tiempo de retención de 6,25 min (Shimadzu SPD-10AV (XBridge OST C18, 4,6 mM × 50 mm)).

5 En cada uno de los siguientes ejemplos, «GlyGly» en los oligonucleótidos de los correspondientes ejemplos y de los correspondientes ejemplos de referencia se representa de hecho por la fórmula química (G2) que viene a continuación. Es decir, en la fórmula estructural (secuencia) del oligonucleótido de cada uno de los siguientes ejemplos y ejemplos de referencia, se omite la parte diferente a GlyGly de la fórmula química (G2) que viene a continuación para hacerlo más simple. GlyGly en la fórmula química (G2) que viene a continuación tiene una estructura en la que las 2 Gly mencionadas más arriba están unidas para formar un enlace peptídico. El átomo de N de la fórmula química (G2) que viene a continuación está unido al lado del carbono carbonilo (CO) de la GlyGly, y el carbono carbonilo de la fórmula química (G2) que viene a continuación está unido al lado NH de la GlyGly. De igual forma, en el oligonucleótido de cada uno de los ejemplos y ejemplos de referencia mencionados más adelante, cuando no está unida ninguna base (no se describe) al extremo 5' de la GlyGly (a saber, la (G2) que viene a continuación), está unido un átomo de hidrógeno (H) al extremo en 5'.



15 [Síntesis de la molécula para la introducción del resto de tereftalamida (TPA)]

20 En el oligonucleótido (inhibidor de micro-ARN) de cada uno de los ejemplos y ejemplos de referencia mencionados a continuación, una amidita de ácido tereftálico que es una molécula en la que se introduce el resto de tereftalamida (TPA) (el monómero de la presente invención) se sintetizó de acuerdo con el esquema 7 que viene a continuación. Aunque que la TPA se describe como «resto de tereftalamida», también puede ser un resto de ácido tereftálico.



esquema 7

(1) compuesto 17

5 Una solución (100 ml) de 4-aminobutanol (2,50 g, 28,05 mmol) y trifluoroacetato de etilo (19,92 g, 140,22 mmol) en etanol se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar el compuesto 17 (5,20 g, q.).

(2) compuesto 18

10 Una solución (20 ml) del compuesto 17 (5,20 g, 28,05 mmol) y cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (11,40 g, 33,66 mmol) en piridina anhidra se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Se le añadió diclorometano (200 ml) y la mezcla se lavó tres veces con hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado y se lavó además con salmuera saturada. Después del secado sobre sulfato de sodio, el solvente se evaporó a presión reducida. A una solución (100 ml) en metanol del residuo sin purificar así obtenido se le añadió hidróxido de sodio (5,61 g, 140,23 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, se le añadió agua (200 ml), y la mezcla se extrajo dos veces con diclorometano (200 ml). Se fraccionó la capa orgánica, se secó sobre sulfato de sodio, y el solvente se evaporó a presión reducida. El residuo obtenido se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: diclorometano-

15

metanol (9:1) más piridina al 0,05%) para dar el compuesto 18 (8,20 g, 75%). Los valores del análisis instrumental del compuesto 18 se muestran a continuación.

compuesto 18;

5 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): $\delta = 7,44\text{-}7,42$ (2H, m), 7,34-7,25 (6H, m), 7,20 (1H, d, $J = 7,3$ Hz), 6,82 (4H, m), 3,78 (6H, s), 3,06 (2H, t, $J = 6,3$ Hz), 2,68 (2H, t, $J = 7,1$ Hz), 1,59 (4H, m).

(3) compuesto 19

10 Una solución (70 ml) de tereftalato de monometilo (3,00 g, 16,65 mmol), 4-aminobutanol (0,89 g, 9,98 mmol), diciclohexilcarbodiimida (2,06 g, 9,98 mmol), monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol (3,06 g, 19,96 mmol) y trietilamina (5,05 g, 49,9 mmol) en tetrahidrofurano anhidro se agitó mientras se sometía a reflujo durante 5 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, el precipitado resultante se retiró por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. Al residuo se le añadió acetato de etilo (50 ml) y el precipitado se recogió por filtración para dar el compuesto 19 deseado (1,52 g). El filtrado se concentró a presión reducida y se lavó con tolueno. El precipitado se recogió por filtración para dar el compuesto 19 deseado (0,83 g). Al filtrado se le añadió diclorometano (200 ml) y la mezcla se lavó dos veces con hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado y se lavó además con salmuera saturada. Después del secado sobre sulfato de sodio, el solvente se evaporó a presión reducida para dar el compuesto 19 deseado (0,37 g). La producción total de los productos deseados obtenidos (compuesto 19) fue de 2,72 g, con un rendimiento del 65%. Los valores del análisis instrumental del compuesto 19 se muestran a continuación.

compuesto 19;

20 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): $\delta = 8,10\text{-}8,07$ (2H, m), 7,83 (2H, m), 3,94 (3H, s), 3,74 (2H, t, $J = 5,9$ Hz), 3,50 (2H, m), 1,92 (2H, dd, $J = 12,7, 3,4$ Hz), 1,80-1,65 (2H, m).

(4) compuesto 20

25 Una solución (70 ml) del compuesto 19 (2,33 g, 9,27 mmol) e hidróxido de sodio (1,85 g, 46,36 mmol) en metanol se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se le añadió agua. Además, la mezcla se ajustó a pH 2 con ácido clorhídrico a 2 N (2 mol/l). El precipitado resultante se recogió por filtración y se secó a presión reducida para dar el compuesto 20 deseado (1,95 g, 89%). Los valores del análisis instrumental del compuesto 20 se muestran a continuación.

compuesto 20;

30 $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d_6): $\delta = 8,00$ (2H, d, $J = 8,3$ Hz), 7,92 (2H, d, $J = 8,3$ Hz), 1,72 (2H, d, $J = 12,7$ Hz), 1,63-1,45 (4H, m), 1,15 (2H, m).

(5) compuesto 21

35 Una solución (170 ml) con el compuesto 18 (3,09 g, 7,88 mmol), el compuesto 20 (1,70 g, 7,16 mmol), diciclohexilcarbodiimida (1,63 g, 7,88 mmol), monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol (2,41 g, 15,76 mmol) y trietilamina (3,62 g, 35,80 mmol) en *N,N*-dimetilformamida anhidra se agitó a temperatura ambiente durante una noche en una atmósfera de argón. La mezcla de reacción obtenida se concentró a presión reducida, se le añadió diclorometano (300 ml) y la mezcla se lavó tres veces con hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado. Se fraccionó la capa orgánica, se secó sobre sulfato de sodio y el solvente se evaporó a presión reducida. El residuo se trituró con tolueno, el precipitado resultante se recogió por filtración y se secó a presión reducida para dar el compuesto 21 deseado (3,94 g, 90%). Los valores del análisis instrumental del compuesto 21 se muestran a continuación.

compuesto 21;

40 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): $\delta = 7,76\text{-}7,67$ (4H, m), 7,40 (2H, d, $J = 7,3$ Hz), 7,27 (6H, m), 7,19 (1H, m), 6,80 (4H, d, $J = 8,8$ Hz), 3,78 (6H, s), 3,73 (2H, t, $J = 5,9$ Hz), 3,48 (4H, m), 3,12 (2H, t, $J = 5,6$ Hz), 1,72 (8H, m).

(6) compuesto 22

45 El compuesto 21 (1,50 g, 2,46 mmol) se secó tres veces mediante destilación azeotrópica con piridina anhidra. A continuación, se le añadió tetrazoluro de diisopropilamonio (630 mg, 3,68 mmol), a la mezcla se le retiró el aire a presión reducida, se llenó con argón gaseoso y se le añadió diclorometano anhidro (1 ml). Además, se le añadió una solución (1 ml) de 2-cianoetoxi-*N,N,N',N'*-tetraisopropilfosfordiamidita (1,11 g, 3,68 mmol) en diclorometano anhidro y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h en una atmósfera de argón. A la mezcla de reacción obtenida se le añadió diclorometano (200 ml) y la mezcla se lavó tres veces con hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado. Se fraccionó la capa orgánica, se secó sobre sulfato de sodio y el solvente se evaporó a presión reducida. El residuo se disolvió con diclorometano y se sometió a

50

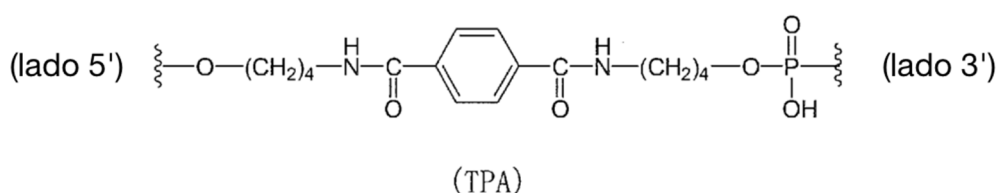
cromatografía en columna de sílice con amino (eluyente: n-hexano-acetona (7:3) más piridina al 0,05%) para dar el compuesto 22 (1,86 g, 93%). Los valores del análisis instrumental del compuesto 22 se muestran a continuación.

compuesto 22;

5 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): $\delta = 7,74$ (4H, m), 7,41 (2H, m), 7,31-7,24 (6H, m), 7,20 (1H, m), 6,80 (4H, m), 3,85-3,56 (10H, m), 3,45 (4H, m), 3,12 (2H, t, $J = 5,9$ Hz), 2,60 (2H, dd, $J = 11,0, 4,6$ Hz), 2,16 (2H, t, $J = 3,4$ Hz), 1,72 (8H, t, $J = 5,9$ Hz), 1,17 (12H, m).

$^{31}\text{P-RMN}$ (CDCl_3): $\delta = 147,10$.

10 El «TPA» en los oligonucleótidos de los correspondientes ejemplos y los correspondientes ejemplos de referencia que se mencionan más adelante tiene en realidad una estructura representada por la fórmula química que viene a continuación. De igual forma, en el oligonucleótido de cada uno de los ejemplos y ejemplos de referencia mencionados más adelante, cuando no está unida ninguna base (no se describe) al extremo 5' del TPA, está unido un átomo de hidrógeno (H) al extremo 5'.



15 Ejemplo 1

Con el uso de dos micro-ARN de hsa-miR-16-5p y hsa-miR-122 como la diana de inhibición, se produjeron inhibidores de micro-ARN mediante el método de síntesis química anteriormente mencionado, tal y como se muestra más adelante. Primero, las secuencias complementarias anteriormente mencionadas eran complementarias a toda o una parte de la secuencia de los dos micro-ARN anteriormente mencionados. Tres de las secuencias complementarias anteriormente mencionadas estaban conectadas mediante un resto de glicina (Gly), y el resto de glicina (Gly) también estaba conectado a cada porción terminal de las secuencias complementarias anteriormente mencionadas presentes en ambos extremos. Las dos clases anteriormente mencionadas de inhibidores de micro-ARN se introdujeron en células Huh-7 y el nivel de expresión del micro-ARN recuperado 24 h después de la introducción se confirmó por qPCR. Los resultados se muestran en la figura 4. Tal y como se muestra en la figura, está claro que los dos inhibidores de micro-ARN (oligos de esponja) de este ejemplo inhibieron de manera dominante los micro-ARN en comparación con cuando no se introdujeron (normal).

En el ejemplo 1 y en cada uno de los ejemplos mencionados más adelante (incluidos los ejemplos de referencia), el inhibidor de micro-ARN se sintetizó desde el extremo 3' al extremo 5' mediante un sintetizador de ácido nucleico (nombre comercial: sistema de síntesis de ácidos nucleicos ABI Expedite (marca comercial registrada) 8909, de Applied Biosystems) basándose en el método de fosforamiditas. En la síntesis anteriormente mencionada, se utilizaron fosforamiditas de ARN (2'-O-TBDMSi, nombre comercial, Samchully Pharm Co., Ltd) como amidita de ARN. Como amidita de ADN, se utilizaron las fosforamiditas de ADN (Samchully Pharm Co., Ltd). Además, una molécula para la introducción del resto de glicina (Gly) y una molécula para la introducción del resto del dímero de glicinas (GlyGly) a utilizar para el método de fosforamiditas anteriormente mencionado se sintetizaron mediante el método mencionado más adelante. Estas moléculas para la introducción del resto de glicina (Gly) y la introducción del resto del dímero de glicinas (GlyGly) eran amiditas, que corresponden al monómero anteriormente mencionado de la presente invención. A la desprotección de la amidita anteriormente mencionada fue seguida de un método convencional y los inhibidores de micro-ARN sintetizados se purificaron por HPLC.

Ejemplo 2: comparación del efecto supresor del oligonucleótido de esponja (ejemplo) y del oligonucleótido con monómero de cebo (ejemplo de referencia) sobre la actividad de hsa-miR-16-5p (miR-16) en las células HCT116

(1) Material

45 1-a: oligonucleótido

Tal y como se muestra en las secuencias de bases mencionadas más adelante y en la tabla 1 que viene después, los inhibidores de micro-ARN en donde las secuencias complementarias a la secuencia de hsa-miR-16-5P (micro-ARN) estaban conectadas por Gly (la G1 anteriormente mencionada) o GlyGly (la G2 anteriormente mencionada) se utilizaron para medir su efecto supresor del micro-ARN (actividad inhibidora de

micro-ARN). En lo que viene a continuación, hsa-miR-16-5p se cita simplemente como «miR-16». En el presente ejemplo y los correspondientes ejemplos mencionados más adelante (incluidos los ejemplos de referencia), el micro-ARN es miR-16, a menos que se especifique otra cosa.

5 En el presente ejemplo (ejemplo 2) y en cada uno de los ejemplos que viene a continuación, un inhibidor de micro-ARN que tiene dos o más secuencias complementarias a la secuencia del micro-ARN se denomina «oligonucleótido de esponja» u «oligo esponja». Un inhibidor de micro-ARN (ejemplo de referencia) que tiene solo una secuencia complementaria a la secuencia del micro-ARN se denomina «oligonucleótido con monómero de cebo» o «cebo monomérico». Además, en el presente ejemplo (ejemplo 2) y en cada uno de los ejemplos mencionados a continuación, «tipo perfecto» hace referencia a un inhibidor de micro-ARN que tiene una estructura completamente concordante de la figura 3(a), el «tipo abultamiento» se refiere a un inhibidor de micro-ARN que tiene una estructura discordante de la figura 3(b) y el «tipo burbuja» se refiere a un inhibidor de micro-ARN que tiene una estructura discordante de la figura 3(c).

Ejemplo 2-1

spo-D-3 (oligo esponja de tipo burbuja que contiene Gly)

15 5' -Gly-CGCCAATATTCGATGCTGCTA-Gly-CGCCAATATTCGATGCTGCTA-Gly-
CGCCAATATTCGATGCTGCTA-Gly-T-3' (SEQ ID NO: 2)

Ejemplo de referencia 2-1

spo-D-7 (cebo monomérico de tipo burbuja que contiene Gly)

5'-Gly-CGCCAATATTCGATGCTGCTA-Gly-T-3' (SEQ ID n.º 3)

Ejemplo 2-2

20 spo-D-13 (oligo esponja de tipo perfecto que contiene GlyGly)

5' -GlyGly-CGCCAATATTTACGTGCTGCTA-GlyGly-CGCCAATATTTACGTGCTGCTA-
GlyGly-CGCCAATATTTACGTGCTGCTA-GlyGly-T-3' (SEQ ID NO: 4)

Ejemplo de referencia 2-2

spo-D-14 (cebo monomérico de tipo perfecto que contiene GlyGly)

5'-GlyGly-CGCCAATATTTACGTGCTGCTA-GlyGly-T-3' (SEQ ID n.º 5)

25 Ejemplo 2-3

spo-D-16 (oligo esponja de tipo burbuja que contiene GlyGly)

5' -GlyGly-CGCCAATATTCGATGCTGCTA-GlyGly-CGCCAATATTCGATGCTGCTA-
GlyGly-CGCCAATATTCGATGCTGCTA-GlyGly-T-3' (SEQ ID NO: 6)

Ejemplo de referencia 2-3

spo-D-17 (cebo monomérico de tipo burbuja que contiene GlyGly)

30 5'-GlyGly-CGCCAATATTCGATGCTGCTA-GlyGly-T-3' (SEQ ID n.º 7)

Como control negativo para cada uno de los ejemplos 2-1 a 2-3 mencionados más arriba, se utilizaron los siguientes ejemplos de referencia 2-4 a 2-6.

Ejemplo de referencia 2-4

spo-D-9 (control negativo de oligo esponja de tipo burbuja que contiene Gly)

35 5' -Gly-CGCCAATATTCATTATAAGA-Gly-CGCCAATATTCATTATAAGA-Gly-
CGCCAATATTCATTATAAGA-Gly-T-3' (SEQ ID NO: 8)

Ejemplo de referencia 2-5

spo-D-18 (control negativo de oligo esponja de tipo perfecto que contiene GlyGly)

ES 2 765 819 T3

5' -GlyGly-CGCCAATATTTACGTAATTACA-GlyGly-CGCCAATATTTACGTAATTACA-
GlyGly-CGCCAATATTTACGTAATTACA-GlyGly-T-3' (SEQ ID NO: 9)

Ejemplo de referencia 2-6

spo-D-20 (control negativo de oligo esponja de tipo burbuja que contiene GlyGly)

5' -GlyGly-CGCCAATATTTCCATTATAAGA-GlyGly-CGCCAATATTTCCATTATAAGA-
GlyGly-CGCCAATATTTCCATTATAAGA-GlyGly-T-3' (SEQ ID NO: 10)

- 5 Además, como los inhibidores de micro-ARN de los ejemplos de referencia 2-7 y 2-8 que vienen a continuación se utilizaron el control positivo (ANB-miR16) del efecto supresor sobre la actividad de miR-16 y la siguiente molécula de ANB (fabricada por EXIQON) que es un control negativo del mismo (ANB-ContrNeg).

Ejemplo de referencia 2-7

Inhibidor potente de micro-ARN ANB miRCURY de hsa-miR-16 (426845-00) (ANB-miR16)

- 10 GCCAATATTTACGTGCTGCT (SEQ ID n.º 11)

Ejemplo de referencia 2-8

Control B antisentido potente de micro-ARN ANB-TM miRCURY (199021-00) (ANB-ContrNeg).

AGAGCTCCCTCAATCCAAA (SEQ ID n.º 12)

- 15 Se prepararon las soluciones acuosas de los oligonucleótidos anteriormente mencionados con agua destilada para la inyección a una concentración de 10 µM.

Tabla 1

Ejemplo 2-1	spo-D-3 (D-3 G-esponja)	oligo esponja de tipo burbuja que contiene Gly
Ejemplo 2-2	spo-D-13 (D-13 GG-esponja)	oligo esponja de tipo perfecto que contiene GlyGly
Ejemplo 2-3	spo-D-16 (D-16 GG-esponja)	oligo esponja de tipo burbuja que contiene GlyGly
Ejemplo de referencia 2-1	spo-D-7 (D-7 G-monómero)	cebo monomérico de tipo burbuja que contiene Gly
Ejemplo de referencia 2-2	spo-D-14 (D-14 GG-monómero)	cebo monomérico de tipo perfecto que contiene GlyGly
Ejemplo de referencia 2-3	spo-D-17 (D-17 GG-monómero)	cebo monomérico de tipo burbuja que contiene GlyGly
Ejemplo de referencia 2-4	spo-D-9 (D-9 G-ContrNeg)	Control negativo de oligo esponja de tipo burbuja que contiene Gly
Ejemplo de referencia 2-5	spo-D-18 (D-18 GG-ContrNeg)	Control negativo de oligo esponja de tipo perfecto que contiene GlyGly
Ejemplo de referencia 2-6	spo-D-20 (D-20 GG-ContrNeg)	Control negativo de oligo esponja de tipo burbuja que contiene GlyGly
Ejemplo de referencia 2-7	ANB-miR16	
Ejemplo de referencia 2-8	ANB-ContrNeg	

1-b: línea celular y medio

- 20 La línea celular utilizada fue la línea HCT116 (ATCC) de células de cáncer de colon de humano. Como medio, se utilizó el medio DMEM con SBF (Nacalai) al 10% para el cultivo a 37 °C en presencia de CO₂ al 10%.

1-c: plásmido indicador

Como plásmido indicador, se utilizó un plásmido con el siguiente gen indicador.

(1) pGL4-miR16

5 El vector pGL4.74[hRluc/TK] de Promega KK es, tal y como se muestra en la figura 5, un plásmido que expresa el gen de la luciferasa de *Renilla* bajo el control del promotor HSV-TK. El pGL4-miR16 es un plásmido que incorpora una secuencia destinataria de miR-16 que va detrás del gen de la luciferasa en este vector, que tiene una estructura que suprime el nivel de expresión de la luciferasa mediante la actividad de miR-16.

(2) pGL4-NTC

10 El pGL4-NTC es un plásmido que incorpora una secuencia inespecífica que no reacciona con el miR-16 que va detrás del gen de la luciferasa en el vector pGL4.74[hRluc/TK] anteriormente mencionado y que se utilizó como control para el pGL4-miR16.

(3) pMIR-REPORT™ Luciferase

15 El pMIR-REPORT™ Luciferase de Ambion es, tal y como se muestra en la figura 6, un plásmido que expresa el gen de la luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor del CMV. Se utilizó para valorar la eficacia de transfección por cotransfección con el pGL4-miR16 anteriormente mencionado o con el pGL4-NTC anteriormente mencionado.

(2) método

2-a: transfección del gen indicador en las células HCT116

20 Las células HCT116 anteriormente mencionadas se sembraron en una placa de 6 cm a una densidad de $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ y se cultivó en el medio DMEM (SBF al 10%) sin antibióticos. Además, se preparó (solución A) la adición de OptiMEM (Gibco, 500 μl) con pGL4-NTC (2 μg) y pMIR-REPORT™ (2 μg) o la adición de OptiMEM con pGL4-miR16 (2 μg) y pMIR-REPORT™ (2 μg). De igual forma, se añadió Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 20 μl) a OptiMEM (500 μl) en un tubo diferente (solución B). Ambas soluciones se agitaron bien, se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 min, se mezclaron la solución A y la solución B, y se dejó la mezcla a temperatura ambiente durante 20 min, tiempo durante el cual el medio de las células anteriormente mencionadas sembradas en placas se cambió por un medio recién preparado. Al cabo de 20 min, la mezcla de la solución A y la solución B anteriormente mencionada se añadió al medio de cultivo anteriormente mencionado que contiene las células, y el cultivo se dejó que continuara a 37 °C en presencia de CO₂ al 10% durante 8 h. Después, el medio de las células anteriormente mencionadas se cambió por un medio recién preparado.

2-b: transfección de oligo esponja, cebo monomérico o ANB en las células HCT116

30 Se recuperaron las células HCT116 transfectadas con el gen indicador anteriormente mencionado y se sembraron en una placa de 24 pocillos a $5 \times 10^4/\text{pocillo}$. A continuación, las células se transfectaron con el pGL4-NTC y el pMIR-REPORT™ anteriormente mencionados y las células transfectadas con el pGL4-miR16 y el pMIR-REPORT™ anteriormente mencionados se transfectaron cada una con oligo esponja, cebo monomérico o ANB. Primero, se añadió la solución de oligo esponja anteriormente mencionado a 10 μM , la solución de ANB anteriormente mencionado (1,25 μl) o la solución de cebo monomérico anteriormente mencionado a 10 μM (3,75 μl), a OptiMEM (50 μl) para preparar la solución C. Además, se añadió Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, 2 μl) a OptiMEM (50 μl) para preparar la solución D. La solución C y la solución D se dejaron cada una a temperatura ambiente durante 5 min, se mezclaron la solución C y la solución D, y se dejó a temperatura ambiente durante 20 min, tiempo durante el cual el medio de las células anteriormente mencionadas sembradas en placa se cambió por un medio recién preparado. Al cabo de 20 min, la mezcla de la solución C y la solución D anteriormente mencionada se añadió al medio de cultivo anteriormente mencionado que contiene las células HCT116 transfectadas con el gen indicador anteriormente mencionado, y el cultivo se dejó continuar a 37 °C en presencia de CO₂ al 10% durante 24 h. Después, el medio de las células anteriormente mencionadas se cambió por un medio recién preparado. En el momento de la transfección, la concentración final del oligo esponja o del ANB era de 25 nM, y la concentración final del cebo monomérico era de 75 nM.

2-c: medición de la actividad

50 Al cabo de 48 h desde la transfección de los anteriormente mencionados oligo esponja, cebo monomérico o ANB, se midió la actividad de la luciferasa de cada célula mediante el sistema de ensayo del indicador Dual-Luciferase (marca comercial registrada) (Promega KK) de acuerdo con el protocolo adjunto. El dispositivo de medición utilizado era Berthold Centro 960 (Berthold).

2-d: análisis de la actividad

Tal y como se menciona más arriba, la luciferasa de luciérnaga procedente del pMIR-REPORT™ refleja la

eficacia de la transfección y la luciferasa de *Renilla* procedente del pGL4-NTC y del pGL4-miR16 refleja la actividad del miR-16. Por lo tanto, el valor normalizado de la actividad de la luciferasa de *Renilla* se obtiene al dividir el valor de actividad ($A_{pGL4-NTC}$ o $A_{pGL4-miR16}$) de la luciferasa de *Renilla* por el valor de actividad ($A_{pMIR-REPORT (NTC)}$ o $A_{pMIR-REPORT (miR-16)}$) de la luciferasa de luciérnaga. El valor de la actividad de la luciferasa de *Renilla* procedente de pGL4-miR16 basado en el valor normalizado de la actividad de la luciferasa de *Renilla* procedente de pGL4-NTC como 1 es el valor suprimido por miR-16. Así pues, el valor del efecto supresor de la actividad de miR-16 se obtuvo mediante la siguiente fórmula de cálculo para cada uno de oligo esponja, cebo monomérico y ANB.

$$\frac{A_{pGL4-miR16}}{A_{pMTR-REPORT (miR-16)}}$$

Valor del efecto supresor de la actividad de miR-16 = $\frac{A_{pGL4-NTC}}{A_{pMIR-REPORT (NTC)}}$

(3) resultados

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 7 a 9. El eje vertical en las figuras 7 a 9 muestra el efecto supresor de la actividad de miR-16 (también denominado efecto inhibidor de la actividad o capacidad supresora de la actividad). Lo mismo se aplica a las figuras 10 a 21 que se mencionan más adelante. En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos al utilizar el oligo esponja de tipo burbuja que contiene Gly (ejemplo 2-1), en la figura 8 se muestran los resultados obtenidos al utilizar el oligo esponja de tipo perfecto que contiene GlyGly (ejemplo 2-2) y en la figura 9 se muestran los resultados obtenidos al utilizar el oligo esponja de tipo burbuja que contiene GlyGly (ejemplo 2-3). Tal y como se muestra en las figuras, se demuestra en todos los casos que el oligo esponja tiene una capacidad supresora de la actividad de miR-16 comparable a la del ANB. Además, el oligo esponja de este ejemplo es ventajoso porque, debido a la estructura del mismo, es muchísimo más cómodo y tiene una utilidad mucho más amplia que el ANB. En este ejemplo, se utilizó el cebo monomérico a una concentración del triple de la del oligo esponja para dar el mismo número de secuencias unidas a miR-16, para el oligo esponja y el cebo monomérico; sin embargo, el oligo esponja demostró una capacidad supresora de la actividad de miR-16 más elevada que el cebo monomérico. Esto indica que en el oligo esponja se produce la fijación coordinada del micro-ARN.

Ejemplo 3: efecto supresor del oligo esponja de tipo ADN y del oligo esponja de tipo ARN sobre la actividad del miR-16 en las células HCT116

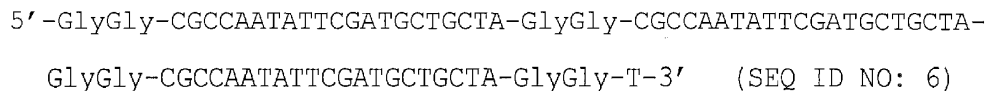
(1) material

1-a: oligonucleótido

Tal y como se muestra en la secuencia mencionada más adelante y en la tabla 2 de más adelante, los inhibidores de micro-ARN en los que las secuencias complementarias a la secuencia del miR-16 (micro-ARN) estaban conectadas por GlyGly (el G2 anteriormente mencionado) se utilizaron para medir su efecto supresor de micro-ARN (actividad inhibidora del micro-ARN).

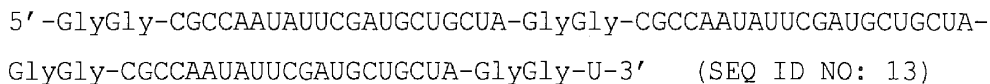
Ejemplo 3-1

spo-D-16 (oligo esponja de tipo ADN con burbuja que contiene GlyGly)



Ejemplo 3-2

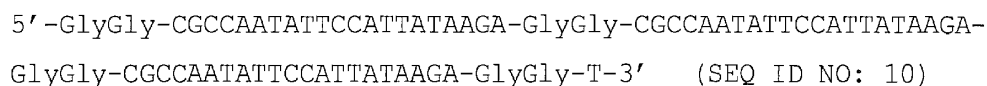
spo-R-16 (oligo esponja de tipo ARN con burbuja que contiene GlyGly)



Se utilizó el siguiente oligonucleótido de control negativo para cada uno de ellos.

Ejemplo de referencia 3-1

spo-D-20 (control negativo de oligo esponja de tipo ADN con burbuja que contiene GlyGly)



Ejemplo de referencia 3-2

spo-R-20 (control negativo de oligo esponja de tipo ARN con burbuja que contiene GlyGly)

5' -GlyGly-CGCCAAUAUCCAUUAUAAGA-GlyGly-CGCCAAUAUCCAUUAUAAGA-
GlyGly-CGCCAAUAUCCAUUAUAAGA-GlyGly-U-3' (SEQ ID NO: 14)

5 Además, como inhibidores de micro-ARN de los ejemplos de referencia 3-3 y 3-4 que vienen a continuación se utilizaron el control positivo (ANB-miR16) del efecto supresor sobre la actividad de miR-16, y la molécula de ANB (fabricada por EXIQON) que viene a continuación que es un control negativo del mismo (ANB-ContrNeg). El ejemplo de referencia 3-3 es el mismo que el ejemplo de referencia 2-7 anteriormente mencionado, y el ejemplo de referencia 3-4 es el mismo que el ejemplo de referencia 2-8 anteriormente mencionado.

Ejemplo de referencia 3-3

10 ANB-miR16 GCCAATATTTACGTGCTGCT (SEQ ID n.º 11)

Ejemplo de referencia 3-4

ANB-ContrNeg AGAGCTCCCTTCAATCCAAA (SEQ ID n.º 12)

Las soluciones acuosas de los oligonucleótidos mencionados más arriba se prepararon a 10 µM con agua destilada para la inyección.

15 Tabla 2

Ejemplo 3-1	spo-D-16 (D-16 DNA-esponja)	oligo esponja (ADN) de tipo burbuja que contiene GlyGly
Ejemplo 3-2	spo-R-16 (D-16 RNA-esponja)	oligo esponja (ARN) de tipo burbuja que contiene GlyGly
Ejemplo de referencia 3-1	spo-D-20 (D-20 ContrNeg)	Control negativo de oligo esponja de tipo burbuja que contiene GlyGly
Ejemplo de referencia 3-2	spo-R-20 (R-20 ContrNeg)	Control negativo de oligo esponja de tipo burbuja que contiene GlyGly
Ejemplo de referencia 3-3	ANB-miR16	
Ejemplo de referencia 3-4	ANB-ContrNeg	

1-b: línea celular

La línea celular y el medio utilizados eran los mismos que los del ejemplo 2.

1-c: plásmido indicador

20 Como plásmido indicador se utilizó un plásmido que contenía el mismo gen indicador que en el ejemplo 2.

(1) método

2-a: transfección del gen indicador en las células HCT116

25 Con el uso de las células HCT116 y de la misma manera que en el ejemplo 2, el plásmido del gen indicador pGL4-NTC (2 µg) y pMIR-REPORT™ (2 µg), o pGL4-miR16 (2 µg) y pMIR-REPORT™ (2 µg) se transfectaron cada uno en las células HCT116.

2-b: transfección de oligo esponja o de ANB en las células

El oligo esponja o el ANB se transfectó en las células, transfectadas con el gen indicador anteriormente mencionado, mediante un método similar al del ejemplo 2. Como resultado de la transfección, la concentración final de oligo esponja y de ANB era de 25 nM.

30 2-c: medición de la actividad

Al cabo de 48 h de la transfección de los anteriormente mencionados oligo esponja o ANB, la actividad de la

luciferasa de cada célula se midió mediante el sistema de ensayo de indicador Dual-Luciferase (marca comercial registrada) (Promega KK) de acuerdo con el protocolo adjunto. El dispositivo de medición utilizado era Berthold Centro 960 (Berthold).

2-d: análisis de la actividad

5 Mediante un método similar al del ejemplo 2, se obtuvo el valor del efecto supresor de la actividad de miR-16.

(2) resultados

10 Los resultados obtenidos se muestran en la figura 10. Tal y como se muestra en la figura, tanto el oligo esponja de tipo ADN como el oligo esponja de tipo ARN del ejemplo mostraron una capacidad supresora de la actividad de miR-16 muy alta en comparación con el control negativo. Además, el oligo esponja de tipo ADN y el oligo esponja de tipo ARN del ejemplo son ventajosos porque, debido a la estructura de los mismos, son mucho más cómodos y tienen una utilidad mucho más amplia que el ANB. Además, el oligo esponja de tipo ADN de este ejemplo mostró una capacidad supresora de la actividad del miR-16 más alta que el oligo esponja de tipo ARN, y tenía una capacidad supresora de la actividad del miR-16 tan alta como la del ANB.

15 En este ejemplo, tal y como se menciona más arriba, el oligo esponja de tipo ADN mostró un efecto supresor de la actividad de micro-ARN más alto que el oligo esponja de tipo ARN. En la presente invención, el oligo esponja de tipo ARN posiblemente tiene una capacidad supresora de la actividad de micro-ARN más alta que el oligo esponja de tipo ADN, en función de la clase de micro-ARN diana, o cuando la línea celular es diferente de la usada en este ejemplo y similares.

20 Ejemplo 4: comparación del efecto supresor de la actividad del miR-16 que tiene el oligo esponja que contiene una molécula conectora diferente en las células HCT116 y en las células HEK293T

(1) material

1-a: oligonucleótido

25 Tal y como se muestra en la secuencia de bases que se menciona a continuación y en la tabla 3 de más adelante, se utilizó un inhibidor de micro-ARN en el que una secuencia complementaria a la secuencia de miR-16 estaba conectada por Gly (el G1 anteriormente mencionado), por GlyGly (el G2 anteriormente mencionado) o por TPA para medir el efecto supresor de micro-ARN (actividad inhibidora de micro-ARN).

Ejemplo 4-1

spo-D-3 (oligo esponja de tipo burbuja que contiene Gly)

5' -Gly-CGCCAATATTCGATGCTGCTA-Gly-CGCCAATATTCGATGCTGCTA-Gly-
CGCCAATATTCGATGCTGCTA-Gly-T-3' (SEQ ID NO: 2)

30 Ejemplo 4-2

spo-D-16 (oligo esponja de tipo burbuja que contiene GlyGly)

5' -GlyGly-CGCCAATATTCGATGCTGCTA-GlyGly-CGCCAATATTCGATGCTGCTA-
GlyGly-CGCCAATATTCGATGCTGCTA-GlyGly-T-3' (SEQ ID NO: 6)

Ejemplo 4-3

spo-D-13 (oligo esponja de tipo perfecto que contiene GlyGly)

35 5' -GlyGly-CGCCAATATTTACGTGCTGCTA-GlyGly-CGCCAATATTTACGTGCTGCTA-
GlyGly-CGCCAATATTTACGTGCTGCTA-GlyGly-T-3' (SEQ ID NO: 4)

Ejemplo 4-4

spo-D-15 (oligo esponja de tipo perfecto que contiene TPA)

5' -TPA-CGCCAATATTTACGTGCTGCTA-TPA-CGCCAATATTTACGTGCTGCTA-TPA-
CGCCAATATTTACGTGCTGCTA-TPA-T-3' (SEQ ID NO: 15)

Ejemplo 4-5

spo-D-21 (oligo esponja de tipo burbuja que contiene TPA)

5' -TPA-CGCCAATATTCGATGCTGCTA-TPA-CGCCAATATTCGATGCTGCTA-TPA-
CGCCAATATTCGATGCTGCTA-TPA-T-3' (SEQ ID NO: 16)

Ejemplo 4-6

spo-D-22 (oligo esponja de tipo abultamiento que contiene TPA)

5' -TPA-CGCCAATATTTAGTTCCGTGCTGCTA-TPA-
CGCCAATATTTAGTTCCGTGCTGCTA-TPA-CGCCAATATTTAGTTCCGTGCTGCTA-TPA-
5 T-3' (SEQ ID NO: 17)

Ejemplo 4-7

spo-D-23 (oligo esponja de tipo abultamiento que contiene GlyGly)

5' -GlyGly-CGCCAATATTTAGTTCCGTGCTGCTA-GlyGly-
CGCCAATATTTAGTTCCGTGCTGCTA-GlyGly-CGCCAATATTTAGTTCCGTGCTGCTA-
10 GlyGly-T-3' (SEQ ID NO: 18)

Como oligonucleótido de control negativo para los ejemplos 4-1 a 4-7 anteriormente mencionados, se utilizaron los inhibidores de micro-ARN (los ejemplos de referencia 4-1 a 4-4 que vienen a continuación) en donde las secuencias de bases que vienen a continuación estaban conectadas por Gly (el G1 anteriormente mencionado) o por GlyGly (el G2 anteriormente mencionado) para medir el efecto supresor de micro-ARN (actividad inhibidora de micro-ARN).

Ejemplo de referencia 4-1

15 spo-D-9 (control negativo de oligo esponja de tipo burbuja que contiene Gly)

5' -Gly-CGCCAATATTCATTATAAGA-Gly-CGCCAATATTCATTATAAGA-Gly-
CGCCAATATTCATTATAAGA-Gly-T-3' (SEQ ID NO: 8)

Ejemplo de referencia 4-2

spo-D-20 (control negativo de oligo esponja de tipo burbuja que contiene GlyGly)

5' -GlyGly-CGCCAATATTCATTATAAGA-GlyGly-CGCCAATATTCATTATAAGA-
GlyGly-CGCCAATATTCATTATAAGA-GlyGly-T-3' (SEQ ID NO: 10)

20 Ejemplo de referencia 4-3

spo-D-18 (control negativo de oligo esponja de tipo perfecto que contiene GlyGly)

5' -GlyGly-CGCCAATATTTACGTAATTACA-GlyGly-CGCCAATATTTACGTAATTACA-
GlyGly-CGCCAATATTTACGTAATTACA-GlyGly-T-3' (SEQ ID NO: 9)

Ejemplo de referencia 4-4

spo-D-19 (control negativo de oligo esponja de tipo perfecto que contiene TPA)

5' -TPA-CGCCAATATTTACGTAATTACA-TPA-CGCCAATATTTACGTAATTACA-TPA-
25 CGCCAATATTTACGTAATTACA-TPA-T-3' (SEQ ID NO: 19)

Además, como inhibidores de micro-ARN de los ejemplos de referencia 4-5 y 4-6 que vienen a continuación, se utilizaron el control positivo (ANB-miR16) del efecto supresor sobre la actividad del miR-16 y la molécula de ANB (fabricada por EXIQON) que viene a continuación que es un control negativo del mismo (ANB-ContrNeg). El ejemplo de referencia 4-5 es el mismo que el ejemplo de referencia 2-7 anteriormente mencionado y el ejemplo de referencia 4-6 es el mismo que el ejemplo de referencia 2-8 anteriormente mencionado.

30 Ejemplo de referencia 4-5

ANB-miR16 GCCAATATTTACGTGCTGCT (SEQ ID n.º 11)

Ejemplo de referencia 4-6

ANB-ContrNeg AGAGCTCCCTTCAATCCAAA (SEQ ID n.º 12)

5 Los oligonucleótidos anteriormente mencionados se disolvieron a 10 µM en agua destilada para la inyección, gracias a lo cual se prepararon soluciones de ARN.

Tabla 3

Ejemplo 4-1	spo-D-3 (D-3 G-esponja)	oligo esponja de tipo burbuja que contiene Gly
Ejemplo 4-2	spo-D-16 (D-16 GG-esponja)	oligo esponja de tipo burbuja que contiene GlyGly
Ejemplo 4-3	spo-D-13 (D-13 G-esponja)	oligo esponja de tipo perfecto que contiene GlyGly
Ejemplo 4-4	spo-D-15 (D-15 TPA-esponja)	oligo esponja de tipo perfecto que contiene TPA
Ejemplo 4-5	spo-D-21 (D-21 TPA-esponja)	oligo esponja de tipo burbuja que contiene TPA
Ejemplo 4-6	spo-D-22 (D-22 TPA-esponja)	oligo esponja de tipo abultamiento que contiene TPA
Ejemplo 4-7	spo-D-23 (D-23 GG-esponja)	oligo esponja de tipo abultamiento que contiene GlyGly
Ejemplo de referencia 4-1	spo-D-9 (D-9 G-ContrNeg)	Control negativo de oligo esponja de tipo burbuja que contiene Gly
Ejemplo de referencia 4-2	spo-D-20 (D-20 GG-ContrNeg)	Control negativo de oligo esponja de tipo burbuja que contiene GlyGly
Ejemplo de referencia 4-3	spo-D-18 (D-18 GG-ContrNeg)	Control negativo de oligo esponja de tipo perfecto que contiene GlyGly
Ejemplo de referencia 4-4	spo-D-19 (D-19 TPA-ContrNeg)	Control negativo de oligo esponja de tipo perfecto que contiene TPA
Ejemplo de referencia 4-5	ANB-miR16	
Ejemplo de referencia 4-6	ANB-ContrNeg	

1-b: línea celular y medio

10 La línea celular utilizada fue la línea HCT116 (ATCC) de células del cáncer de colon de humano o la línea HEK293T (ATCC) de células del riñón embrionario de humano. Como medio, se utilizó el medio DMEM con SBF al 10% (Nacalai) para el cultivo a 37 °C en presencia de CO₂ al 10%.

1-c: plásmido indicador

Como plásmido indicador se utilizó un plásmido con el mismo gen indicador que en el ejemplo 2.

(1) método

15 2-a: transfección del gen indicador en las células HCT116 o en las células HEJ293T

Se utilizaron las células HCT116 o las células 293T de la misma manera que en el ejemplo 2, se transfectaron cada una con el plásmido del gen indicador pGL4-NTC (2 µg) y pMIR-REPORT™ (2 µg), o pGL4-miR16 (2 µg) y pMIR-REPORT™ (2 µg).

2-b: transfección del oligo esponja o del ANB en las células HCT116 o en las células HEK293T

20 El oligo esponja o el ANB se transfectó en las células, transfectadas con el gen indicador anteriormente mencionado, mediante un método similar al del ejemplo 2. Como resultado de la transfección, la concentración final del oligo esponja y del ANB era de 25 nM.

2-c: medición de la actividad

Al cabo de 48 h desde la transfección de los anteriormente mencionados oligo esponja o ANB en las células HCT116 o en las células HEK293T anteriormente mencionadas, se midió la actividad de la luciferasa de cada célula mediante el sistema de ensayo del indicador Dual Luciferase (marca comercial registrada) (Promega KK) de acuerdo con el protocolo adjunto. El dispositivo de medición utilizado era Berthold Centro 960 (Berthold).

2-d: análisis de la actividad

Mediante un método similar al del ejemplo 2, se obtuvo el valor del efecto supresor de la actividad de miR-16.

(1) resultados

Los resultados obtenidos se muestran de la figura 11 a la figura 17. En la figura 11 se muestra la comparación del oligo esponja de tipo Gly con el oligo esponja de tipo GlyGly en las células HCT116. Como resultado, se halló que el oligo esponja de tipo GlyGly tiene el efecto supresor un poco más fuerte que el de tipo Gly. De la figura 12 a la figura 17 se muestra la comparación de oligo esponja de tipo GlyGly con oligo esponja de tipo TPA. De la figura 12 a la figura 14, se utilizaron las células HCT116, y de la figura 15 a la figura 17 se muestran los resultados obtenidos con las células HEK293T. Cuando se utilizó el oligo esponja de tipo perfecto, el de tipo TPA mostraba una actividad más alta en las células HCT116 (figura 12), y la actividad de los dos era casi igual en las células HEK293T (figura 15). Cuando se utilizó el oligo esponja de tipo burbuja, el de tipo GlyGly mostraba una actividad más alta tanto en las células HCT116 como en las células HEK293T (figuras 13 y 16). Cuando se utilizó el oligo esponja de tipo abultamiento, el de tipo TPA mostraba una actividad más alta en las células HCT116 (figura 14), y el de tipo GlyGly mostraba una actividad más alta en las células HEK293T (figura 17). A partir de los resultados anteriores, se confirmó que, en el oligo esponja de este ejemplo, el de tipo TPA y el de tipo GlyGly mostraban el efecto supresor un poco más fuerte que el de tipo Gly sobre la actividad del miR-16 *in vitro*. Casi no había ninguna diferencia en el efecto supresor de la actividad de miR-16 con el de tipo TPA y con el de tipo GlyGly.

Ejemplo 5: comparación del efecto supresor de la actividad de miR-16 en las células HCT116 y en las células HEK293T que presenta el oligo esponja que contiene una secuencia de fijación al miR-16 diferente]

(1) material

1-a: oligonucleótido

Tal y como se muestra en las secuencias de bases mencionadas a continuación y en la tabla 4 de más adelante, se utilizaron los inhibidores de micro-ARN en los que las secuencias complementarias a la secuencia de miR-16 estaban conectadas por TPA para medir su efecto supresor de micro-ARN (actividad inhibidora de micro-ARN)

Ejemplo 5-1

spo-D-15 (oligo esponja de tipo perfecto que contiene TPA)

5' -TPA-CGCCAATATTTACGTGCTGCTA-TPA-CGCCAATATTTACGTGCTGCTA-TPA-
CGCCAATATTTACGTGCTGCTA-TPA-T-3' (SEQ ID NO: 15)

Ejemplo 5-2

spo-D-21 (oligo esponja de tipo burbuja que contiene TPA)

5' -TPA-CGCCAATATTCGATGCTGCTA-TPA-CGCCAATATTCGATGCTGCTA-TPA-
CGCCAATATTCGATGCTGCTA-TPA-T-3' (SEQ ID NO: 16)

Ejemplo 5-3

spo-D-22 (oligo esponja de tipo abultamiento que contiene TPA)

5' -TPA-CGCCAATATTTAGTTCCGTGCTGCTA-TPA-
CGCCAATATTTAGTTCCGTGCTGCTA-TPA-CGCCAATATTTAGTTCCGTGCTGCTA-TPA-
T-3' (SEQ ID NO: 17)

Como oligonucleótido de control negativo para los ejemplos 5-1 a 5-3 anteriormente mencionados, el inhibidor de micro-ARN del ejemplo de referencia 5-1 que viene a continuación se utilizó para medir el efecto supresor de micro-ARN (actividad inhibidora de micro-ARN).

Ejemplo de referencia 5-1

spo-D-19 (control negativo de oligo esponja de tipo perfecto que contiene TPA)

5' -TPA-CGCCAATATTTACGTAATTACA-TPA-CGCCAATATTTACGTAATTACA-TPA-
CGCCAATATTTACGTAATTACA-TPA-T-3' (SEQ ID NO: 19)

5 Además, como los inhibidores de micro-ARN de los ejemplos de referencia 5-2 y 5-3 que vienen a continuación, se utilizaron el control positivo (ANB-miR16) del efecto supresor sobre la actividad de miR-16 y la molécula de ANB (fabricada por EXIQON) que viene a continuación que es un control negativo del mismo (ANB-ContrNeg). El ejemplo de referencia 5-2 es el mismo que el ejemplo de referencia 2-7 anteriormente mencionado, y el ejemplo de referencia 5-3 es el mismo que el ejemplo de referencia 2-8 anteriormente mencionado.

Ejemplo de referencia 5-2

10 ANB-miR16 GCCAATATTTACGTGCTGCT (SEQ ID n.º 11)

Ejemplo de referencia 5-3

ANB-ContrNeg AGAGCTCCCTTCAATCCAAA (SEQ ID n.º 12)

Se prepararon las soluciones acuosas de oligonucleótidos anteriormente mencionados a 10 µM con agua destilada para la inyección.

15 Tabla 4

Ejemplo 5-1	spo-D-15 (D-15 esponja perfecto)	oligo esponja de tipo perfecto que contiene TPA
Ejemplo 5-2	spo-D-21 (D-21 esponja perfecto)	oligo esponja de tipo burbuja que contiene TPA
Ejemplo 5-3	spo-D-22 (D-22 esponja abultamiento)	oligo esponja de tipo abultamiento que contiene TPA
Ejemplo de referencia 5-1	spo-D-19 (D-19 TPA-ContrNeg)	Control negativo de oligo esponja de tipo perfecto que contiene TPA
Ejemplo de referencia 5-2	ANB-miR16	
Ejemplo de referencia 5-3	ANB-ContrNeg	

1-b: línea celular

Para medir la actividad se utilizó la misma línea celular que en el ejemplo 4.

1-c: plásmido indicador

20 Como plásmido indicador se utilizó un plásmido con el mismo gen indicador que en el ejemplo 2.

(1) método

2-a: transfección del gen indicador en las células HCT116 o en las células HEK293T

25 Con el uso de las células HCT116 o las células 293T y de la misma manera que en el ejemplo 2, el plásmido con el gen indicador pGL4-NTC (2 µg) y pMIR-REPORT™ (2 µg), o pGL4-miR16 (2 µg) y pMIR-REPORT™ (2 µg) se transfectaron cada uno en las células HCT116 o en las células HEK293T.

2-b: transfección de oligo esponja o ANB en las células HCT116 o en las células HEK293T

El oligo esponja o el ANB se transfectó en las células, transfectadas con el gen indicador anteriormente mencionado, mediante un método similar al del ejemplo 2. Como resultado de la transfección, la concentración final de oligo esponja o de ANB fue de 25 nM.

30 2-c: medición de la actividad

Al cabo de 48 h desde la transfección del oligo esponja o del ANB, se midió la actividad de la luciferasa de cada célula mediante el sistema de ensayo de indicador Dual-Luciferase (marca comercial registrada) (Promega KK)

de acuerdo con el protocolo adjunto. El dispositivo de medición utilizado era Berthold Centro 960 (Berthold).

2-d: análisis de actividad

Mediante un método similar al del ejemplo 2 se obtuvo el valor del efecto supresor de la actividad de miR-16.

(1) resultados

5 Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 18 y 19. En la figura 18 se muestra la comparación de la actividad del oligo esponja cuando la secuencia de fijación al miR-16 es de tipo perfecto, de tipo burbuja o de tipo abultamiento, cuando se usan las células HCT116. Como resultado, los tres no mostraban casi ninguna diferencia, pero el tipo perfecto y el tipo abultamiento mostraban un efecto supresor fuerte parecido sobre la actividad de miR-16 *in vitro*. En la figura 19 se muestra la comparación de la actividad del oligo esponja cuando la secuencia de fijación al miR-16 es de tipo perfecto, de tipo burbuja o de tipo abultamiento, cuando se usan las células HEK293T. Como resultado, entre estas tres, el tipo abultamiento mostraba el efecto supresor más fuerte sobre la actividad del miR-16 *in vitro*.

Esta solicitud se basa en la solicitud de patente n.º 2012-047466 registrada en Japón (fecha de registro: 4 de marzo de 2012).

15 Aplicabilidad industrial.

Ya que el inhibidor de micro-ARN descrito en la presente memoria no requiere el uso de ningún ácido nucleico modificado especial, es mejor con respecto a su amplitud de uso, y es difícil de degradar ya que las secuencias complementarias anteriormente mencionadas están conectadas (enlazadas) mediante un resto conector. Por lo tanto, el inhibidor de micro-ARN puede utilizarse ampliamente en diferentes ámbitos.

20 Explicación de los símbolos

1 inhibidor de micro-ARN

2 secuencia complementaria

3 el resto conector

Listado de secuencias

25 <110> CORPORACIÓN BONAC

<120> inhibidor de microARN

<130> N404030EP-A

30 <150> JP 2012-047466

<151> 04-03-2012

<160> 19

35 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

45 <400> 1

cacaaacat gcctgctct a 21

<210> 2

<211> 64

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

ES 2 765 819 T3

	<220>	
	<223> ADN sintético	
	<400> 2	
	cgccaatatt cgatgctgct acgccaatat togatgctgc tacgccaata ttogatgctg	60
5	ctat	64
	<210> 3	
	<211> 22	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN sintético	
15	<400> 3	
	cgccaatatt cgatgctgct at 22	
	<210> 4	
	<211> 67	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN sintético	
25	<400> 4	
	cgccaatatt tacgtgctgc tacgccaata tttacgtgct gctacgccaatatttacgtg	60
	ctgctat	67
30	<210> 5	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> ADN sintético	
	<400> 5	
40	cgccaatatt tacgtgctgc tat 23	
	<210> 6	
	<211> 64	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN sintético	
50	<400> 6	
	cgccaatatt cgatgctgct acgccaatat togatgctgc tacgccaata ttogatgctg	60
	ctat	64
	<210> 7	
	<211> 22	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN sintético	
60	<400> 7	
	cgccaatatt cgatgctgct at 22	

ES 2 765 819 T3

<210> 8
 <211> 64
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN sintético

 10 <400> 8
 cgccaatatt ccattataag acgccaatat tccattataa gacgccaata ttccattata 60

 agat 64

 <210> 9
 <211> 67
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN sintético
 20
 <400> 9
 cgccaatatt tacgtaatta cacgccaata tttacgtaat tacacgccaata tatttacgta 60

 attacat 67

 <210> 10
 <211> 64
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADN sintético
 30
 <400> 10
 cgccaatatt ccattataag acgccaatat tccattataa gacgccaata ttccattata 60

 agat 64

 35 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> ADN sintético

 <400> 11
 45 gccaatattt acgtgctgct 20

 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50

 <220>
 <223> ADN sintético

 <400> 12
 55 agagctccct tcaatccaaa 20

 <210> 13
 <211> 64
 <212> ARN
 60 <213> Secuencia artificial

ES 2 765 819 T3

	<220>		
	<223> ARN sintético		
5	<400> 13		
	cgccaauauu cgaugcugcu acgccaauau ucgaugcugc uacgccaaua uucgaugcug	60	
	cuau	64	
	<210> 14		
	<211> 64		
10	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> ARN sintético		
15	<400> 14		
	cgccaauauu ccauuauaag acgccaauau uccaauuaua gacgccaaua uuccauuaua	60	
	agau	64	
	<210> 15		
	<211> 67		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
25	<223> ADN sintético		
	<400> 15		
	cgccaatatt tacgtgctgc tacgccaata tttacgtgct gctacgcca tatttacgtg	60	
	ctgctat	67	
30	<210> 16		
	<211> 64		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> ADN sintético		
	<400> 16		
	cgccaatatt cgatgctgct acgccaatat tcgatgctgc tacgccaata ttogatgctg	60	
	ctat	64	
40	<210> 17		
	<211> 79		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> ADN sintético		
	<400> 17		
	cgccaatatt tagttccgtg ctgctacgcc aatatttagt tccgtgctgc tacgccaata	60	
50	tttagttccg tgctgctat	79	
	<210> 18		
	<211> 79		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		

ES 2 765 819 T3

<220>
<223> ADN sintético

5 <400> 18
cgccaatatt tagttccgtg ctgctacgcc aatatttagt tccgtgctgc tacgccaata 60
tttagttccg tgctgctat 79

10 <210> 19
<211> 67
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

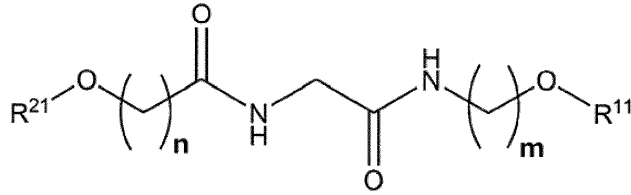
15 <220>
<223> ADN sintético

<400> 19
cgccaatatt tacgtaatta cacgccaata tttacgtaat tacacgcaa tatttacgta 60
attacat 67

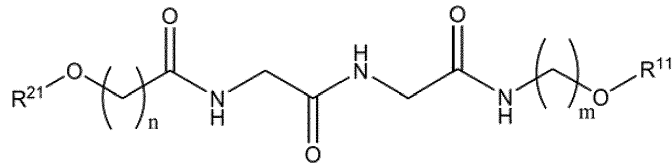
20

REIVINDICACIONES

1 Un monómero para la síntesis de una molécula de ácido nucleico, que tiene una estructura de la fórmula química (II-1), (II-4) o (II-6) que viene a continuación:

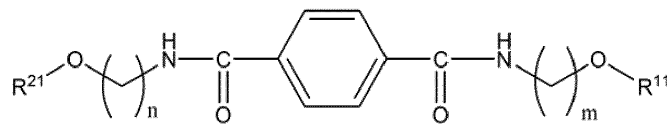


(II-1)



(II-4)

5



(II-6)

en la fórmula química (II-1), (II-4) o (II-6) anteriormente mencionada, R¹¹ es H o un grupo protector y R²¹ es un grupo protector con fosfato;

en donde, en dicha fórmula (II-1) química, n = 11 y m = 12,

10 en donde, en dicha fórmula química (II-4), n = 5 y m = 4,

en donde, en dicha fórmula química (II-6), n = 4 y m = 4.

2. El monómero de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una sustancia de marcación.

3. El monómero de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende un isótopo estable.

15 4. El monómero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es para la síntesis automática de un ácido nucleico.

5. Un método para producir una molécula de ácido nucleico, que comprende el uso del monómero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

Fig. 1

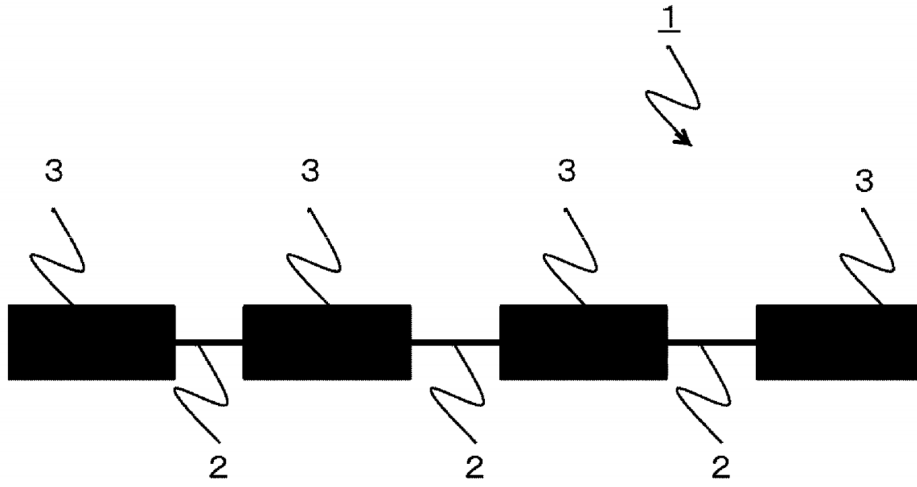


Fig. 2

5'- X = cacaaccatgcctgctgcta=X=cacaaccatgcctgctgcta=X=cacaaccatgcctgctgcta=X -3'

X es el resto glicina

Fig. 3

(a)



(b)



(c)



Fig. 4

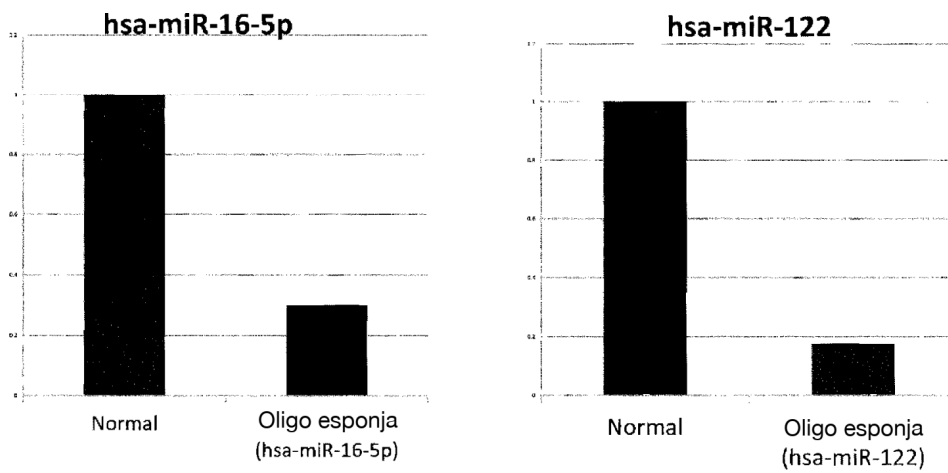


Fig. 5

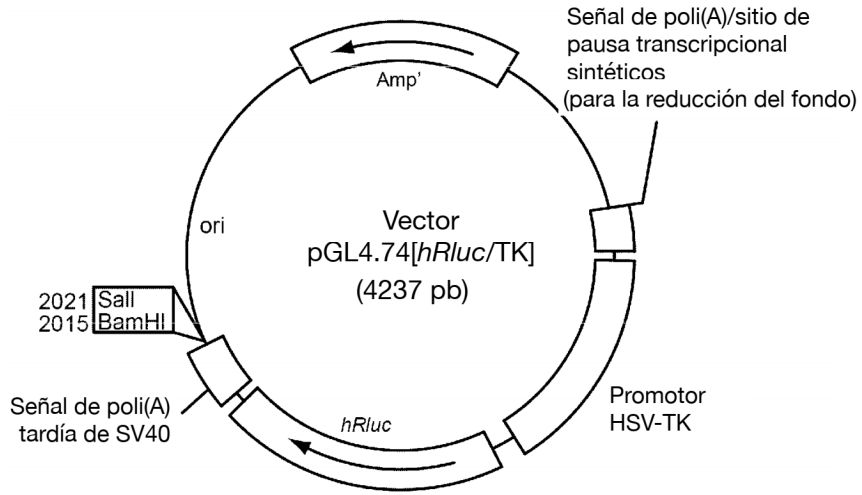


Fig. 6

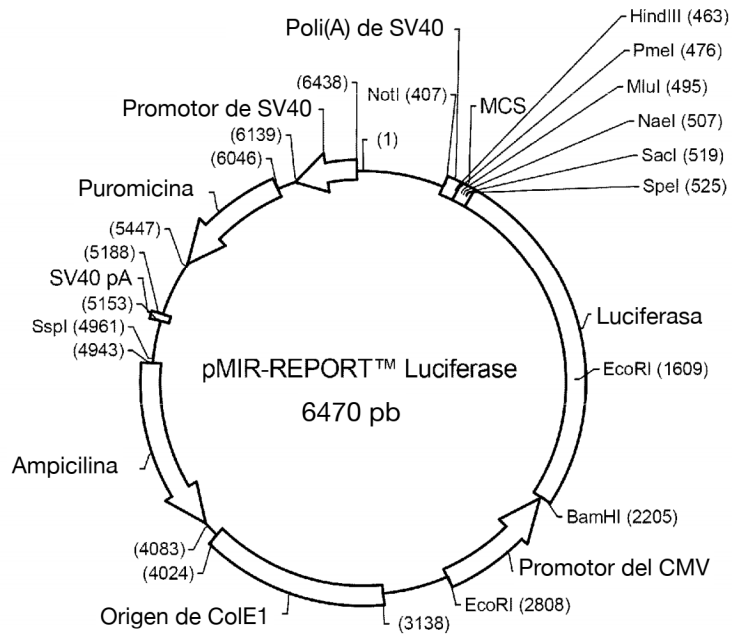


Fig. 7

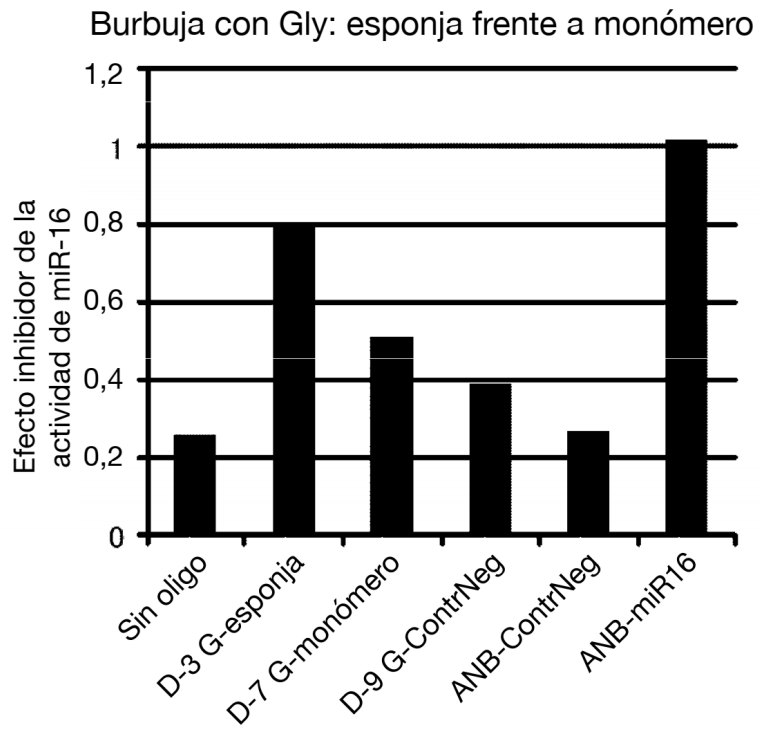


Fig. 8

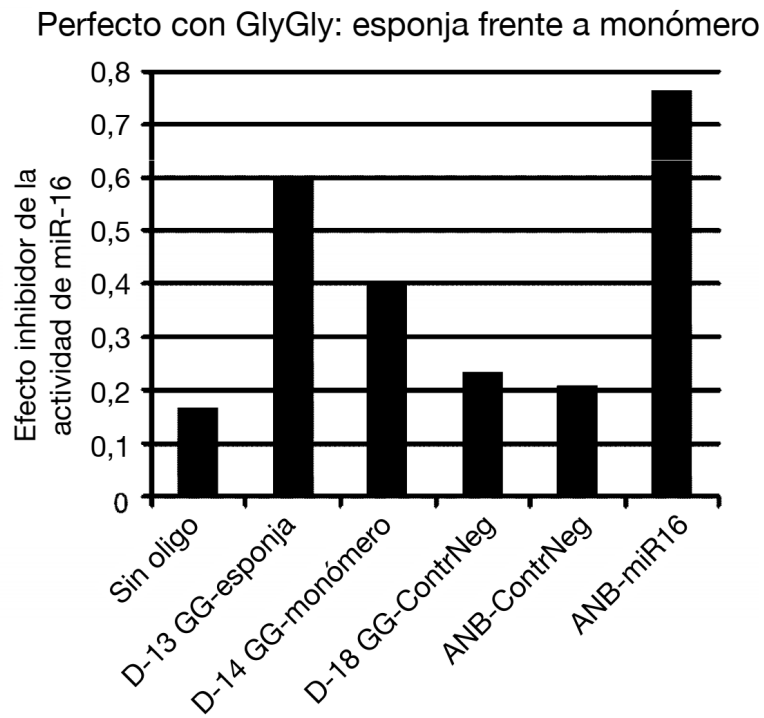


Fig. 9

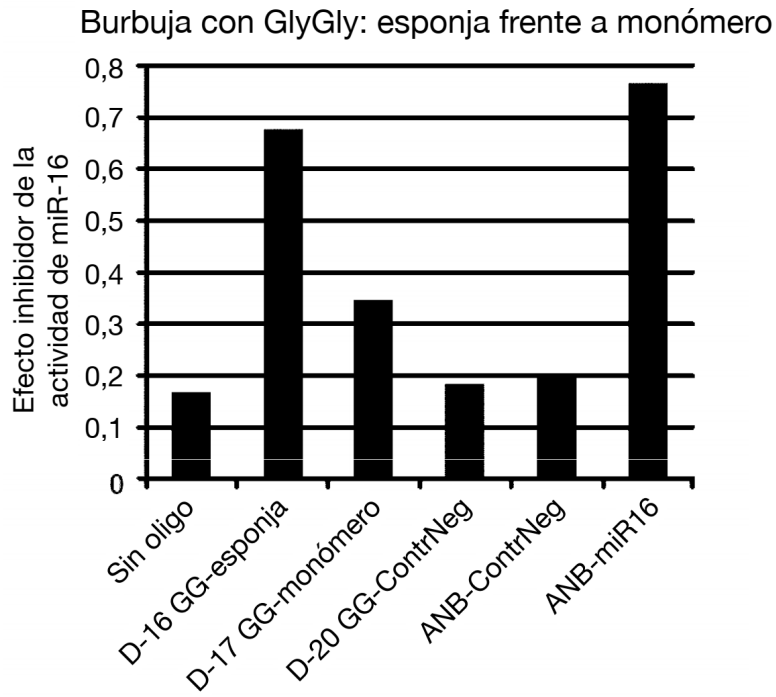


Fig. 10

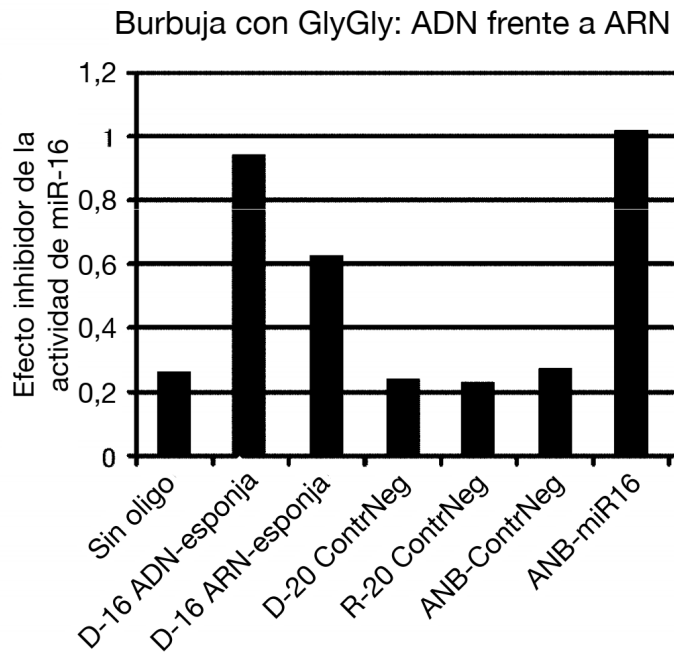


Fig. 11

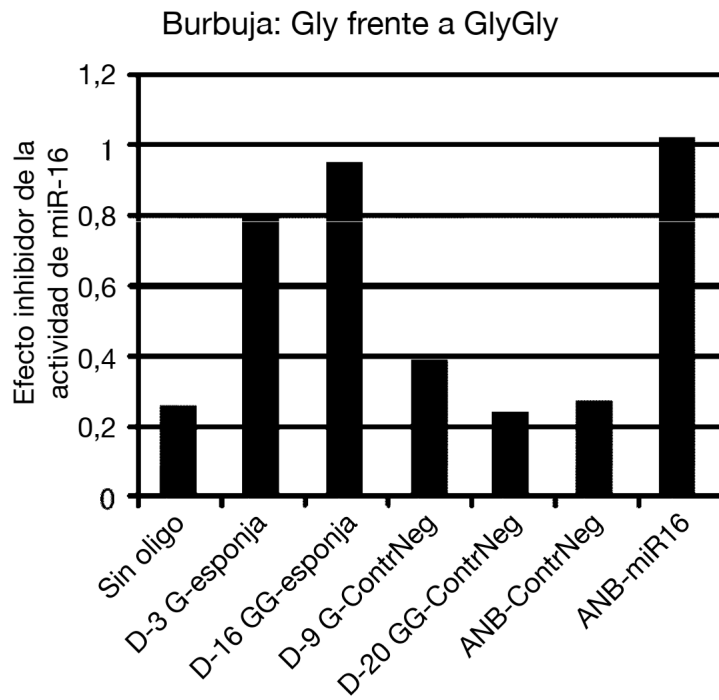


Fig. 12

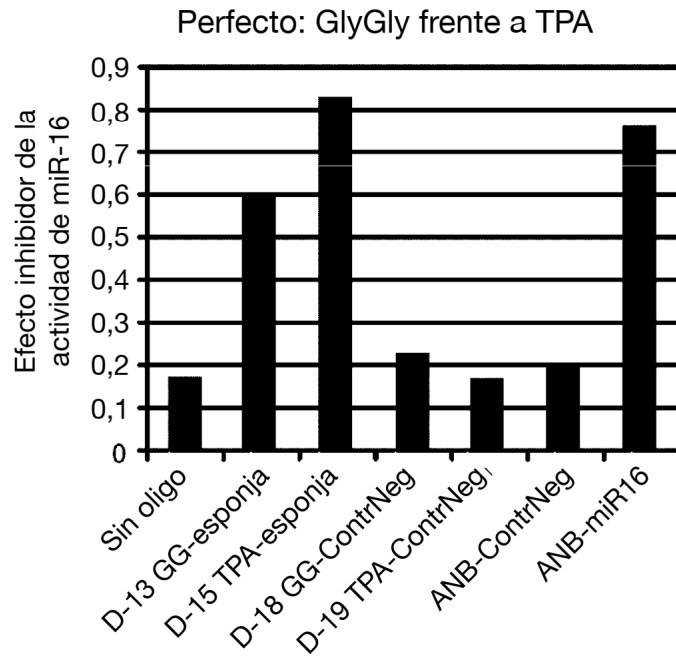


Fig. 13

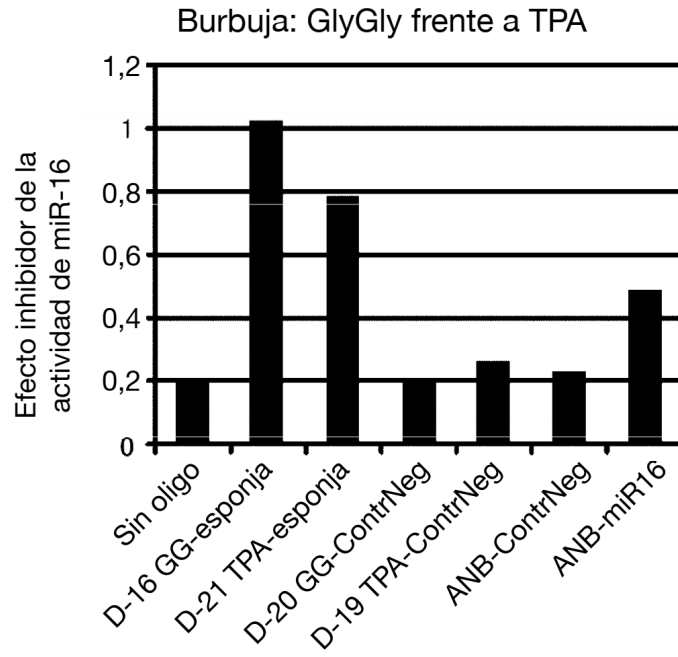


Fig. 14

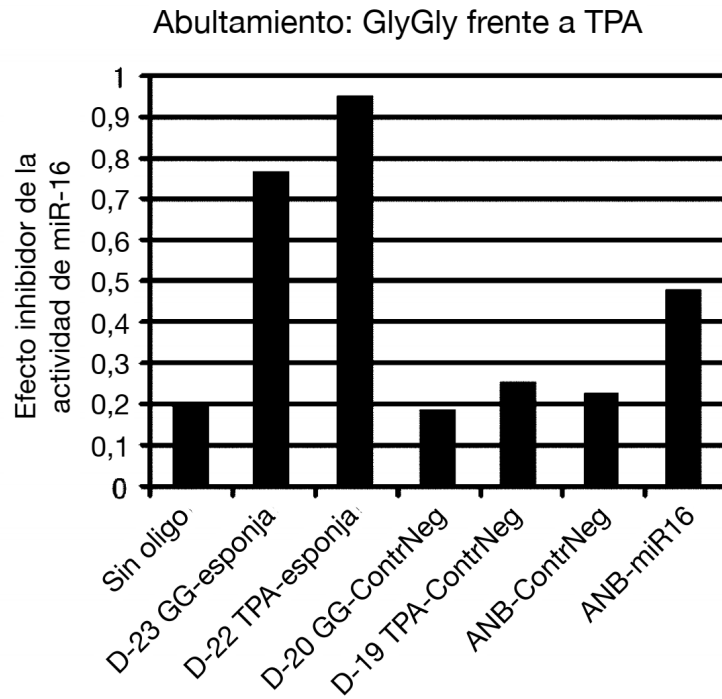


Fig. 15

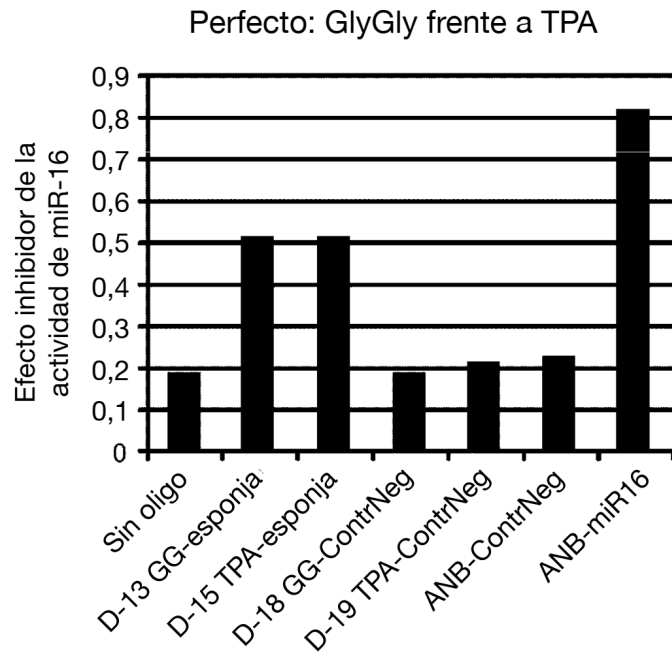


Fig. 16

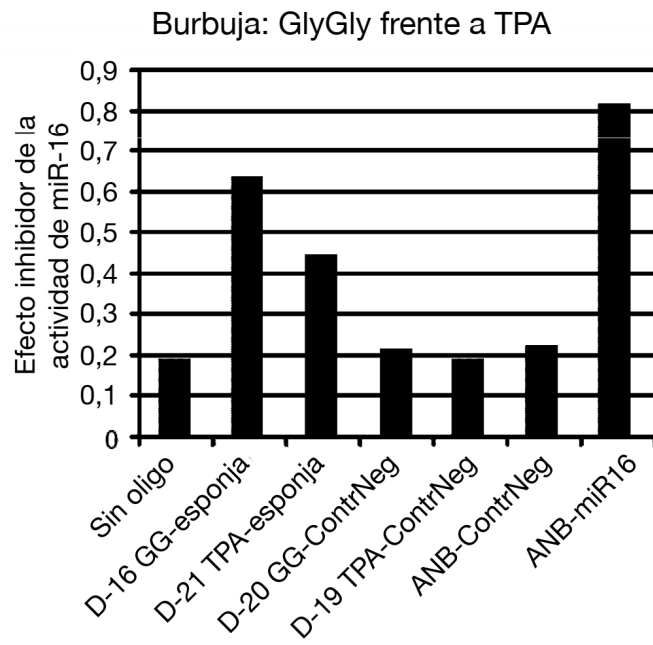


Fig. 17

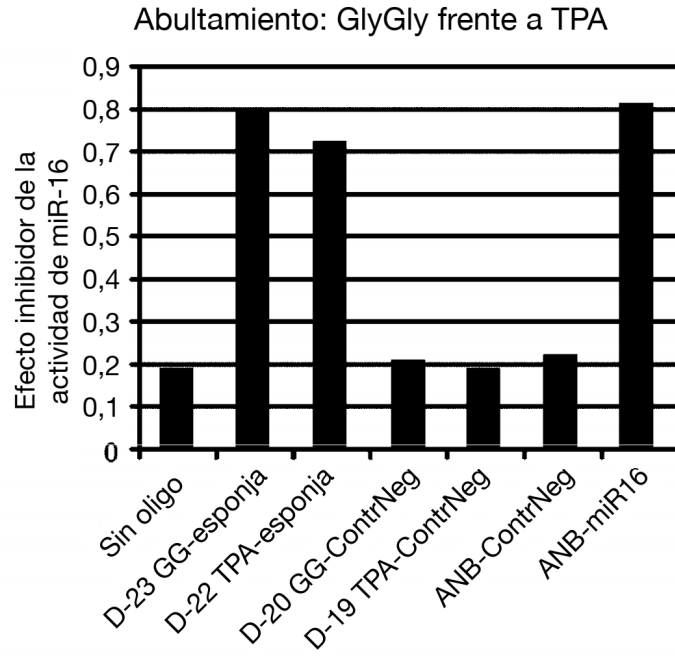


Fig. 18

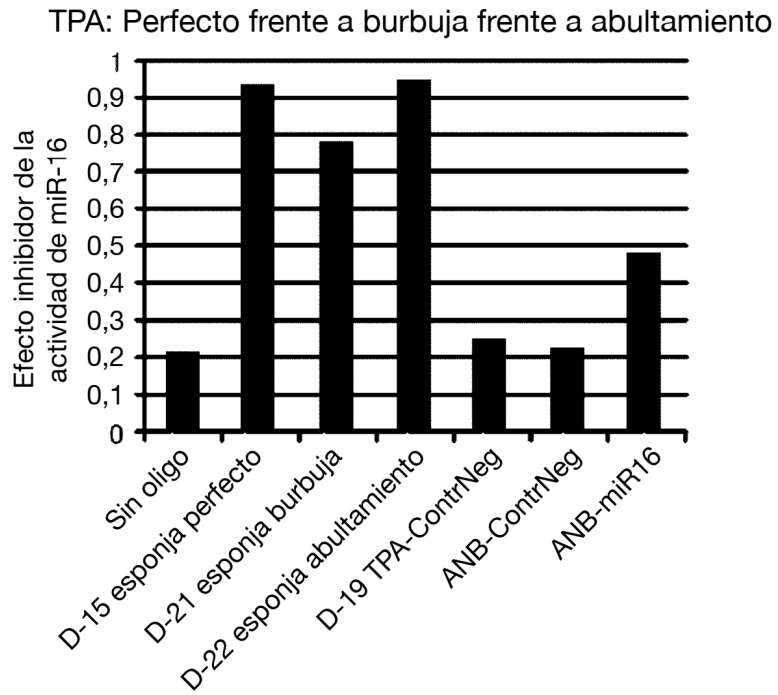


Fig. 19

