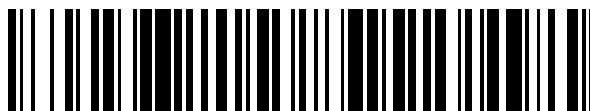


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 858 090**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

C07C 237/10 (2006.01)

C07C 247/04 (2006.01)

C07C 271/16 (2006.01)

C07H 15/04 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2017 PCT/JP2017/003249**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.08.2017 WO17131236**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2017 E 17744465 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.01.2021 EP 3409780**

54 Título: **Complejo de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

29.01.2016 JP 2016016707

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

29.09.2021

73 Titular/es:

**KYOWA KIRIN CO., LTD. (100.0%)
1-9-2, Otemachi, Chiyoda-ku
Tokyo, 100-0004, JP**

72 Inventor/es:

**UEHARA, KEIJI;
SUZUKI, YASUHIRO;
IWAI, HIROTO;
HOMMA, MASAKAZU;
FUKUDA, YUICHI y
KIUCHI, TATSUTO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 858 090 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

5 Complejo de ácidos nucleicos

Campo Técnico

10 La presente invención se refiere a un conjugado de ácidos nucleicos y a una composición farmacéutica que comprende el conjugado de ácidos nucleicos, etc.

Antecedentes de la Técnica

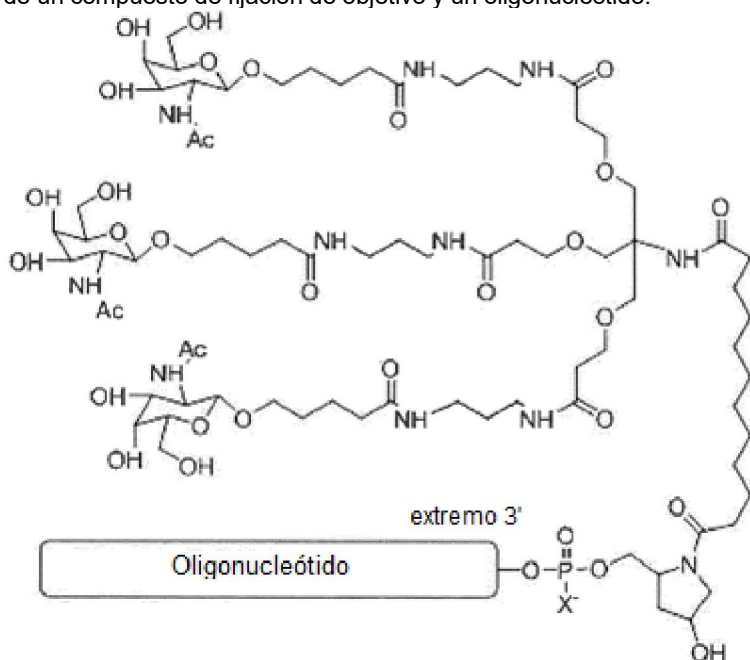
15 Por ejemplo, aptámeros, antisentidos, ácidos nucleicos señuelo, ribozimas, ARNip, mi-ARN y anti-mi-ARN se conocen como medicamentos de ácidos nucleicos. Se espera que dichos medicamentos de ácidos nucleicos se apliquen clínicamente a diversas enfermedades que antes eran difíciles de tratar, debido a su alta versatilidad que permite el control de todos los genes en las células.

20 También se espera que los medicamentos de ácidos nucleicos sean medicamentos de próxima generación después de los medicamentos de anticuerpos o de bajo peso molecular, debido a su alta selectividad y actividad en las células.

Sin embargo, un problema de los medicamentos de ácidos nucleicos es la dificultad para administrarlos a un tejido diana.

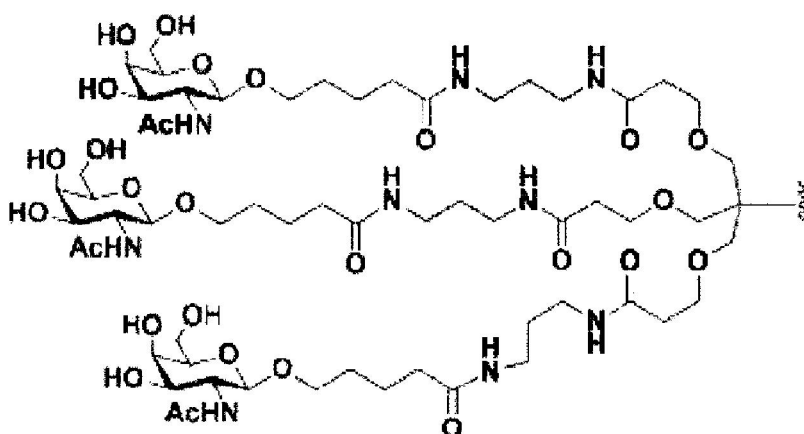
25 Se ha informado del uso de un conjugado de un compuesto de fijación de objetivo y un ácido nucleico (conjugado de ácido nucleico) como uno de los métodos para suministrar eficazmente los medicamentos de ácidos nucleicos *in vivo*. Ejemplos del compuesto de fijación de objetivo incluyen ligandos capaces de unirse a receptores expresados extracelularmente. Entre otros, existe una pluralidad de informes sobre un conjugado de ácidos nucleicos que utiliza N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) o similar como ligando capaz de unirse a un receptor de asialoglicoproteína (ASGPR) muy expresado en células del hígado. En los últimos años, se ha informado que conjugados de ácidos nucleicos que contienen ligandos de este tipo unidos a ARNip son suministrados eficazmente a las células del hígado (Bibliografía No de Patente 1).

Las Bibliografías de Patentes 1 y 2 describen, por ejemplo, el siguiente conjugado de ácido nucleico como un conjugado de un compuesto de fijación de objetivo y un oligonucleótido:

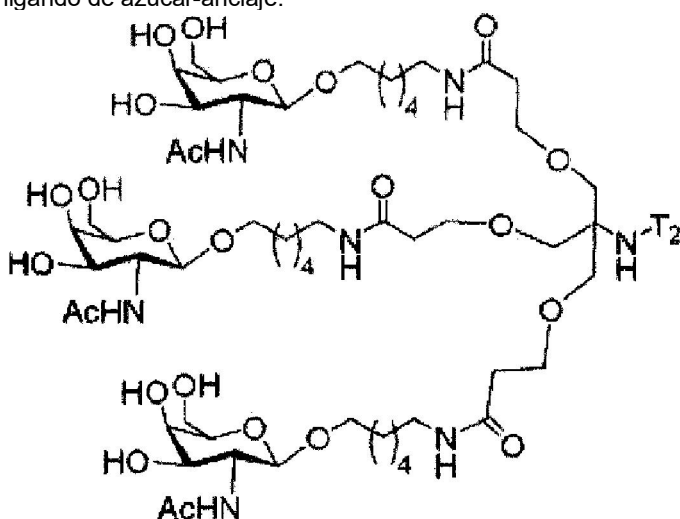


35 en donde Ac representa un grupo acetilo; en lo sucesivo, lo mismo es válido para la presente memoria descriptiva.

La Bibliografía de Patentes 3 describe un conjugado de ácido nucleico que tiene la siguiente estructura que tiene una unidad ligando de azúcar-anclaje similar a la de las Bibliografías de Patentes 1 y 2:



La Bibliografía de Patentes 4 describe un conjugado de ácidos nucleicos que tiene la siguiente estructura como una unidad ligando de azúcar-anclaje.



5

Lista de Citas

Bibliografía de Patentes

- 10 Bibliografía de Patentes 1: Publicación Internacional N° WO 2009/073809
 Bibliografía de Patentes 2: Publicación Internacional N° WO 2013/075035
 Bibliografía de Patentes 3: Publicación Internacional N° WO 2015/105083
 Bibliografía de Patentes 4: Publicación Internacional N° WO 2014/179620

- 15 Bibliografía No de Patentes

Bibliografía No de Patentes 1: Journal of American Chemical Society, 2014, Vol. 136, págs. 16958-16961

Sumario de la Invención

20

Problema Técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo conjugado de ácido nucleico.

25

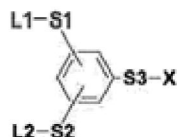
Solución al Problema

La invención se define por las reivindicaciones.

La presente divulgación se refiere a los siguientes (1) a (22):

- 30 (1) Un conjugado de ácidos nucleicos representado por la siguiente fórmula 1:

Fórmula 1:



en donde

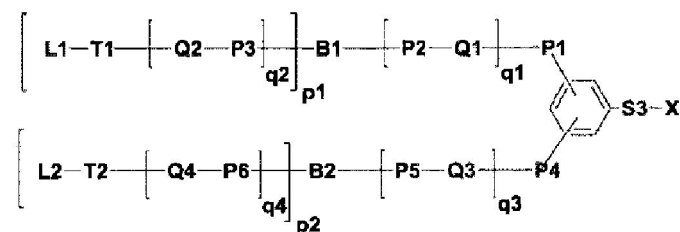
X es un oligonucleótido,

L1 y L2 son, cada uno independientemente, un ligando de azúcar, y

S1, S2 y S3 son, cada uno independientemente, un enlazador.

(2) El conjugado de ácidos nucleicos de acuerdo con (1), en donde el conjugado de ácidos nucleico tiene una estructura representada por la siguiente fórmula 2:

Fórmula 2:



en donde

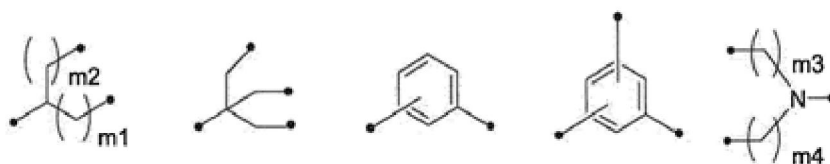
X, L1, L2 y S3 son cada uno como se define arriba,

P1, P2, P3, P4, P5 y P6, y T1 y T2 están, cada uno independientemente, ausentes, o son -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH-,

Q1, Q2, Q3 y Q4 están, cada uno independientemente, ausentes, o son alquileo con 1 a 12 átomos de carbono, sustituido o no sustituido, o $-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-$, en donde n es un número entero de 0 a 99,

B1 y B2 son, cada uno independientemente, un enlace, o cualquier estructura representada por la siguiente fórmula 2-1, en donde cada uno de los puntos terminales en cada una de las estructuras es un sitio de unión a P2 o P3, o P5 o P6, y m1, m2, m3 y m4 son, cada uno independientemente, un número entero de 0 a 10:

Fórmula 2-1:



p1 y p2 son, cada uno independientemente, un número entero de 1, 2 o 3, y

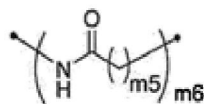
q1, q2, q3 y q4 son, cada uno independientemente, un número entero de 0 a 10,

con la condición de que cuando cada uno de p1 y p2 es un número entero de 2 o 3, cada uno de P3 y P6, Q2 y Q4, T1 y T2 o L1 y L2 sean iguales o diferentes.

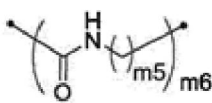
(3) El conjugado de ácidos nucleicos de acuerdo con (2), en donde P1 y P4 son cada uno independientemente -CO-NH-, -NH-CO- u -O-.

(4) El conjugado de ácidos nucleicos de acuerdo con (2) o (3), en donde $-(P2-Q1)_{q1}$ y $-(P5-Q3)_{q3}$ están cada uno independientemente ausentes, o son cualquier estructura representada por las siguientes fórmulas 3-1 a 3-3:

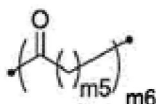
Fórmula 3-1:



Fórmula 3-2:



Fórmula 3-3:



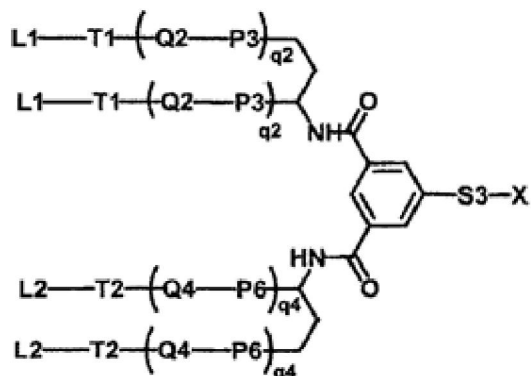
en donde

m5 y m6 son, cada uno independientemente, un número entero de 0 a 10, y cada uno de los puntos terminales en las estructuras de las fórmulas 3-1 a 3-3 es un sitio de unión a B1 o B2, o P1 o P4.

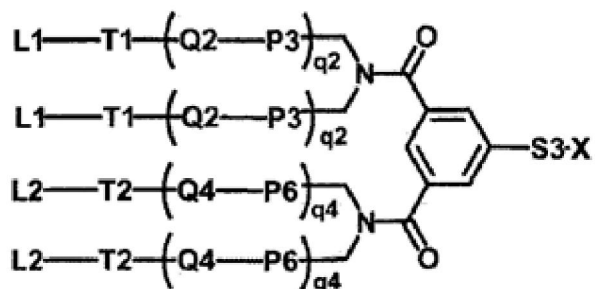
(5) El conjugado de ácidos nucleicos de acuerdo con una cualquiera de (2) a (4), en donde el conjugado de ácidos nucleicos tiene cualquier estructura representada por las siguientes fórmulas 4-1 a 4-9:

5

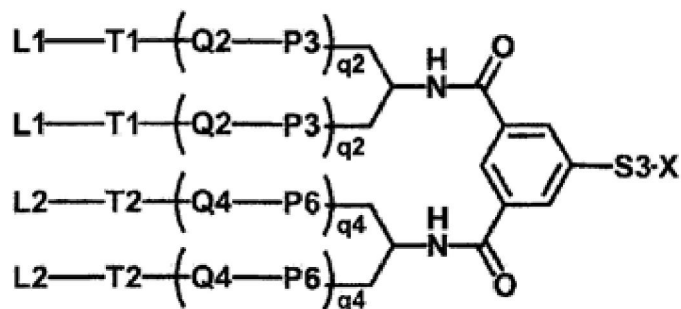
Fórmula 4-1:



Fórmula 4-2:

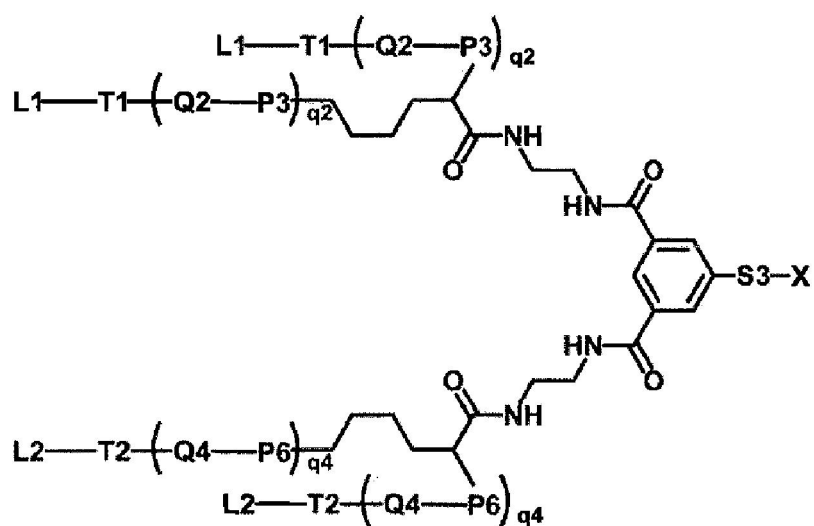


Fórmula 4-3:

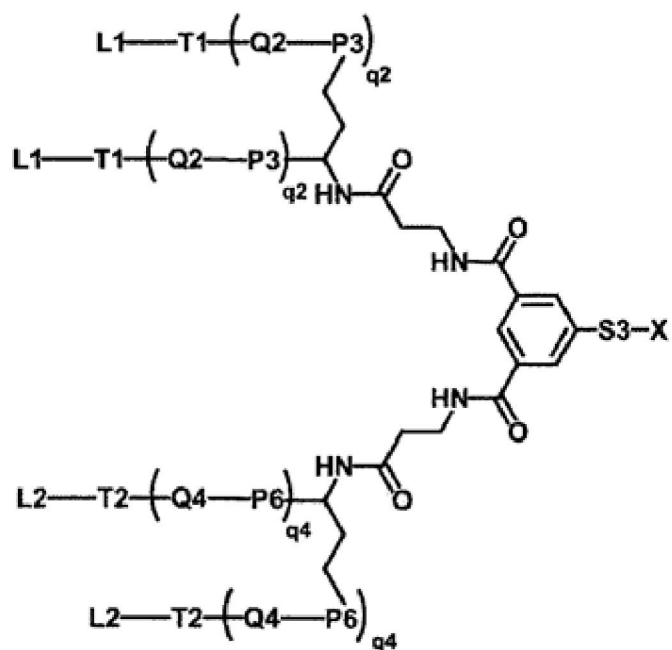


10

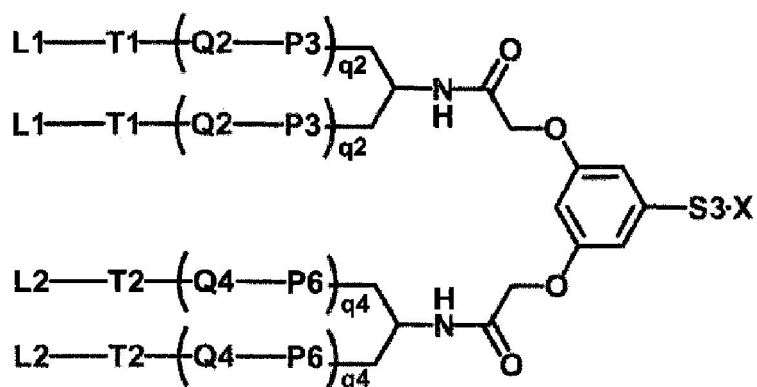
Fórmula 4-4:



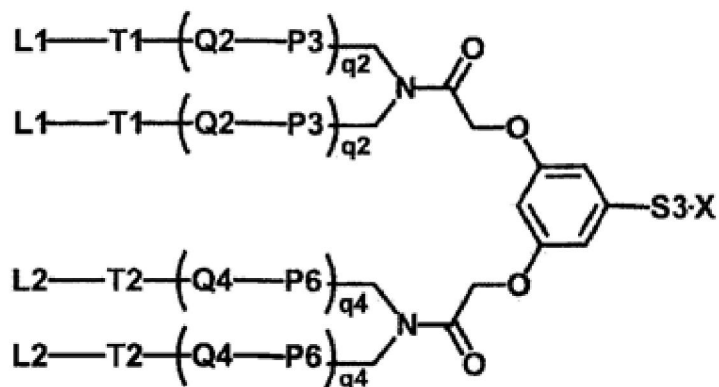
Fórmula 4-5:



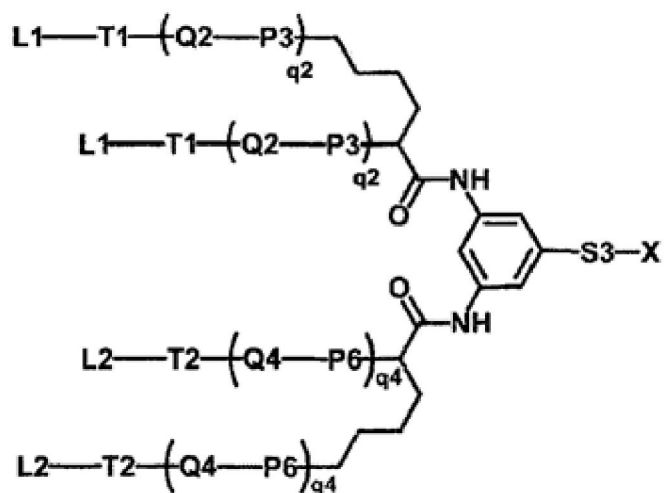
5 Fórmula 4-6:



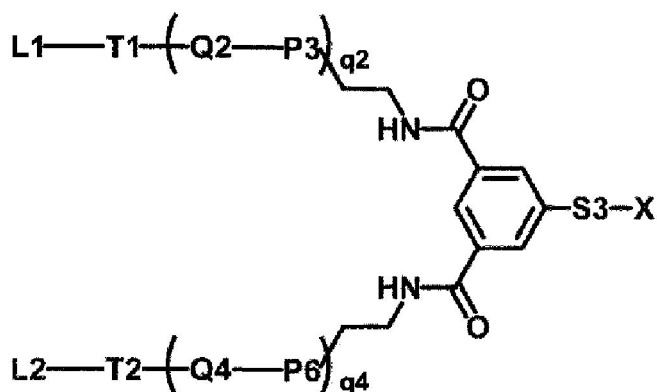
Fórmula 4-7:



Fórmula 4-8:



5 Fórmula 4-9:

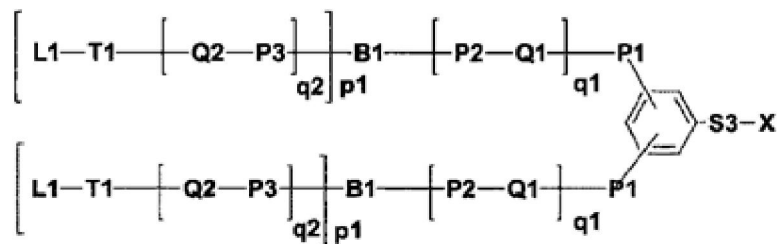


en donde

X, L1, L2, S3, P3, P6, T1, T2, Q2, Q4, q2 y q4 son cada uno como se define arriba,

10 (6) El conjugado de ácidos nucleicos de acuerdo con (1), en donde el conjugado de ácidos nucleico tiene una estructura representada por la siguiente fórmula 5:

Fórmula 5:



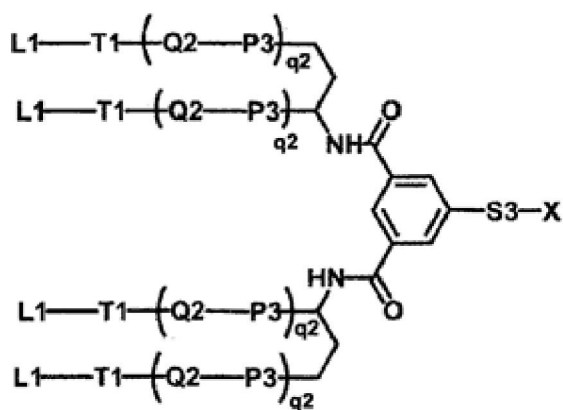
en donde

X, S3, P1, P2, P3, Q1, Q2, B1, T1, L1, p1, q1 y q2 son cada uno como se define arriba,

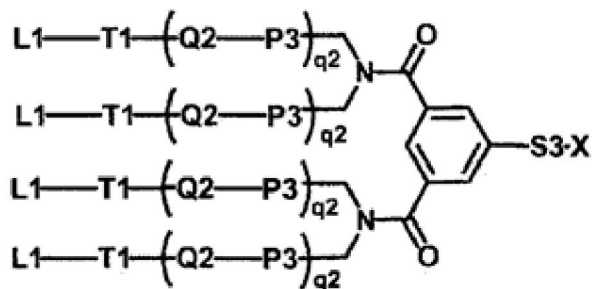
(7) El conjugado de ácidos nucleicos de acuerdo con (6), en donde P1 es -CO-NH-, -NH-CO- u-O-.

5 (8) El conjugado de ácidos nucleicos de acuerdo con (6) o (7), en donde el conjugado de ácidos nucleicos tiene cualquier estructura representada por las siguientes fórmulas 6-1 a 6-9:

Fórmula 6-1:

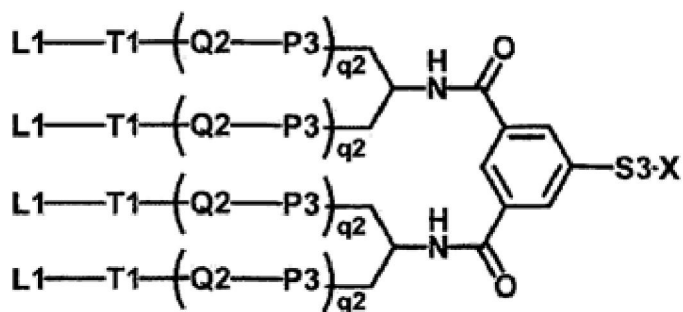


Fórmula 6-2:



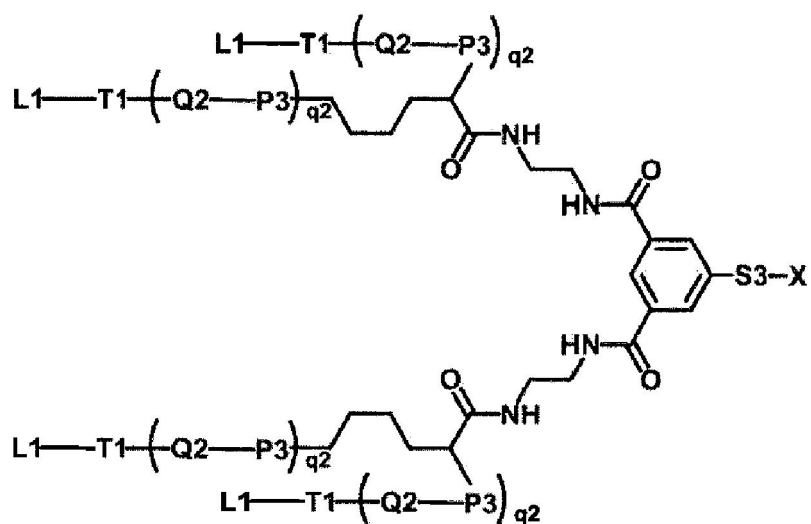
10

Fórmula 6-3:

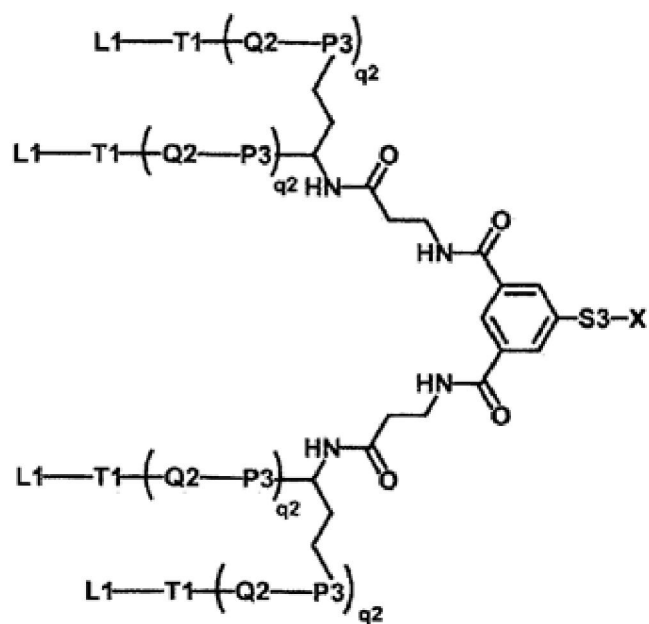


Fórmula 6-4:

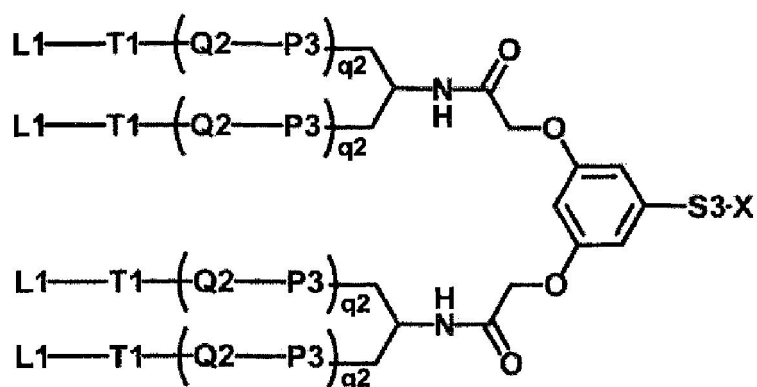
15



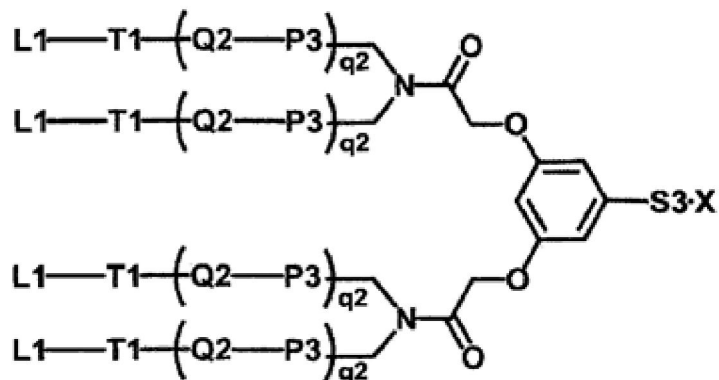
Fórmula 6-5:



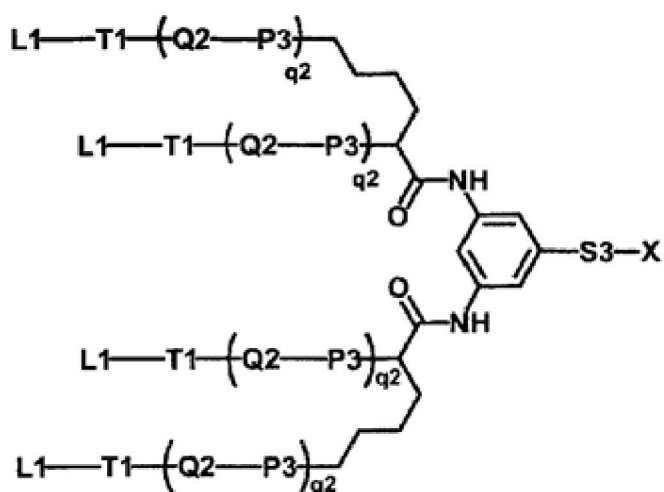
5 Fórmula 6-6:



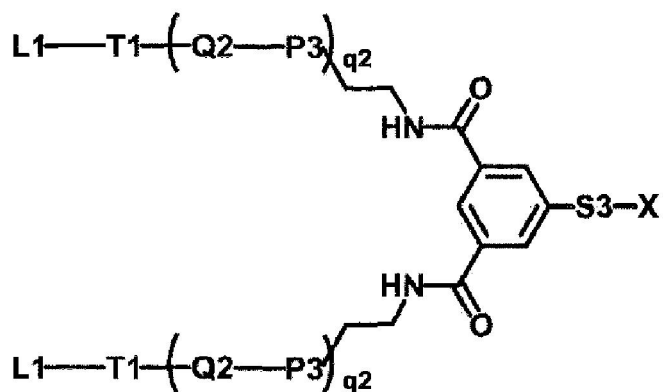
Fórmula 6-7:



Fórmula 6-8:



5 Fórmula 6-9:

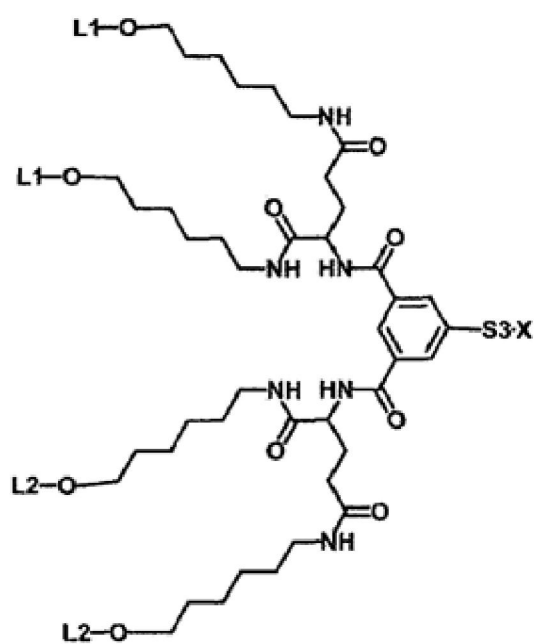


en donde

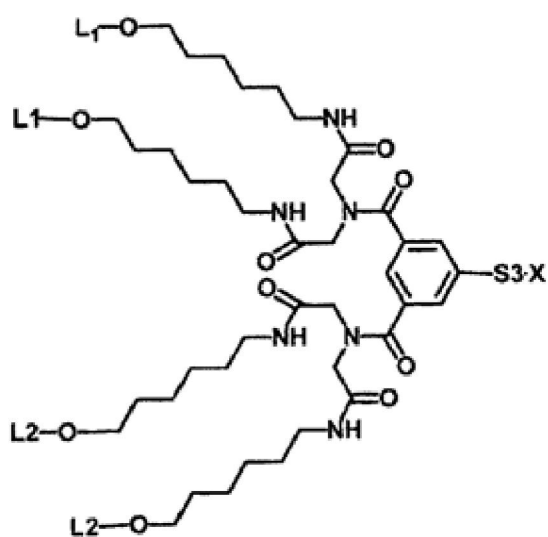
X, S3, P3, Q2, T1, L1 y q2 son cada uno como se define arriba,

10 (9) El conjugado de ácidos nucleicos de acuerdo con cualquiera de (2) a (8), en donde el conjugado de ácidos nucleicos tiene cualquier estructura representada por las siguientes fórmulas 7-1 a 7-9:

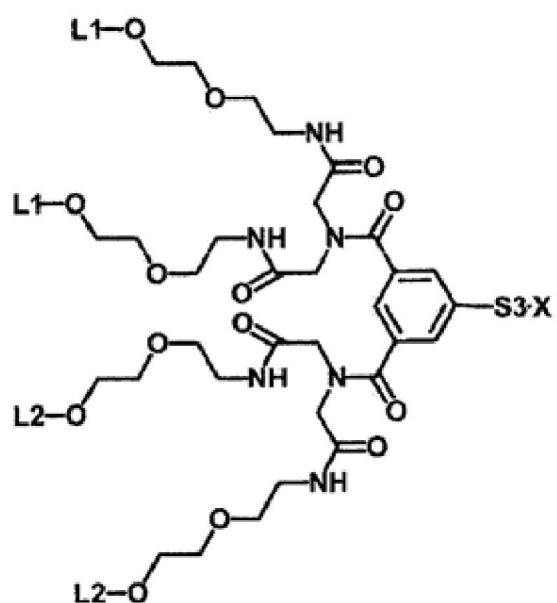
Fórmula 7-1:



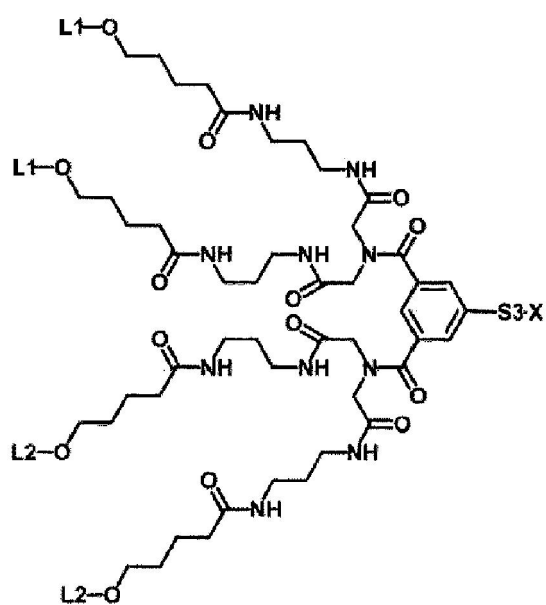
Fórmula 7-2:



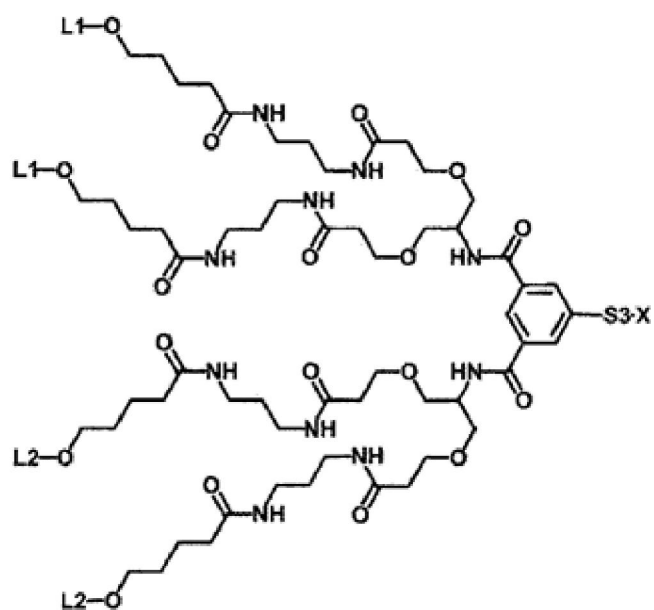
Fórmula 7-3:



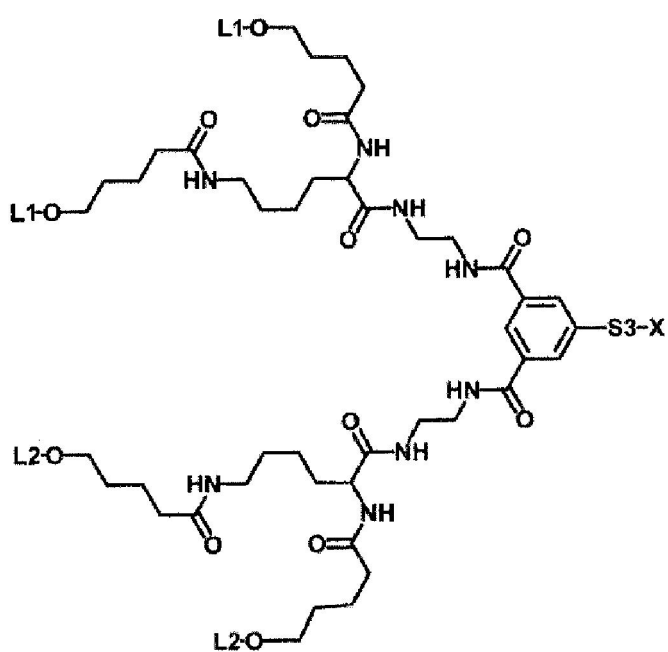
Fórmula 7-4



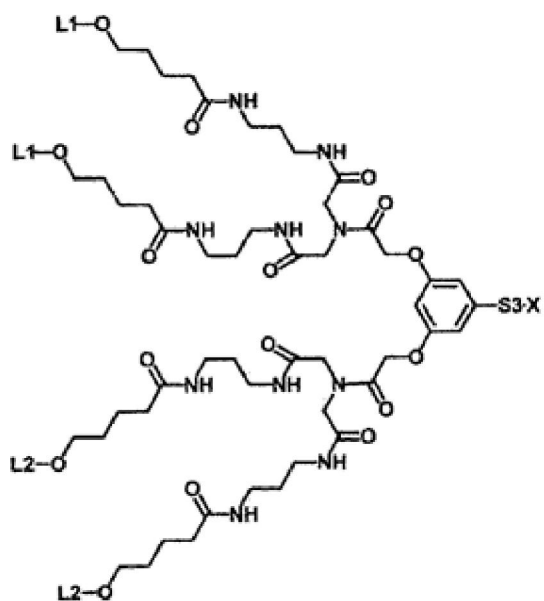
Fórmula 7-5:



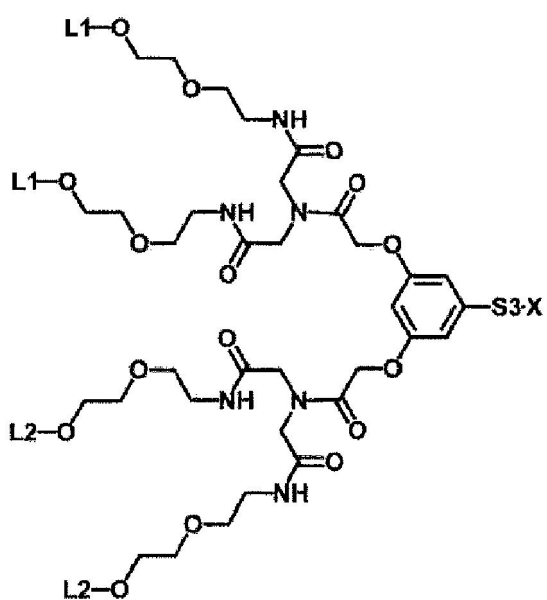
Fórmula 7-6:



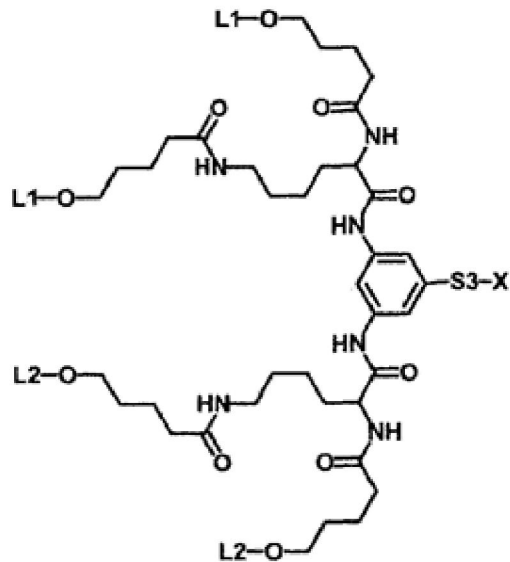
Fórmula 7-7:



Fórmula 7-8:



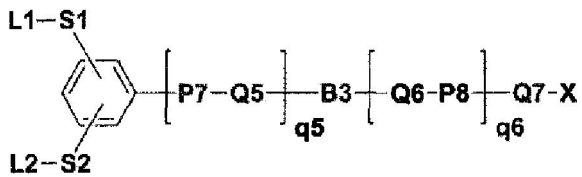
Fórmula 7-9:



(10) El conjugado de ácidos nucleicos de acuerdo con (1) a (9), en donde el conjugado de ácidos nucleico tiene una estructura representada por la siguiente fórmula 11:

Fórmula 11:

5



en donde

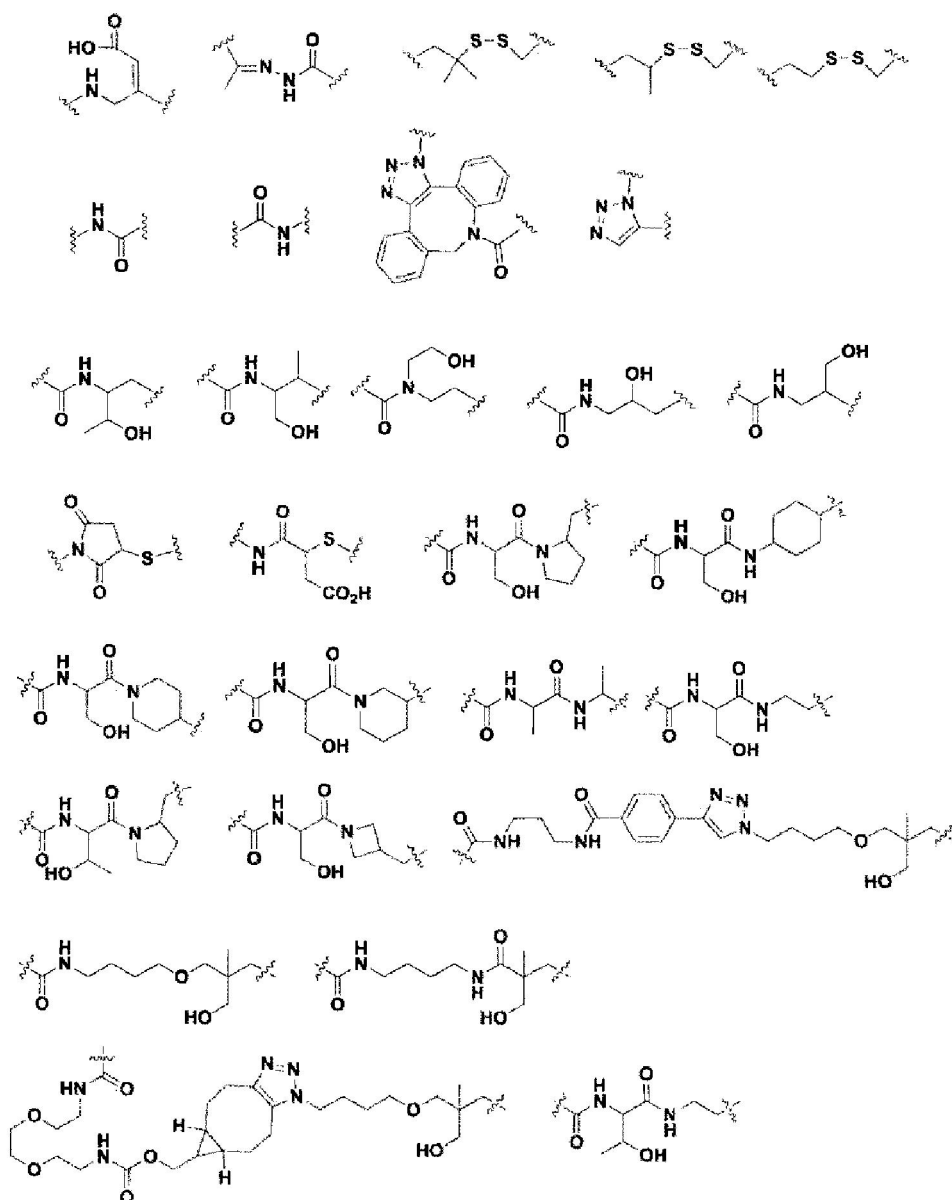
X, L1, L2, S1 y S2 son cada uno como se define arriba,

10 P7 y P8 están, cada uno independientemente, ausentes, o son -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH-,

Q5, Q6 y Q7 están, cada uno independientemente, ausentes, o son alquileo con 1 a 12 átomos de carbono, sustituido o no sustituido, o - (CH₂CH₂O)_{n8}-CH₂CH₂-, en donde n8 es un número entero de 0 a 99,

B3 es cualquier estructura representada por la siguiente fórmula 11-1, en donde las líneas discontinuas significan respectivamente enlaces a Q5 y Q6:

15 Fórmula 11-1:



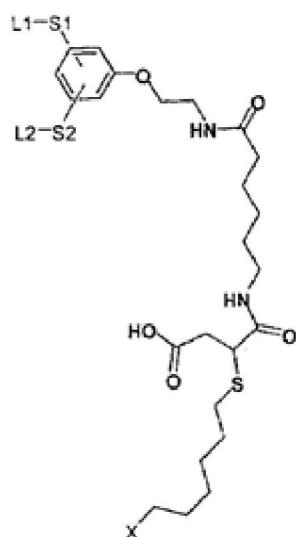
y

q5 y q6 son, cada uno independientemente, un número entero de 0 a 10,

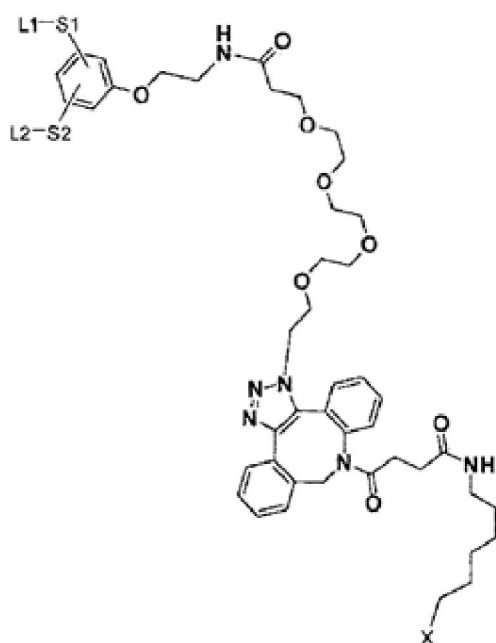
(11) El conjugado de ácidos nucleicos de acuerdo con cualquiera de (1) a (10), en donde el conjugado de ácidos nucleicos

5 tiene cualquier estructura representada por las siguientes fórmulas 12-1 a 12-12:

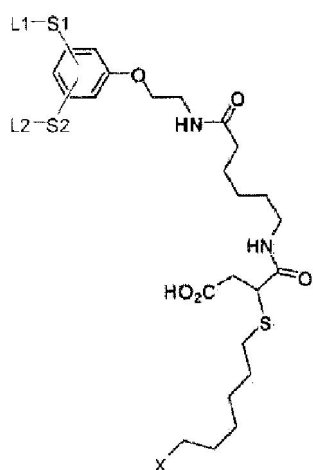
Fórmula 12-1:



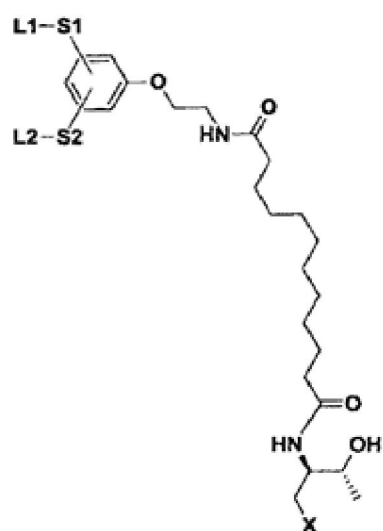
Fórmula 12-2:



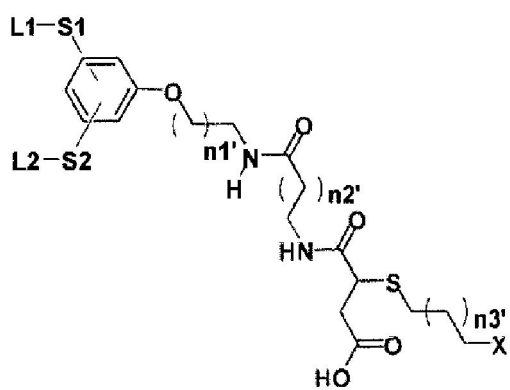
5 Fórmula 12-3:



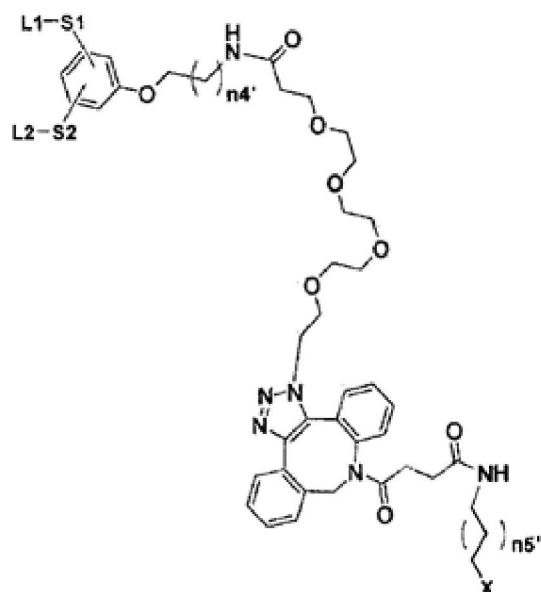
Fórmula 12-4:



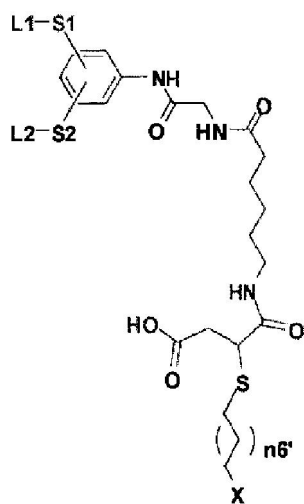
5 Fórmula 12-5:



Fórmula 12-6:

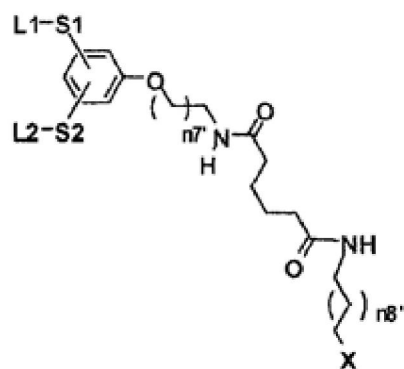


Fórmula 12-7:

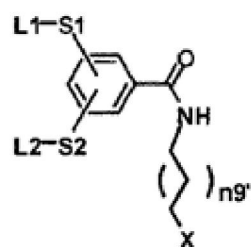


5

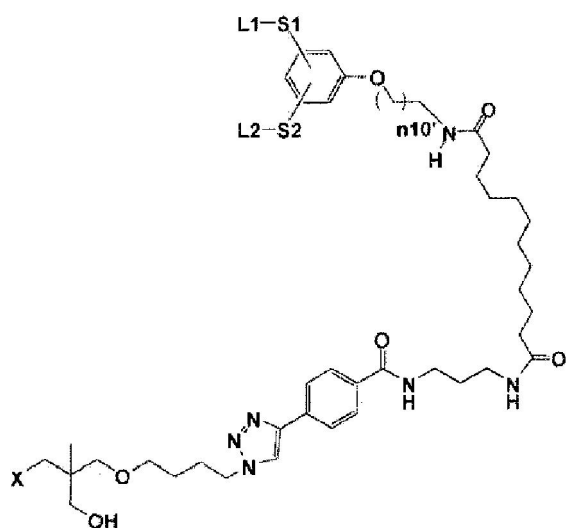
Fórmula 12-8:



Fórmula 12-9:

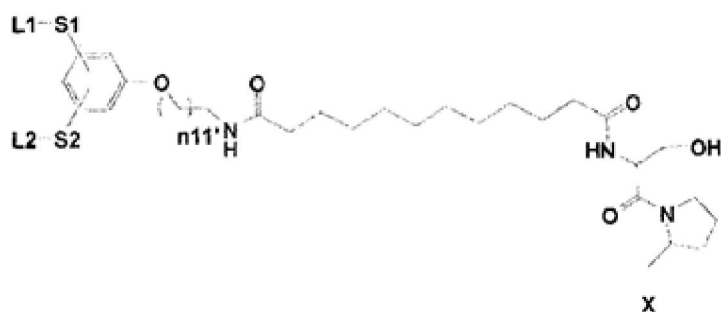


Fórmula 12-10:

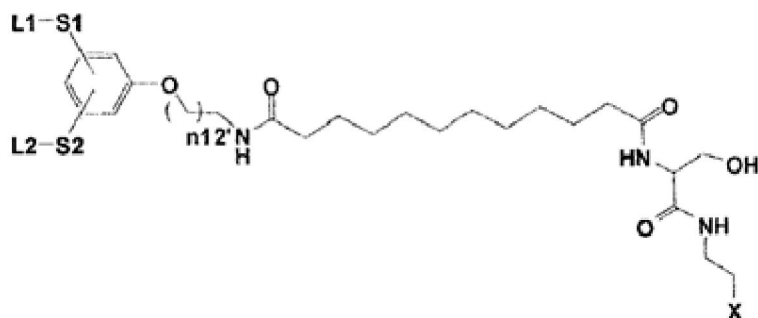


5

Fórmula 12-11:



Fórmula 12-12:



10

en donde X, L1, L2, S1 y S2 son cada uno como se definió arriba, y n1' a n12' son, cada uno independientemente, un número entero de 1 a 10.

(12) El conjugado de ácidos nucleicos de acuerdo con cualquiera de (1) a (11), en donde el ligando de azúcar es manosa o N-acetilgalactosamina.

(13) El conjugado de ácidos nucleicos de acuerdo con cualquiera de (1) a (12), en donde el oligonucleótido comprende un nucleótido modificado.

(14) Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de ácidos nucleicos de acuerdo con cualquiera de (1) a (13).

5 (15) La composición farmacéutica de acuerdo con (14), en donde la composición farmacéutica es para transferir a una célula.

(16) La composición farmacéutica de acuerdo con (15), en donde la célula es una célula del hígado.

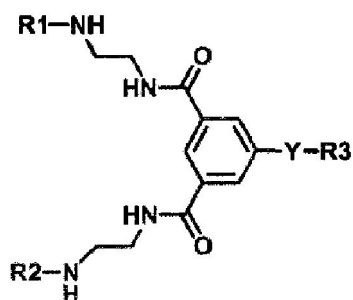
(17) La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de (14) a (16), en donde la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa o se administra por vía subcutánea.

10 (18) Un método para tratar o prevenir una enfermedad, que comprende administrar un conjugado de ácidos nucleicos de acuerdo con cualquiera de (1) a (13) o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de (14) a (17) a un paciente que lo necesite.

(19) El método de tratamiento o prevención de acuerdo con (18), en el que el paciente es un mamífero.

(20) Un compuesto representado por la siguiente fórmula 8:

15 Fórmula 8:



en donde

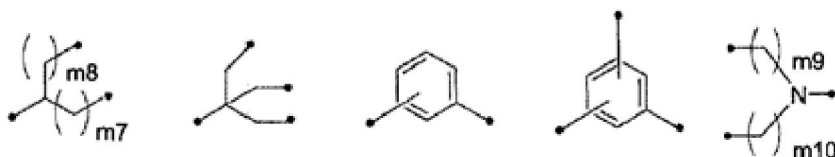
20 R1 y R2 son, cada uno independientemente, un átomo de hidrógeno, un grupo t-butoxicarbonilo, un grupo benciloxycarbonilo, un grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo, -CO-R4 o -CO-B4-[(P9-Q8)_{q7}-T3-L3]_{p3},

P9 y T3 están, cada uno independientemente, ausentes, o son -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH-,

Q8 está ausente o es alquileo con 1 a 12 átomos de carbono, sustituido o no sustituido, o -(CH₂CH₂O)_{n1}-CH₂CH₂-, en donde n1 es un número entero de 0 a 99,

25 B4 es un enlace, o cualquier estructura representada por la siguiente fórmula 8-1, en donde cada uno de los puntos terminales en cada una de las estructuras es un sitio de unión a un grupo carbonilo, o P9 y m7, m8, m9 y m10 son, cada uno independientemente, un número entero de 0 a 10:

Fórmula 8-1:



p3 es un número entero de 1, 2 o 3,

30 q7 es un número entero de 0 a 10,

L3 es un ligando de azúcar,

Y es -O- (CH₂)_{m11}-NH- o -NH-CO- (CH₂)_{m12}-NH-, en donde m11 y m12 son, cada uno independientemente, un número entero de 1 a 10,

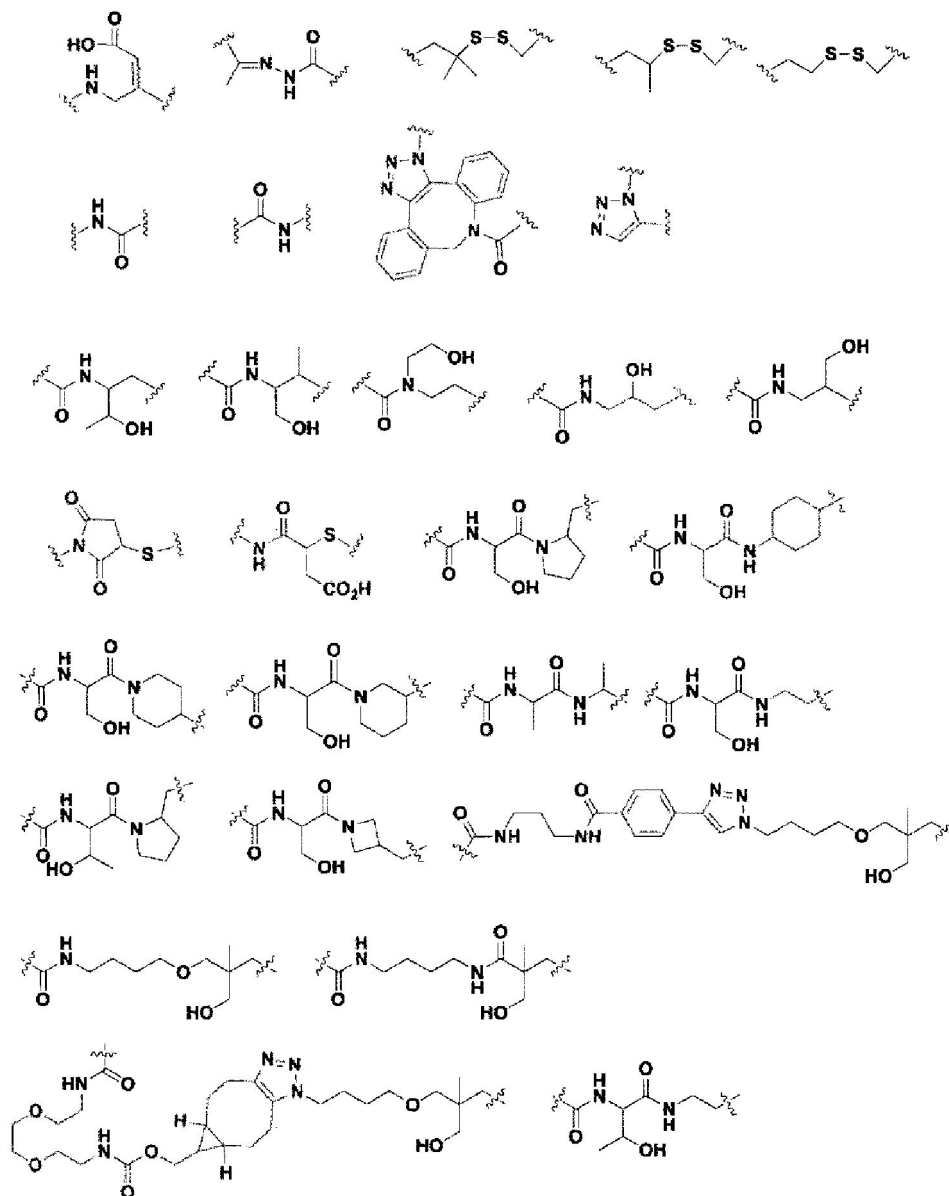
35 R3 es un átomo de hidrógeno, un grupo t-butoxicarbonilo, un grupo benciloxycarbonilo, un grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo, -CO-R4, -CO-(CH₂CH₂O)_{n2}-CH₂CH₂-N₃ o -CO-Q9-B5-(Q10-P10)_{q8}-X1, en donde n2 es un número entero de 0 a 99,

P10 está ausente, o es -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH-,

Q9 y Q10 están, cada uno independientemente, ausentes, o son alquileo con 1 a 12 átomos de carbono, sustituido o no sustituido, o -(CH₂CH₂O)_{n3}-CH₂CH₂-, en donde n3 es un número entero de 0 a 99,

40 B5 es cualquier estructura representada por la siguiente fórmula 8-2, en donde las líneas discontinuas significan respectivamente enlaces a Q9 y Q10:

Fórmula 8-2:



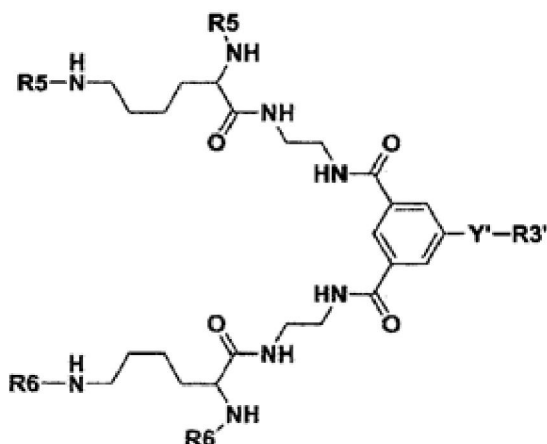
q8 es un número entero de 0 a 10,

X1 es un átomo de hidrógeno o un soporte en fase sólida, y

R4 es un grupo alquilo que tiene de 2 a 10 átomos de carbono sustituidos con 1 o 2 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un grupo amino no sustituido o sustituido con un grupo t-butoxicarbonilo, un grupo benciloxicarbonilo o un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, un grupo carboxi, un grupo maleimida y un grupo aralquilocarbonilo.

(21) Un compuesto representado por la siguiente fórmula 9:

Fórmula 9:



en donde

R5 y R6 son, cada uno independientemente, un átomo de hidrógeno, un grupo t-butoxicarbonilo, un grupo benciloxicarbonilo, un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, -CO-R4' o -CO-Q11-(P11-Q11')_{q9}-T4-L4,

5 P11 y T4 están, cada uno independientemente, ausentes, o son -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH-,

cada uno de Q11 y Q11' está ausente o es alquileo con 1 a 12 átomos de carbono, sustituido o no sustituido, o - (CH₂CH₂O)_{n4}-CH₂CH₂-, en donde n4 es un número entero de 0 a 99,

q9 es un número entero de 0 a 10,

10 L4 es un ligando de azúcar,

Y' es -O-(CH₂)_{m11'}-NH- o -NH-CO-(CH₂)_{m12'}-NH-, en donde m11' y m12' son, cada uno independientemente, un número entero de 1 a 10,

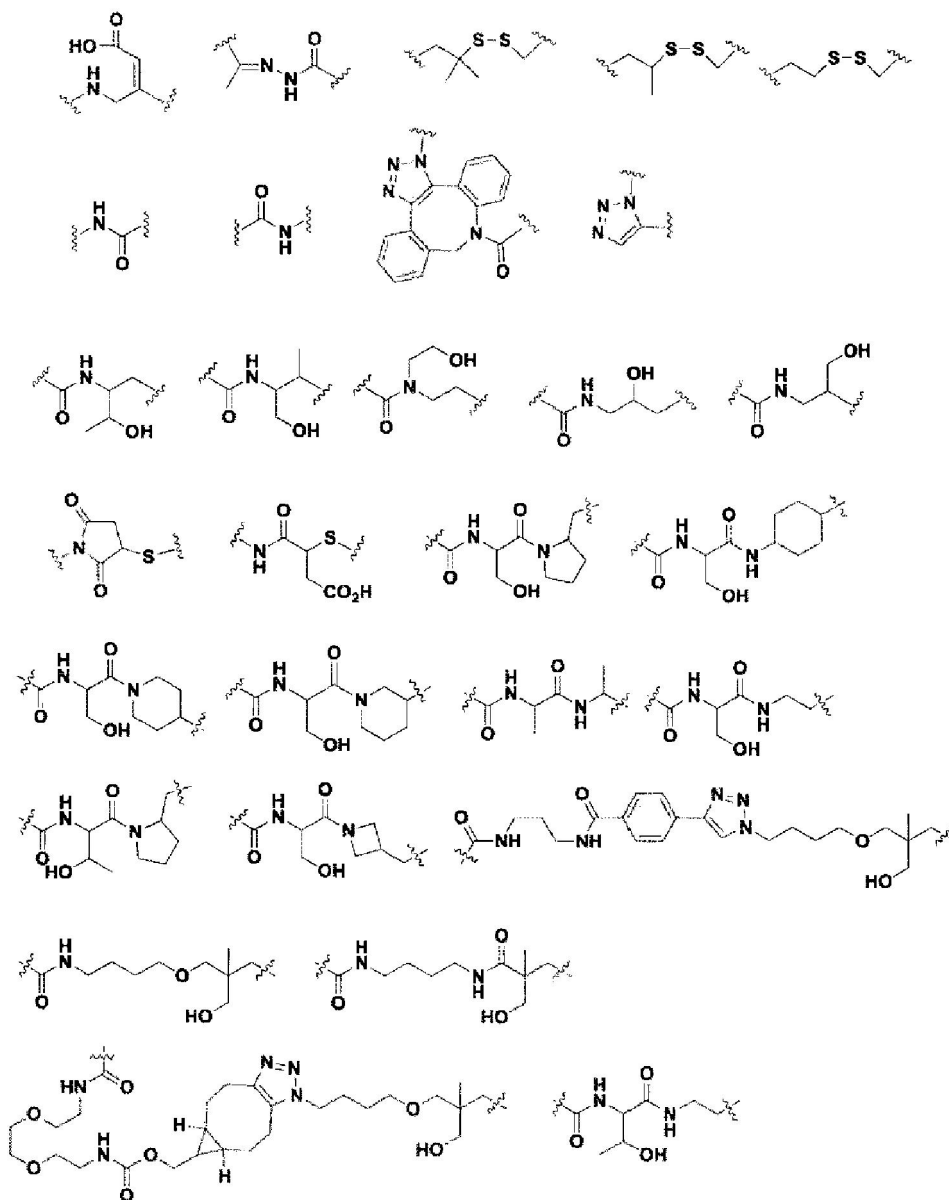
R3' es un átomo de hidrógeno, un grupo t-butoxicarbonilo, un grupo benciloxicarbonilo, un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, -CO-R4', -CO-(CH₂CH₂O)_{n2}-CH₂CH₂-N₃ o -CO-Q9'-B5'-(Q10'-P10')_{q8}-X1', en donde n2 es un número entero de 0 a 99,

15 P10' está ausente, o es -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH-,

Q9' y Q10' están, cada uno independientemente, ausentes, o son alquileo con 1 a 12 átomos de carbono, sustituido o no sustituido, o - (CH₂CH₂O)_{n3'}-CH₂CH₂-, en donde n3' es un número entero de 0 a 99,

20 B5' es cualquier estructura representada por la siguiente fórmula 9-1, en donde las líneas discontinuas significan respectivamente enlaces a Q9' y Q10':

Fórmula 9-1:



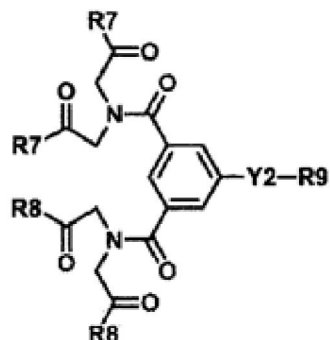
q8' es un número entero de 0 a 10,

X1' es un átomo de hidrógeno o un soporte en fase sólida, y

5 R4' es un grupo alquilo que tiene de 2 a 10 átomos de carbono sustituidos con 1 o 2 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un grupo amino no sustituido o sustituido con un grupo t-butoxicarbonilo, un grupo benciloxicarbonilo o un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, un grupo carboxi, un grupo maleimida y un grupo aralquiloxicarbonilo.

(22) Un compuesto representado por la siguiente fórmula 10:

Fórmula 10:



10 en donde

R7 y R8 son, cada uno independientemente, un grupo hidroxilo, un grupo t-butoxi, un grupo benciloxi, -NH-R10 o -NH-Q12-(P12-Q12')_{q10}-T5-L5,

P12 y T5 están, cada uno independientemente, ausentes, o son -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH-,

5 cada uno de Q12 y Q12' está ausente o es alquileo con 1 a 12 átomos de carbono, sustituido o no sustituido, o - (CH₂CH₂O)_{n5}-CH₂CH₂-, en donde n5 es un número entero de 0 a 99,

L5 es un ligando de azúcar,

Y2 es -O-(CH₂)_{m13}-NH- o -NH-CO-(CH₂)_{m14}-NH-, en donde m13 y m14 son, cada uno independientemente, un número entero de 1 a 10,

10 q10 es un número entero de 0 a 10,

R9 es un átomo de hidrógeno, un grupo t-butoxicarbonilo, un grupo benciloxicarbonilo, un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, -CO-R10, -CO-(CH₂CH₂O)_{n6}-CH₂CH₂-N₃ o -CO-Q13-B6-(Q14-P13)_{q11}-X2, en donde n6 es un número entero de 0 a 99,

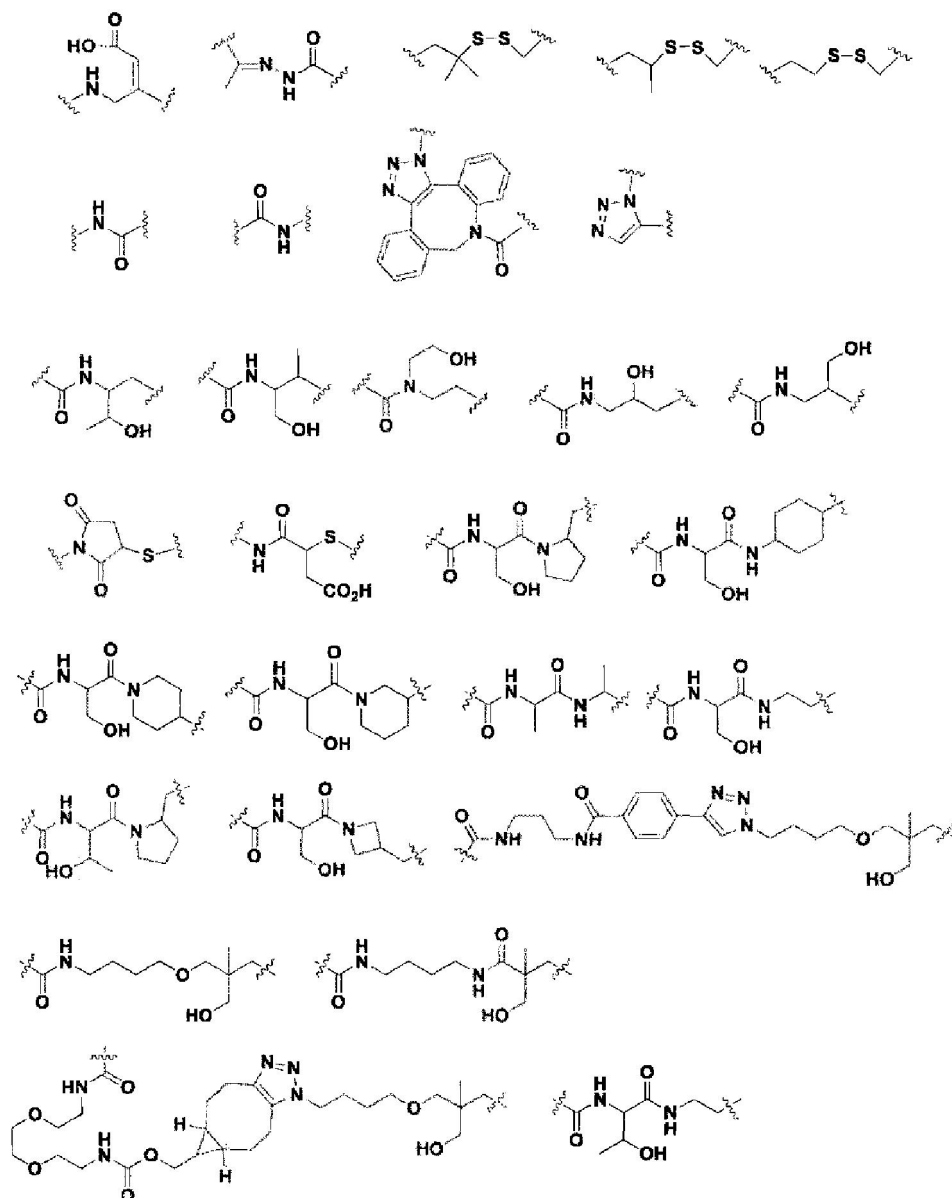
P10 está ausente, o es -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH-,

15 Q13 y Q14 están, cada uno independientemente, ausentes, o son alquileo con 1 a 12 átomos de carbono, sustituido o no sustituido, o - (CH₂CH₂O)_{n7}-CH₂CH₂-, en donde n7 es un número entero de 0 a 99,

B6 es cualquier estructura representada por la siguiente fórmula 10-1, en donde las líneas discontinuas significan respectivamente enlaces a Q13 y Q14:

Fórmula 10-1:

20



q11 es un número entero de 0 a 10,

X2 es un átomo de hidrógeno o un soporte en fase sólida, y

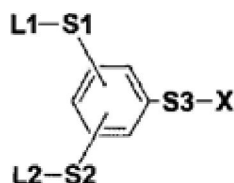
R10 es un grupo alquilo que tiene de 2 a 10 átomos de carbono sustituidos con 1 o 2 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un grupo amino no sustituido o sustituido con un grupo t-butoxicarbonilo, un grupo benciloxicarbonilo o un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, un grupo carboxi, un grupo maleimida y un grupo aralquiloxicarbonilo. Efectos Ventajosos de la Invención

5

Por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende el conjugado de ácidos nucleicos de la presente invención puede administrarse a mamíferos para tratar diversas enfermedades relacionadas *in vivo*.
Descripción de Realizaciones

10 El conjugado de ácidos nucleicos de la presente divulgación es un conjugado de ácidos nucleicos representado por la siguiente fórmula 1:

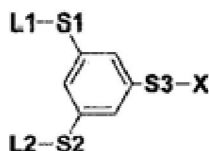
Fórmula 1:



15 En la fórmula 1,
X es un oligonucleótido,
L1 y L2 son, cada uno independientemente, un ligando de azúcar, y
S1, S2 y S3 son, cada uno independientemente, un enlazador.

20 En la presente divulgación, S1 y S2 pueden unirse cada uno al anillo de benceno en una posición orto, meta o para con respecto a la posición de sustitución de S3 en el anillo de benceno. Se prefiere un conjugado de ácidos nucleicos representado por la fórmula 1-1 dada más adelante. Los enlaces de S1 y S2 al anillo de benceno en la fórmula 1 significan que los enlaces pueden estar en posiciones arbitrarias distintas de la posición de sustitución de S3 en el anillo de benceno.

Fórmula 1-1:



25 En la fórmula 1-1,
X, L1, L2, S1, S2 y S3 son cada uno como se define arriba,

30 En la presente memoria descriptiva, la expresión "tal como se define arriba" significa que, cuando se toma la fórmula 1-1 como ejemplo, cada uno de X, L1, L2, S1 y S2 en la fórmula 1-1 puede ser el mismo grupo que en la definición sobre cada uno de X, L1, L2, S1 y S2 arriba descritos en la fórmula 1.

35 En la presente divulgación, X es un oligonucleótido y se puede utilizar un oligonucleótido que se sabe que se utiliza como medicamento de ácidos nucleicos. En la presente invención, el medicamento de ácidos nucleicos significa un nucleótido que se utiliza como un aptámero, un antisentido, un ácido nucleico señuelo, una ribozima, ARNip, mi-ARN, anti-mi-ARN o similares.

40 En la presente divulgación, el oligonucleótido no solo está unido a S3 a través de la posición 3' o 5' de un resto de azúcar que constituye un nucleótido, sino que puede unirse a S3 a través de un resto de base que constituye el nucleótido. En la presente invención, el oligonucleótido puede entenderse como un grupo que tiene una estructura que une el oligonucleótido a S3. Por ejemplo, cuando el oligonucleótido está unido a S3 a través de -OP(Z)(Z')O- (en donde Z y Z' son cada uno independientemente un átomo de oxígeno o un átomo de azufre), el oligonucleótido representado por X puede entenderse como oligonucleótido -OP(Z)(Z')O-.

45 El oligonucleótido puede ser un oligonucleótido de cadena sencilla o de cadena doble.

El enlazador S3 y el oligonucleótido X están unidos entre sí en el extremo 3' o 5' del oligonucleótido. Cuando el oligonucleótido es de doble cadena, el enlazador S3 se une preferiblemente al extremo 3' o 5' de una cadena sentido que constituye el ácido nucleico de doble cadena, aunque el enlace no se limita al mismo.

50 En la presente divulgación, a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria al ARNm diana también se le alude como un nucleótido antisentido, y a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos del nucleótido antisentido también se le alude como un nucleótido sentido.

El oligonucleótido que constituye el conjugado de ácidos nucleicos utilizado en la presente divulgación puede tener cualquier forma, siempre que el oligonucleótido tenga la capacidad de controlar la expresión de un gen diana cuando se transfiere a células de mamífero. Se utiliza adecuadamente un oligonucleótido de cadena sencilla o un oligonucleótido de doble cadena.

El oligonucleótido puede ser cualquier molécula que sea un polímero de nucleótidos o moléculas funcionalmente equivalentes a los nucleótidos. Ejemplos del mismo incluyen ADN que es un polímero de desoxirribonucleótidos, ARN que es un polímero de ribonucleótidos y un ácido nucleico quimérico que es un polímero de ADN y ARN. Alternativamente, el oligonucleótido puede ser un polímero nucleotídico derivado de ADN, ARN o un ácido nucleico quimérico mediante el reemplazo de al menos un nucleótido (desoxirribonucleótido, ribonucleótido, etc.) por una molécula funcionalmente equivalente al nucleótido. Uracilo (U) en ARN y timina (T) en ADN se pueden utilizar indistintamente entre sí.

Ejemplos de moléculas funcionalmente equivalentes a nucleótidos incluyen derivados de nucleótidos preparados modificando nucleótidos. Por ejemplo, una molécula de desoxirribonucleótido o ribonucleótido modificada se utiliza adecuadamente para mejorar o estabilizar la resistencia a las nucleasas, para potenciar la afinidad por un ácido nucleico de cadena complementaria, para potenciar la permeabilidad de la célula o para visualizar la molécula, en comparación con ADN o ARN.

Ejemplos de derivados de nucleótidos incluyen nucleótidos modificados en al menos uno de un resto de azúcar, un enlace fosfodiéster y una base, tales como nucleótidos modificados en el resto de azúcar, nucleótidos modificados en el enlace fosfodiéster y nucleótidos modificados en la base.

El nucleótido modificado en el resto de azúcar puede ser cualquier nucleótido en el que una parte o la totalidad de la estructura química de su azúcar esté modificada o sustituida con un sustituyente arbitrario o sustituida con un átomo arbitrario. Se utiliza preferiblemente un nucleótido modificado en 2'.

Ejemplos de nucleótidos modificados en 2' incluyen nucleótidos modificados en 2', en los que el grupo 2'-OH de la ribosa está sustituido con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br e I (R es alquilo o arilo, preferiblemente alquilo que tiene 1 a 6 átomos de carbono, y R' es alquileo, preferentemente alquileo que tiene 1 a 6 átomos de carbono).

Ejemplos de la modificación 2' incluyen preferiblemente la sustitución con F, un grupo metoxi y/o un grupo etoxi. Ejemplos adicionales de los mismos incluyen nucleótidos modificados en 2' que tienen sustitución con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un grupo 2-(metoxi)etoxi, un grupo 3-aminopropoxi, un grupo 2-[(N,N-dimetilamino)oxi]etoxi, un grupo 3-(N,N-dimetilamino)propoxi, un grupo 2-[2-(N,N-dimetilamino)etoxi]etoxi, un grupo 2-(metilamino)-2-oxoetoxi, un grupo 2-(N-metilcarbamoil)etoxi y un grupo 2-cianoetoxi.

Un ácido nucleico puenteado (BNA) que tiene dos estructuras cíclicas mediante la introducción de una estructura puenteada al resto de azúcar también se utiliza adecuadamente como el nucleótido modificado en el resto de azúcar. Ejemplos específicos del mismo incluyen ácido nucleico bloqueado (LNA) que tiene el átomo de oxígeno en la posición 2' y el átomo de carbono en la posición 4' puenteado mediante metileno [Tetrahedron Letters, 38, 8735 (1997); y Tetrahedron, 54, 3607 (1998)], ácido nucleico puenteado con etileno (ENA) [Nucleic Acid Research, 32, e175 (2004)], etilo restringido (cEt) [The Journal of Organic Chemistry 75, 1569 (2010)], ácido nucleico puenteado con amido (AmNA) [Chem Bio Chem 13, 2513 (2012)] y ácido nucleico puenteado con 2'-O,4'-C-espirociclopropileno (scpBNA) [Chem. Commun., 51, 9737 (2015)].

Ejemplos adicionales del nucleótido modificado en el resto de azúcar incluyen ácido nucleico peptídico (PNA) [Acc. Chem. Res., 32, 624 (1999)], ácido nucleico oxi-peptídico (OPNA) [J. Am. Chem. Soc., 123, 4653 (2001)] y ácido ribonucleico peptídico (PRNA) [J. Am. Chem. Soc. 122, 6900 (2000)].

El nucleótido modificado en el resto de fosfodiéster puede ser cualquier nucleótido en el que una parte o la totalidad de la estructura química de su enlace fosfodiéster esté modificada o sustituida con un sustituyente arbitrario o sustituida con un átomo arbitrario. Ejemplos de los mismos incluyen un nucleótido resultante de la sustitución del enlace fosfodiéster con un enlace fosforotioato, un nucleótido resultante de la sustitución del enlace fosfodiéster con un enlace fosforoditioato, un nucleótido resultante de la sustitución del enlace fosfodiéster con un enlace alquilfosfonato y un nucleótido resultante de la sustitución del enlace fosfodiéster con un enlace fosforamido y preferiblemente incluye un nucleótido resultante de la sustitución del enlace fosfodiéster con un enlace fosforotioato.

El nucleótido modificado en la base puede ser cualquier nucleótido en el que una parte o la totalidad de la estructura química de su base esté modificada o sustituida con un sustituyente arbitrario o sustituida con un átomo arbitrario. Ejemplos de los mismos incluyen un nucleótido resultante de la sustitución de un átomo de oxígeno en la base con un átomo de azufre, un nucleótido resultante de la sustitución de un átomo de hidrógeno con un grupo alquilo que tiene 1 a 6 átomos de carbono o un grupo halógeno, un nucleótido resultante de la sustitución de un grupo metilo con un átomo de hidrógeno, un grupo hidroximetilo o un grupo alquilo que tiene 2 a 6 átomos de carbono, y un nucleótido resultante de la sustitución de un grupo amino con un grupo alquilo que tiene 1 a 6 átomos de carbono, un grupo alcanilo que tiene 1 a

6 átomos de carbono, un grupo oxo, un grupo hidroxilo o similares. En un aspecto preferido de la presente invención, también se utiliza 5-metilcitosina (5-mC) en lugar de citosina (C) como nucleótido modificado en la base.

Ejemplos de los derivados de nucleótidos también incluyen nucleótidos o nucleótidos modificados en al menos uno de un resto de azúcar, un enlace fosfodiéster y una base que contiene una sustancia química adicional, tal como péptido, proteína, azúcar, lípido, fosfolípido, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceína, rodamina, cumarina o un colorante, añadido directamente o mediante un enlazador, y específicamente incluyen derivados de nucleótidos con adición de poliamina 5', derivados de nucleótidos con adición de colesterol, derivados de nucleótidos con adición de esteroides, derivados de nucleótidos con adición de ácido biliar, derivados de nucleótidos con adición de vitaminas, derivados de nucleótidos con adición de Cy5, derivados de nucleótidos con adición de Cy3, derivados de nucleótidos con adición de 6-FAM y derivados de nucleótidos con adición de biotina.

El derivado de nucleótido puede formar una estructura puenteada, tal como una estructura de alquileo, una estructura de péptido, una estructura de nucleótido, una estructura de éter, una estructura de éster y una estructura combinada con al menos una de estas estructuras, con otro nucleótido o derivado de nucleótido dentro del ácido nucleico.

El oligonucleótido también abarca moléculas en las que una parte o la totalidad de los átomos está sustituida con un átomo que tiene un número de masa atómica diferente del mismo (isótopo).

En la presente memoria descriptiva, el término "complementación" significa una relación capaz de formar un par de bases entre dos bases mediante un enlace de hidrógeno suave, por ejemplo, la relación entre adenina y timina o uracilo, y la relación entre guanina y citosina.

En la presente memoria descriptiva, el término "complementario" no solo significa el caso en el que dos secuencias de nucleótidos son completamente complementarias entre sí, sino que significa que puede estar presente del 0 al 30%, del 0 al 20% o del 0 al 10% de una base de emparejamiento erróneo entre las secuencias de nucleótidos y, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido complementario al ARNm diana puede contener la sustitución de una o más bases en su secuencia de nucleótidos completamente complementaria a una secuencia de nucleótidos parcial del ARNm diana. Específicamente, el oligonucleótido antisentido puede tener 1 a 8, preferiblemente 1 a 6, 1 a 4 o 1 a 3, particularmente, 2 o 1 bases de emparejamiento erróneo para una secuencia diana de un gen diana.

También, el término "complementario" abarca el caso en el que dos secuencias de nucleótidos, una de las cuales es completamente complementaria a la otra secuencia de nucleótidos, tienen la adición y/o delección de una o más bases. Por ejemplo, el ARNm diana y el oligonucleótido antisentido pueden tener 1 o 2 bases abombadas en la cadena antisentido y/o la región del ARNm diana mediante la adición y/o delección de bases en el oligonucleótido antisentido.

En lo que sigue, el término "complementario" se describe para abarcar también "complementación".

El oligonucleótido antisentido utilizado en la presente divulgación es un oligonucleótido complementario al ADN que codifica el gen diana o un precursor de ARNm, ARNm, un precursor de microARN o microARN transcrito del ADN que codifica el gen diana e inhibe la función del ADN, el precursor de ARNm, el ARNm, el precursor de microARN o el microARN formando un dúplex con el ADN, el precursor de ARNm o el ARNm fijado como objetivo por el oligonucleótido antisentido.

El oligonucleótido antisentido incluye no solo un oligonucleótido completamente complementario a su ADN diana, precursor de ARNm, ARNm, precursor de microARN o microARN, sino un oligonucleótido que tiene uno o varios emparejamientos erróneos siempre que el oligonucleótido pueda hibridar bajo condiciones estrictas con el ADN, el precursor de ARNm, el ARNm, el precursor de microARN o el microARN.

El oligonucleótido antisentido puede introducirse en forma de un oligómero en horquilla o un oligómero cíclico y puede contener un factor estructural tal como una protuberancia o bucle interno o terminal siempre que el ácidos nucleicos se hibrida con el gen diana.

La longitud del oligonucleótido antisentido es de 8 a 80 bases, preferiblemente de 8 a 30 bases. La longitud puede ser, por ejemplo, de 8 a 20 bases, de 10 a 20 bases, de 13 a 20 bases, de 13 a 16 bases, 13 bases, 14 bases, 15 bases, 16 bases, 17 bases, 18 bases, 19 bases o 20 bases.

El oligonucleótido antisentido, cuando se transfiere a las células, puede unirse a su precursor de ARNm complementario o ARNm e inhibir estéricamente la traducción del mismo en una proteína, inhibiendo la expresión del gen diana.

El oligonucleótido antisentido también puede unirse a su precursor de microARN complementario o microARN en las células e inhibir estéricamente la función del microARN.

El oligonucleótido antisentido puede unirse a su ARNm complementario o precursor de ARNm en las células y escindir el ARNm o el precursor de ARNm. La acción mediada por la RNasa H, que es una endonucleasa que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN y ADN, se conoce como un ejemplo. Cuando el oligonucleótido antisentido de la presente

invención en las células forma un dúplex con el ARNm o el precursor del ARNm, el dúplex puede ser reconocido por la RNasa H, que luego puede degradar enzimáticamente la cadena de ARNm complementaria.

Se prefiere un oligonucleótido antisentido que tenga de 4 a 80 regiones de ADN consecutivas para inducir la escisión del ARNm o del precursor del ARNm por la RNasa H.

En este caso, el oligonucleótido antisentido tiene preferiblemente de 0 a 80%, más preferiblemente de 10 a 60%, más preferiblemente de 20 a 50% de un nucleótido modificado en el resto de azúcar. Cuando el oligonucleótido antisentido tiene un nucleótido modificado en el resto de azúcar, el número de regiones de ADN consecutivas es más preferiblemente de 4 a 20, más preferiblemente de 4 a 15, más preferiblemente de 5 a 10. La posición del nucleótido modificado en el resto de azúcar en el oligonucleótido antisentido está preferiblemente cerca del extremo 5' y/o cerca del extremo 3' y es más preferiblemente una posición dentro del 25% de la longitud total desde el extremo 5' y/o una posición dentro del 25% de la longitud total desde el extremo 3'.

El oligonucleótido antisentido también puede inducir la inhibición de la expresión de un gen diana formando un dúplex con su ácido oligonucleico complementario y transfiriendo el ácido nucleico de doble cadena a las células (véase la Publicación Internacional nº WO 2005/113571). En este caso, la posición de modificación del ácido nucleico de doble cadena con un ligando es preferiblemente el extremo 5' o 3' del ácido oligonucleico complementario.

El oligonucleótido antisentido utilizado en la presente invención también puede incrementar la expresión de un gen diana utilizando una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de promotor o similar del gen diana (véanse las Publicaciones Internacionales N°s WO 2013/173601 y WO 2013/173637).

Ejemplos de un método para producir el oligonucleótido antisentido incluyen, pero no se limitan particularmente a métodos que utilizan síntesis química conocida en la técnica y métodos de transcripción enzimática. Ejemplos de los métodos que utilizan síntesis química conocidos en la técnica pueden incluir un método de fosforamidita, un método de fosforotioato, un método de fosfotriéster y un método CEM [Nucleic Acid Research, 35, 3287 (2007)]. El oligonucleótido antisentido se puede sintetizar utilizando, por ejemplo, un sintetizador de ácidos nucleicos de alto rendimiento ABI3900 (fabricado por Applied Biosystems, Inc.). Una vez completada la síntesis, se realiza la disociación de una fase sólida, la desprotección de un grupo protector y la purificación del compuesto de interés, etc. De manera deseable, se obtiene mediante la purificación un oligonucleótido antisentido que tiene una pureza del 90% o más, preferiblemente del 95% o más. Ejemplos de los métodos de transcripción enzimática para producir el oligonucleótido antisentido de la presente invención incluyen métodos basados en la transcripción utilizando un plásmido o ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de interés como molde y ARN polimerasa de fago, por ejemplo, ARN polimerasa de T7, T3 o SP6.

El oligonucleótido de doble cadena utilizado en la presente divulgación puede estar constituido por cualquier oligonucleótido o derivado del mismo, siempre que el oligonucleótido o el derivado sea un ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos parcial de ARNm diana y/o un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico.

El oligonucleótido de doble cadena utilizado en la presente divulgación puede tener cualquier longitud siempre que el ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de ARNm diana y el ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico pueda formar un dúplex. La longitud de secuencia que permite la formación del dúplex es habitualmente de 11 a 35 bases, preferiblemente de 15 a 30 bases, más preferiblemente de 17 a 25 bases, más preferiblemente de 17 a 23 bases, particularmente preferiblemente de 19 a 23 bases.

En la presente divulgación, un ácido nucleico de cadena sencilla que consiste en un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de ARNm diana e inhibe la expresión de la proteína diana, o un ácido nucleico de doble cadena que consiste en un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de ARNm diana y un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico e inhibe la expresión de la proteína diana se utiliza adecuadamente como oligonucleótido de doble cadena que inhibe la expresión de la proteína diana.

El oligonucleótido de doble cadena también puede aumentar la expresión de un gen diana al utilizar una molécula que consiste en un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de promotor o similar del gen diana y un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico [Nucleic Acid Research, 41, 10086 (2013); y Hepatology, 59, 216 (2014)].

El oligonucleótido de doble cadena se refiere a nucleótidos que tienen una región dúplex formada por el apareamiento de dos oligonucleótidos. La región dúplex se refiere a un resto en el que los nucleótidos o derivados de los mismos, que constituyen las dos cadenas, han formado un dúplex al constituir pares de bases. La región dúplex es normalmente de 11 a 27 pares de bases, preferiblemente de 15 a 25 pares de bases, más preferiblemente de 15 a 23 pares de bases, más preferiblemente de 17 a 21 pares de bases.

Cada uno de los oligonucleótidos de cadena sencilla que constituye el oligonucleótido de doble cadena consiste habitualmente en 11 a 30 bases, preferiblemente 15 a 29 bases, más preferiblemente 15 a 27 bases, más preferiblemente 15 a 25 bases, de manera particularmente preferida de 17 a 23 bases.

- 5 El oligonucleótido de doble cadena puede tener un nucleótido o derivado de nucleótido adicional que no forma dúplex en el lado 3' o 5' posterior a la región dúplex. A este resto que no forma dúplex se le alude como colgante. Cuando el oligonucleótido de doble cadena tiene un colgante, el nucleótido que constituye el colgante puede ser un ribonucleótido, un desoxirribonucleótido o un derivado del mismo.
- 10 Un oligonucleótido de doble cadena que tiene un colgante que consiste en 1 a 6 bases, habitualmente 1 a 3 bases, en el extremo 3' o 5' de al menos una de las cadenas se utiliza como el oligonucleótido de doble cadena que tiene el colgante. Se utiliza preferiblemente un oligonucleótido de doble cadena que tiene un colgante que consiste en 2 bases. Ejemplos de los mismos incluyen oligonucleótidos de doble cadenas que tienen un colgante que consiste en dTdT o UU. El colgante puede estar presente solo en el oligonucleótido antisentido, solo en el oligonucleótido sentido y tanto en el oligonucleótido antisentido como en el oligonucleótido sentido. Se utiliza preferiblemente un oligonucleótido de doble cadena que tiene un colgante en el oligonucleótido antisentido. El oligonucleótido antisentido comprende la región dúplex y el colgante subsiguiente a la misma.
- 15 Un ácido nucleico que consiste en una secuencia idéntica a la secuencia de nucleótidos de un gen diana o la secuencia de nucleótidos de su cadena complementaria puede utilizarse en el oligonucleótido de doble cadena. Un ácido nucleico de doble cadena que consiste en un ácidos nucleicos derivado del ácido nucleico por el truncamiento de 1 a 4 bases del extremo 5' o 3' de al menos una cadena, y un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria al nucleótido. puede utilizarse la secuencia del ácido nucleico.
- 20 El oligonucleótido de doble cadena puede ser ARN de doble cadena (ARNdc) que comprende un dúplex de ARN, ADN de doble cadena (ADNdc) que comprende un dúplex de ADN o un ácido nucleico híbrido que comprende un dúplex de ARN-ADN. Alternativamente, el oligonucleótido de doble cadena puede ser un ácido nucleico quimérico que tiene dos cadenas, una o ambas de las cuales consiste en ADN y ARN. Se prefiere el ARN de doble cadena (ARNdc).
- 25 Preferiblemente, el 2º nucleótido contado desde el extremo 5' del oligonucleótido antisentido es complementario al 2º desoxirribonucleótido contado desde el extremo 3' de la secuencia de ARNm diana. Más preferiblemente, los 2º a 7º nucleótidos contados desde el extremo 5' del oligonucleótido antisentido son complementarios a los 2º a 7º desoxirribonucleótidos contados desde el extremo 3' de la secuencia de ARNm diana. Preferiblemente además, los 2º a 11º nucleótidos contados desde el extremo 5' del oligonucleótido antisentido son complementarios a los 2º a 11º desoxirribonucleótidos contados desde el extremo 3' de la secuencia de ARNm diana. También preferiblemente, el 11º nucleótido contado desde el extremo 5' del oligonucleótido antisentido es complementario al 11º desoxirribonucleótido contado desde el extremo 3' de la secuencia de ARNm diana. Más preferiblemente, los 9º a 13º nucleótidos contados desde el extremo 5' del oligonucleótido antisentido son complementarios a los 9º a 13º desoxirribonucleótidos contados desde el extremo 3' de la secuencia de ARNm diana. Preferiblemente además, los 7º a 15º nucleótidos contados desde el extremo 5' del oligonucleótido antisentido son complementarios a los 7º a 15º desoxirribonucleótidos contados desde el extremo 3' de la secuencia de ARNm diana.
- 30 El oligonucleótido de doble cadena contiene preferiblemente 50 a 100%, más preferiblemente 70 a 100%, más preferiblemente 90 a 100%, de un nucleótido modificado con respecto a los nucleótidos dentro de la región del ácido nucleico de doble cadena.
- 35 El oligonucleótido de doble cadena se puede sintetizar químicamente y generalmente se puede sintetizar mediante el uso de un método de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida (véase, por ejemplo, Usman et al., Patente de EE.UU. N° 5.804.683; Patente de EE.UU. N° 5.831.071; Patente de EE.UU. N° 5.998.203; Patente de EE.UU. N° 6.117.657; Patente de EE.UU. N° 6.353.098; Patente de EE.UU. N° 6.362.323; Patente de EE.UU. N° 6.437.117; y Patente de EE.UU. N° 6.469.158; Scaringe et al., Patente de EE.UU. N° 6.111.086; Patente de EE.UU. N° 6.008.400; y Patente de EE.UU. N° 6.111.086).
- 40 El ARN puede producirse enzimáticamente o mediante síntesis orgánica parcial o total. Puede introducirse un ribonucleótido modificado enzimáticamente o mediante síntesis orgánica *in vitro*. En un aspecto, cada una de las cadenas se prepara químicamente. En la técnica se conoce un método para sintetizar químicamente una molécula de ARN [véase Nucleic Acids Research, 32, 936 (1998)].
- 45 Ejemplos del ARN utilizado en la presente divulgación incluyen ARN que comprende una secuencia de 15 a 30 bases consecutivas, preferiblemente de 17 a 25 bases consecutivas, más preferiblemente de 19 a 23 bases consecutivas (a la que se alude en lo sucesivo como secuencia X) del ARNm de un gen diana, y una secuencia de bases complementaria (a la que se alude en lo sucesivo como secuencia complementaria X') a la secuencia X, por ejemplo, ARN de doble cadena que consiste en un oligonucleótido sentido que comprende la secuencia X y un oligonucleótido antisentido que comprende la secuencia complementaria X", y ARN que tiene una estructura en horquilla del oligonucleótido sentido y el oligonucleótido antisentido conectados mediante un oligonucleótido espaciador.
- 50
- 55
- 60
- 65

Ejemplos del oligonucleótido sentido que comprende la secuencia X incluyen ARN que comprende solo la secuencia X como bases (a la que se alude en lo sucesivo como cadena X de secuencia), y ARN que tiene 1 a 6, preferiblemente 2 a 4 nucleótidos iguales o diferentes añadidos al 3' o 5', o ambos, de la cadena de la secuencia X.

- 5 Ejemplos del oligonucleótido antisentido que comprende la secuencia complementaria X' incluyen ARN que comprende solo la secuencia complementaria X' como bases (a la que se alude en lo sucesivo como cadena de la secuencia X'), y ARN de doble cadena que tiene 1 a 6, preferiblemente 2 a 4 nucleótidos iguales o diferentes añadidos al extremo 3' o 5', o ambos, de la cadena de la secuencia complementaria X'.
- 10 El oligonucleótido espaciador en el ARN que tiene una estructura en horquilla del oligonucleótido sentido que comprende la secuencia X y el oligonucleótido antisentido que comprende la secuencia complementaria X', conectados a través del oligonucleótido espaciador son preferiblemente nucleótidos de 6 a 12 bases, y la secuencia terminal 5' del mismo es preferiblemente UU. Ejemplos del oligonucleótido espaciador incluyen un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos UUCAAGAGA. En cuanto al orden de las dos cadenas de ARN conectadas a través del oligonucleótido
- 15 espaciador, cualquiera de ellas puede estar dispuesta en el lado 5', y la cadena sentido que comprende la secuencia X está dispuesta preferiblemente en el lado 5'.

- Los nucleótidos a añadir a la cadena X de la secuencia y la cadena X' de la secuencia complementaria, y las bases del oligonucleótido espaciador pueden ser cualquier tipo o varios tipos seleccionados de guanina, adenina, citosina, timina y uracilo. Un azúcar unido a cada una de las bases puede ser ribosa, desoxirribosa o ribosa sustituida en el grupo 2'-hidroxilo con un grupo modificador. Los nucleótidos a añadir son más preferiblemente cualquier tipo o dos tipos seleccionados de ácido uridílico (U) y ácido desoxitimidílico (dT). La secuencia de las bases de los nucleótidos a añadir al extremo 3' de la cadena de la secuencia X puede ser la misma que la secuencia de las bases de los nucleótidos adyacentes a la secuencia X dentro del ARNm del gen diana. La secuencia de las bases de los nucleótidos a añadir al extremo 3' de la cadena de la secuencia complementaria X' puede ser complementaria a la secuencia de las bases de los nucleótidos adyacentes a la secuencia X dentro del ARNm del gen diana.
- 20
- 25

- Ejemplos más preferidos del ARN utilizado en la presente divulgación incluyen (a) ARN de doble cadena que consiste en un oligonucleótido sentido que comprende la secuencia X y un oligonucleótido antisentido que comprende la secuencia complementaria X', en donde: la secuencia X es una secuencia de 19 a 21 bases consecutivas del ARNm del gen diana; el oligonucleótido sentido consiste en una cadena de secuencia X y 2 a 4 nucleótidos iguales o diferentes añadidos al extremo 3' de la cadena de la secuencia X; y el oligonucleótido antisentido consiste en una cadena de la secuencia X' complementaria y de 2 a 4 nucleótidos iguales o diferentes añadidos al extremo 3' de la cadena de la secuencia complementaria X', (b) ARN de doble cadena que consiste en un oligonucleótido sentido que comprende la secuencia X y un oligonucleótido antisentido que comprende la secuencia complementaria X', en donde: la secuencia X es una secuencia de 23 a 25 bases consecutivas del ARNm del gen diana; el oligonucleótido sentido es una cadena de la secuencia X; y el oligonucleótido antisentido es una cadena de la secuencia complementaria X, y (c) ARN de doble cadena que consiste en un oligonucleótido sentido que comprende la secuencia X y un oligonucleótido antisentido que comprende la secuencia complementaria X', en donde: la secuencia X es una secuencia de 23 a 27 bases consecutivas del ARNm del gen diana; el oligonucleótido sentido consiste en una cadena de la secuencia X y 2 a 4 nucleótidos iguales o diferentes añadidos al extremo 3' de la cadena de la secuencia X; el oligonucleótido antisentido consiste en una cadena de la secuencia complementaria X' y 2 a 4 nucleótidos iguales o diferentes añadidos al extremo 3' de la cadena de la secuencia complementaria X'; y la secuencia de las bases de los nucleótidos a añadir al extremo 3' de la cadena de la secuencia complementaria X' es complementaria a la secuencia de las bases de los nucleótidos adyacentes a la secuencia X dentro del ARNm del gen diana.
- 30
- 35
- 40
- 45

Ejemplos adicionales del ARN utilizado en la presente divulgación incluyen preferiblemente ARN que tiene un efecto inhibidor sobre la expresión del gen diana mediante el uso de ARN de interferencia (ARNi).

- 50 El oligonucleótido de cadena sencilla se sintetiza mediante el uso de un método de fosforamidita en fase sólida [véase Nucleic Acids Research, 30, 2435 (1993)], se desprotege y se desala en una columna NAP-5 (Amersham Pharmacia Biotech Ltd., Piscataway, NJ). El oligómero se purifica mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio iónico (IE-HPLC) en una columna Amersham Source 15Q (1,0 cm, altura: 25 cm; Amersham Pharmacia Biotech Ltd., Piscataway, NJ) utilizando un gradiente lineal en una etapa de 15 minutos. El gradiente se desplaza de la solución tampón A:B de 90:10 a la solución tampón A:B de 52:48. La solución tampón A es 100 mmol/L de Tris, pH 8,5, y la solución tampón B es 100 mmol/L de Tris, pH 8,5 (1 mol/L de NaCl). Se controla una muestra a 260 nm y se recoge un pico correspondiente a la especie de oligonucleótidos de longitud completa, se agrupa, se desala en una columna NAP-5 y se liofiliza.
- 55
- 60 La pureza de cada uno de los oligonucleótidos de cadena sencilla se determina mediante electroforesis capilar (CE) utilizando un aparato Beckman PACE 5000 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, Calif.). El capilar CE tiene un diámetro interior de 100 µm y contiene ADNcs 100R Gel (Beckman-Coulter, Inc.). Típicamente, se inyectan aproximadamente 0,6 nmol del oligonucleótido en el capilar y la CE se lleva a cabo en un campo eléctrico de 444 V/cm, seguido de la detección de la absorbancia UV a 260 nm. Se adquiere una solución tampón de electroforesis que contiene Tris-borato modificado y 7 mol/L de urea de Beckman Coulter, Inc. Se obtiene un oligonucleótido de cadena sencilla que tiene al menos un 90% de pureza evaluado por CE para su uso en un experimento mencionado más adelante. La identidad del compuesto se
- 65

verifica mediante la espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo (MALDI-TOF) utilizando la estación de trabajo de bioespectrometría Voyager DE(TM) (Applied Biosystems, Inc., Foster City, Calif.) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. La masa molecular relativa del oligonucleótido de cadena sencilla se puede obtener dentro del 0,2% de una masa molecular predicha.

El oligonucleótido de cadena sencilla se resuspende a una concentración de 100 $\mu\text{mol/L}$ en una solución tampón que consiste en 100 mmol/L de acetato de potasio y 30 mmol/L de HEPES, pH 7,5. La cadena sentido complementaria y la cadena antisentido se mezclan en cantidades equimolares para obtener una solución final de 50 $\mu\text{mol/L}$ de oligonucleótido de doble cadena. La muestra se calienta a 95°C durante 5 minutos y se enfría a temperatura ambiente antes de su uso. El ácido nucleico de doble cadena se conserva a -20°C. El oligonucleótido de cadena sencilla se liofiliza o se almacena a -80°C en agua libre de nucleasas.

L1 y L2 son, cada uno independientemente, un ligando de azúcar.

En la presente invención, el ligando de azúcar significa un grupo derivado de un sacárido (monosacárido, disacárido, trisacárido y polisacárido, etc.) capaz de unirse a un receptor expresado en una célula diana. En la presente invención, cuando el ligando de azúcar se une al enlazador S1 o S2 a través de un enlace O, el ligando de azúcar como grupo derivado de un sacárido significa un resto que constituye el ligando de azúcar, excepto por un grupo hidroxilo, implicado en la unión del sacárido.

En la presente invención, el ligando de azúcar se puede seleccionar de manera que la célula es fijada como objetivo por el oligonucleótido.

Ejemplos del monosacárido incluyen alosa, aldosa, arabinosa, cladinosa, eritrosa, eritrola, fructosa, D-fucitol, L-fucitol, fucosamina, fucosa, fuculosa, galactosamina, D-galactosaminitol, N-acetilgalactosamina, galactosa, glucosamina, N-acetilglucosamina, glucosaminitol, glucosa, glucosa-6-fosfato, gulosa, gliceraldehído, L-glicero-D-mano-heptosa, glicerol, glicerona, gulosa, idosa, lixosa, manosamina, manosa, manosa-6-fosfato, psicosa, quinovosa, quinovosamina, ramnitol, ramnosamina, ramnosa, ribosa, ribulosa, sedoheptulosa, sorbosa, tagatosa, talosa, ácido tartárico, treosa, xilosa y xilulosa.

Ejemplos del disacárido, del trisacárido y del polisacárido incluyen abeculosa, acarbosa, amictosa, amilopectina, amilosa, apiosa, arcanosa, ascarilosa, ácido ascórbico, bovinosa, celobiosa, celotriosa, celulosa, chacotriosa, chalcosa, quitina, colitosa, ciclodextrina, cimarosa, dextrina, 2-desoxirribosa, 2-desoxiglucosa, diginosa, digitalosa, digitoxosa, evalosa, evemitrosa, fructo-oligosacárido, galto-oligosacárido, gentianosa, gentiobiosa, glucano, glucógeno, glicógeno, hamamelosa, heparina, inulina, isolevoglucosenona, isomaltosa, isomaltotriosa, isopanosa, kojibiosa, lactosa, lactosamina, lactosadiamina, laminarabiosa, levoglucosan, levoglucosenona, β -maltosa, maltriosa, oligosacárido de manano, maninotriosa, melicitosa, melibiosa, ácido murámico, micarosa, micinosa, ácido neuramínico, cadenas de azúcar que contienen ácido siálico, nigerosa, nojirimicina, nobiosa, oleandrosa, panosa, paratosa, planteosa, primeverosa, rafinosa, rodinosa, rutinosa, sarmentosa, sedoheptulosa, sedoheptulosan, solatriosa, soforosa, estaquiosa, estreptosa, sacarosa, α , α -trehalosa, trehalosamina, turanosa, tivelosa, xilobiosa y umbelífera.

Cada monosacárido como sacárido puede estar en forma D o en forma L y puede ser una mezcla de formas D y L en una relación arbitraria.

El sacárido puede contener desoxiazúcar (derivado por el reemplazo de un grupo hidroxilo alcohólico por un átomo de hidrógeno), aminoazúcar (derivado por el reemplazo de un grupo hidroxilo alcohólico por un grupo amino), tioazúcar (derivado por el reemplazo de un grupo hidroxilo alcohólico por un grupo tiol), el reemplazo de C=O por C=S, o el reemplazo del oxígeno del anillo por azufre), selenoazúcar, teluroazúcar, aza-azúcar (derivado por el reemplazo del carbono del anillo por nitrógeno), iminoazúcar (derivado por el reemplazo del oxígeno del anillo por nitrógeno), fosfano-azúcar (derivado por el reemplazo del oxígeno del anillo por fósforo), fosfa-azúcar (derivado por el reemplazo del carbono del anillo por fósforo), monosacárido C-sustituido (derivado por el reemplazo de un átomo de hidrógeno en un átomo de carbono no terminal por un átomo de carbono), monosacárido insaturado, alditol (derivado por el reemplazo de un grupo carbonilo por un grupo CHOH), ácido aldónico (derivado por el reemplazo de un grupo aldehído por un grupo carboxi), ácido cetoaldónico, ácido urónico, ácido aldárico, o similares.

Ejemplos del aminoazúcar incluyen amino monosacáridos tales como el sacárido, tales como galactosamina, glucosamina, manosamina, fucosamina, quinovosamina, ácido neuramínico, ácido murámico, lactosadiamina, acosamina, bacilosamina, daunosamina, desosamina, forosamina, galosamina, kansosamina, micaminosa, micosamina, perosamina, pneumosamina, purpurosamina y rodosamina. El grupo amino del aminoazúcar puede estar sustituido con un grupo acetilo o similar.

Ejemplos de cadenas de azúcar que contienen ácido siálico incluyen cadenas de azúcar que contienen NeuAc en sus extremos no reductores e incluyen cadenas de azúcar que contienen NeuAc-Gal-GlcNAc y Neu5Ac α (2-6)Gal β (1-3)GlcNAc.

Cada uno de los monosacáridos como sacárido puede estar sustituido con un sustituyente, siempre que el monosacárido sea capaz de unirse a un receptor expresado en una célula diana. Por ejemplo, el monosacárido puede estar sustituido

con un grupo hidroxilo, o uno o más átomos de hidrógeno en cada uno de los monosacáridos pueden reemplazarse por azida y/o un grupo arilo opcionalmente sustituido.

El ligando de azúcar se selecciona preferiblemente como un ligando de azúcar que se une a un receptor expresado en la superficie de una célula diana de acuerdo con cada uno de los órganos fijados como objetivo. Cuando la célula diana es, por ejemplo, una célula del hígado, el ligando de azúcar es preferiblemente un ligando de azúcar contra un receptor expresado en la superficie de la célula del hígado, más preferiblemente un ligando de azúcar contra un receptor de asialoglicoproteína (ASGPR).

El ligando de azúcar contra ASGPR es preferiblemente manosa o N-acetilgalactosamina, más preferiblemente N-acetilgalactosamina.

Por ejemplo, los derivados de azúcar descritos en Bioorganic Medicinal Chemistry, 17, 7254 (2009) y Journal of American Chemical Society, 134, 1978 (2012) se conocen como ligandos de azúcar que tienen mayor afinidad por ASGPR, y pueden utilizarse estos derivados de azúcar.

En la presente divulgación, cada uno de S1, S2 y S3 es un enlazador.

S1 y S2 no están particularmente limitados, siempre que sus estructuras enlacen ligandos de azúcar L1 y L2 al anillo de benceno. Puede adoptarse una estructura conocida en la técnica para su uso en conjugados de ácidos nucleicos. S1 y S2 pueden ser iguales o pueden ser diferentes.

Los ligandos de azúcar L1 y L2 están preferiblemente enlazados a S1 y S2 a través de enlaces glucósido. S1 y S2 pueden estar enlazados cada uno al anillo de benceno, por ejemplo, a través de un enlace -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH-.

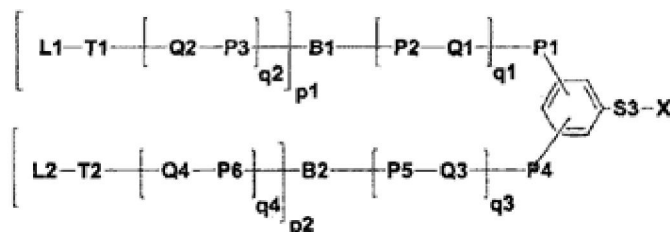
S3 no está particularmente limitado, siempre que su estructura enlace el oligonucleótido X al anillo de benceno. Puede adoptarse una estructura conocida en la técnica para su uso en conjugados de ácidos nucleicos.

El oligonucleótido X se enlaza preferiblemente a S3 a través de un enlace fosfodiéster. S3 puede estar enlazado al anillo de benceno, por ejemplo, a través de un enlace -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH-.

Por ejemplo, las estructuras descritas en las Publicaciones Internacionales N°s WO 2009/073809, WO 2013/075035, WO 2015/105083, WO 2014/179620 y WO 2015/006740 pueden adoptarse como enlazadores S1, S2 y S3.

En la presente divulgación, el conjugado de ácidos nucleicos es preferiblemente un conjugado de ácidos nucleicos que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula 2:

Fórmula 2:



En la fórmula 2,

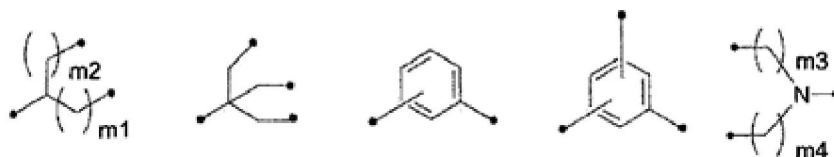
X, L1, L2 y S3 son cada uno como se define arriba,

P1, P2, P3, P4, P5 y P6, y T1 y T2 están, cada uno independientemente, ausentes, o son -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH-,

Q1, Q2, Q3 y Q4 están, cada uno independientemente, ausentes, o son alquileo con 1 a 12 átomos de carbono, sustituido o no sustituido, o - (CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-, en donde n es un número entero de 0 a 99,

B1 y B2 son, cada uno independientemente, un enlace, o cualquier estructura representada por la siguiente fórmula 2-1, en donde cada uno de los puntos terminales en cada una de las estructuras es un sitio de unión a P2 o P3, o P5 o P6, y m1, m2, m3 y m4 son, cada uno independientemente, un número entero de 0 a 10:

Fórmula 2-1:



p1 y p2 son, cada uno independientemente, un número entero de 1, 2 o 3, y q1, q2, q3 y q4 son, cada uno independientemente, un número entero de 0 a 10, con la condición de que cuando cada uno de p1 y p2 es un número entero de 2 o 3, cada uno de P3 y P6, Q2 y Q4, T1 y T2 o L1 y L2 sean iguales o diferentes.

P1 y P4 están cada uno independientemente ausentes, o son -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH- y son cada uno preferiblemente -O-, -O-CO-, -NH-CO- o -CO-NH-, más preferiblemente -O-, -NH-CO- o -CO-NH-, más preferiblemente -NH-CO-.

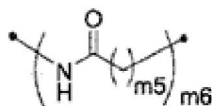
Cuando P1 o P4 es, por ejemplo, -NH-CO-, está presente una subestructura -NH-CO-anillo de benceno.

Q1, Q2, Q3 y Q4 están cada uno independientemente ausentes, o son alquileo sustituido o no sustituido que tiene de 1 a 12 átomos de carbono o $-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-$, en donde n es un número entero de 0 a 99, y son cada uno preferiblemente alquileo sustituido o no sustituido que tiene 1 a 12 átomos de carbono, más preferiblemente alquileo no sustituido que tiene 1 a 12 átomos de carbono, más preferiblemente alquileo no sustituido que tiene 1 a 6 átomos de carbono, aún más preferiblemente alquileo no sustituido que tiene 1 a 4 átomos de carbono.

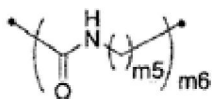
P2 y P5 están cada uno independientemente ausentes, o son -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH- y están cada uno independientemente ausentes, o son -CO-O- o -CO-NH-, más preferiblemente están ausentes o son -CO-NH-. Cuando cada uno de P2 y P5 es, por ejemplo, -CO-NH-, están presentes subestructuras B1-CO-NH-Q1 y B2-CO-NH-Q3.

-(P2-Q1)_{q1}- y -(P5-Q3)_{q3}- están cada uno de preferencia independientemente ausentes, o son cualquier estructura representada por las siguientes fórmulas 3-1 a 3-3:

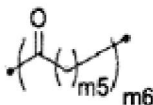
Fórmula 3-1:



Fórmula 3-2:

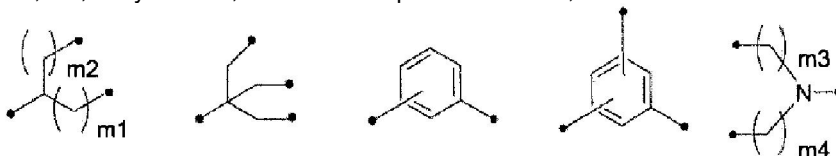


Fórmula 3-3:



En las fórmulas 3-1 a 3-3, m5 y m6 son, cada uno independientemente, un número entero de 0 a 10, y cada uno de los puntos terminales en las estructuras de las fórmulas 3-1 a 3-3 es un sitio de unión a B1 o B2, o P1 o P4.

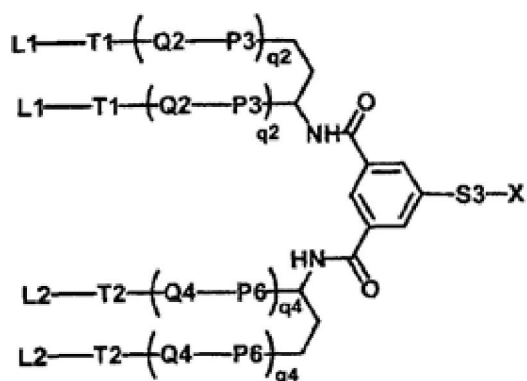
B1 y B2 son, cada uno independientemente, un enlace, o cualquier estructura representada por las siguientes fórmulas, en donde cada uno de los puntos terminales en cada una de las estructuras es un sitio de unión a P2 o P3, o P5 o P6, y m1, m2, m3 y m4 son, cada uno independientemente, un número entero de 0 a 10:



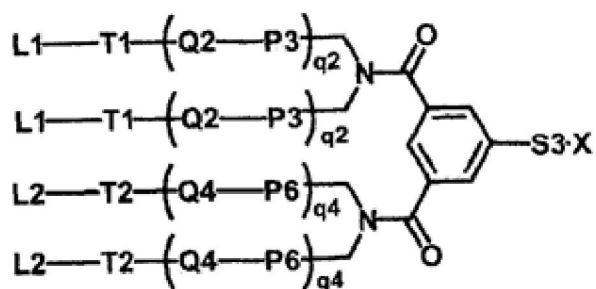
Cada uno de B1 y B2 es preferiblemente un grupo derivado de un aminoácido tal como ácido glutámico, ácido aspártico, lisina, incluyendo aminoácidos no naturales tales como ácido iminodiacético o un amino alcohol tal como 1,3-propanodiol. Cuando B1 y B2 son grupos derivados de ácido glutámico o ácido aspártico, se prefiere que el grupo amino de cada ácido glutámico o ácido aspártico esté unido mientras que P2 y P5 deben ser enlaces -NH-CO-. Cuando B1 y B2 son grupos derivados de lisina, se prefiere que el grupo carboxilo de cada lisina esté unido mientras que P2 y P5 deben ser enlaces -CO-NH-. Cuando B1 y B2 son grupos derivados del ácido iminodiacético, se prefiere que el grupo amino de cada ácido iminodiacético esté unido mientras que P2 y P5 deben ser enlaces -CO-.

En la presente divulgación, el conjugado de ácidos nucleicos es preferiblemente un conjugado de ácidos nucleicos que tiene una estructura representada por las siguientes fórmulas 4-1 a 4-9:

Fórmula 4-1:

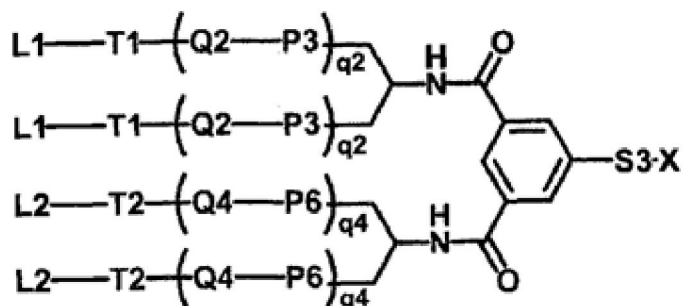


Fórmula 4-2:



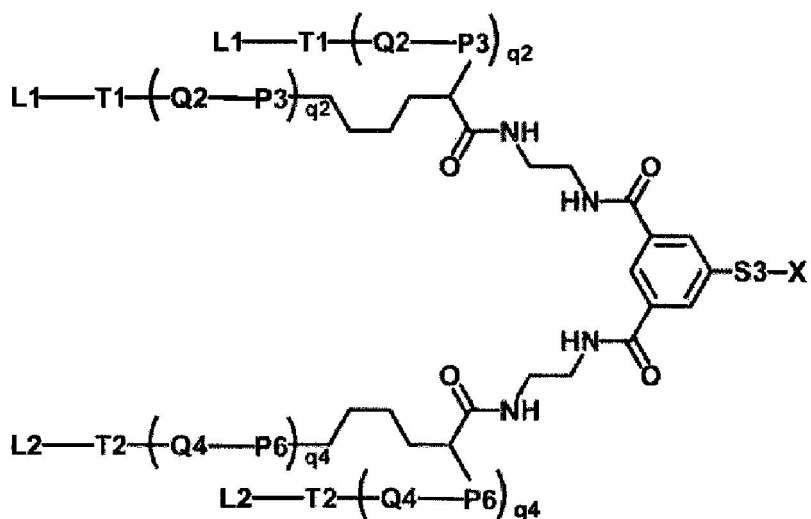
5

Fórmula 4-3:

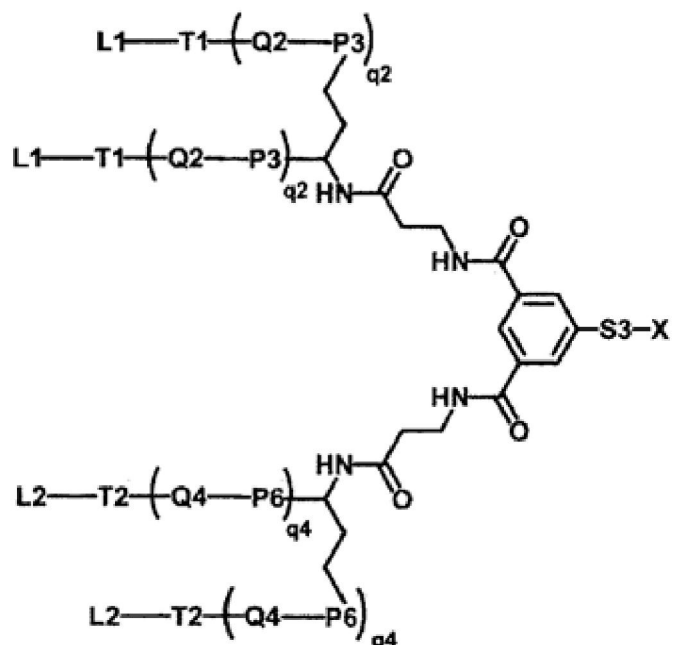


Fórmula 4-4:

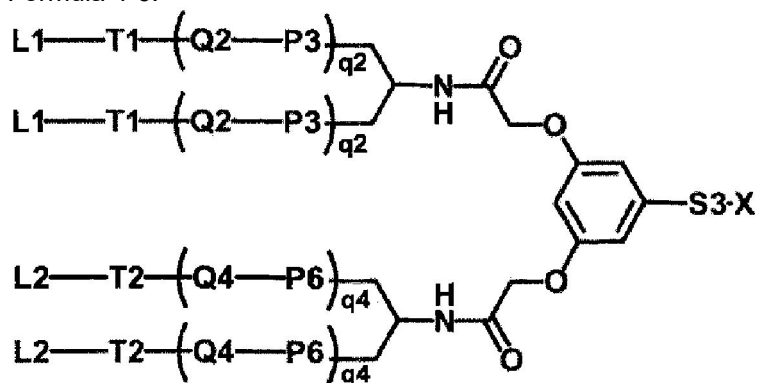
10



Fórmula 4-5:

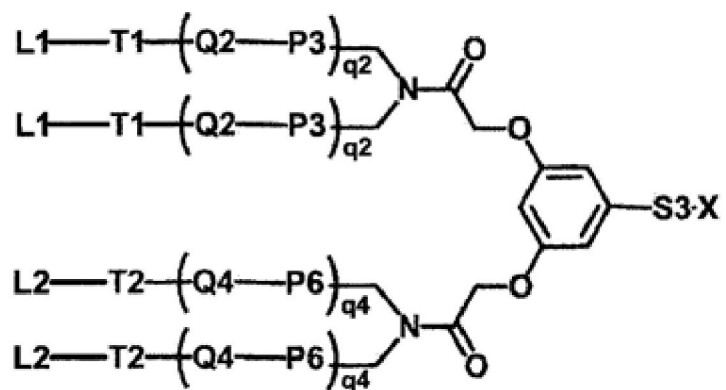


Fórmula 4-6:

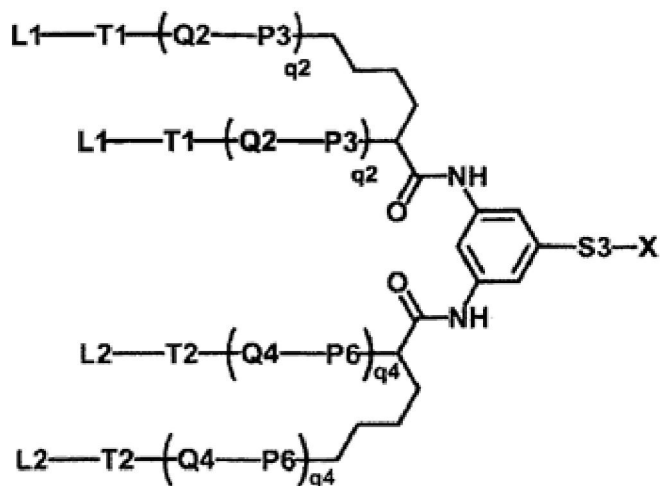


5

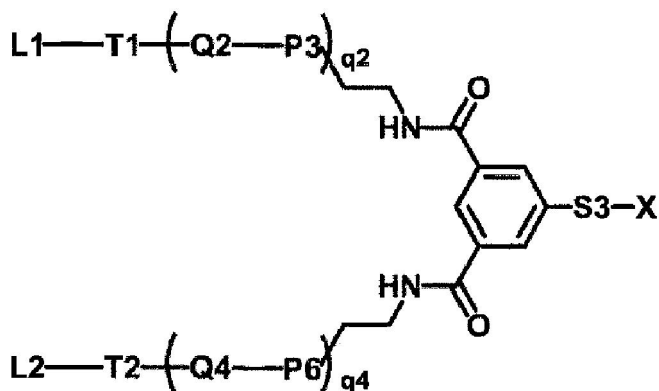
Fórmula 4-7:



Fórmula 4-8:



Fórmula 4-9:



5

En las fórmulas 4-1 a 4-9,

X, L1, L2, S3, P3, P6, T1, T2, Q2, Q4, q2 y q4 son cada uno como se define arriba,

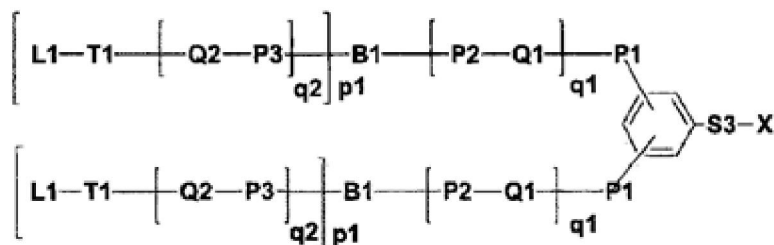
- 10 P3 y P6 están cada uno independientemente ausentes, o son -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH- y son cada uno preferiblemente -O-CO- o -NH-CO-, más preferiblemente -NH-CO-. Cuando cada uno de P3 y P6 es, por ejemplo, -NH-CO-, están presentes subestructuras B1-NH-CO-Q2 y B2-NH-CO-Q4.

- 15 T1 y T2 están cada uno independientemente ausentes, o son -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH- y son cada uno preferiblemente -O- o -S-, más preferiblemente -O-.

En la presente divulgación, el conjugado de ácidos nucleicos es preferiblemente un conjugado de ácidos nucleicos que tiene una estructura representada por la fórmula 5 que figura a continuación:

- 20 En la fórmula 5, P1 y P4 en la fórmula 2 son iguales; P2 y P5 en la fórmula 2 son iguales; P3 y P6 en la fórmula 2 son iguales; Q1 y Q3 en la fórmula 2 son iguales; Q2 y Q4 en la fórmula 2 son iguales; B1 y B2 en la fórmula 2 son iguales; T1 y T2 en la fórmula 2 son iguales; L1 y L2 en la fórmula 2 son iguales; p1 y p2 en la fórmula 2 son iguales; q1 y q3 en la fórmula 2 son iguales; y q2 y q4 en la fórmula 2 son iguales.

Fórmula 5:



25

En la fórmula 5,

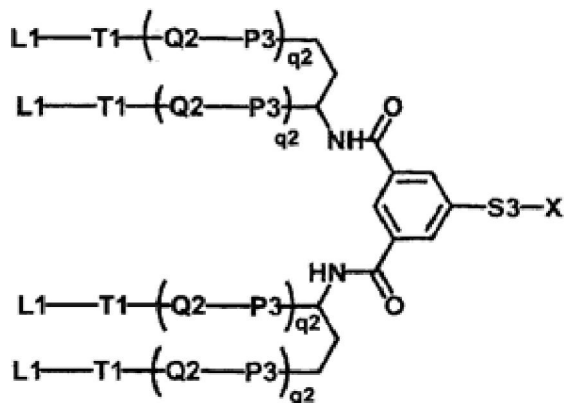
X, S3, P1, P2, P3, Q1, Q2, B1, T1, L1, p1, q1 y q2 son cada uno como se define arriba,

X, S3, P1, P2, P3, Q1, Q2, B1, T1, L1, p1, q1 y q2 en la fórmula 5 pueden ser cada uno cualquiera de los grupos preferidos arriba mencionados. P1 es preferiblemente -CO-NH-, -NH-CO- u -O-.

5 -(P2-Q1)_{q1} en la fórmula 5 está preferiblemente ausente, o es cualquier estructura representada por las fórmulas 3-1 a 3-3 arriba descritas.

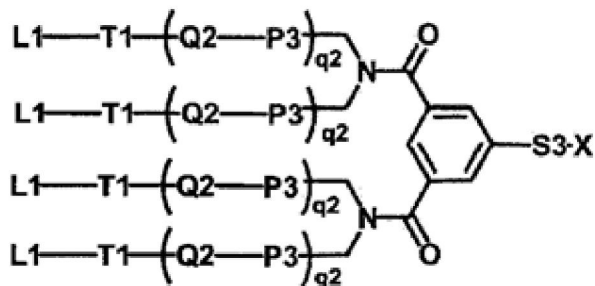
En la presente divulgación, el conjugado de ácidos nucleicos es preferiblemente un conjugado de ácidos nucleicos que tiene una estructura representada por las siguientes fórmulas 6-1 a 6-9:

Fórmula 6-1:

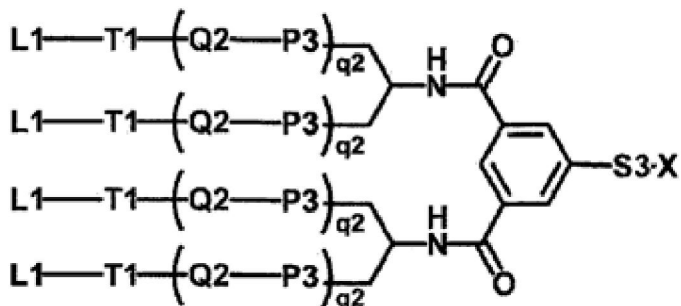


10

Fórmula 6-2:

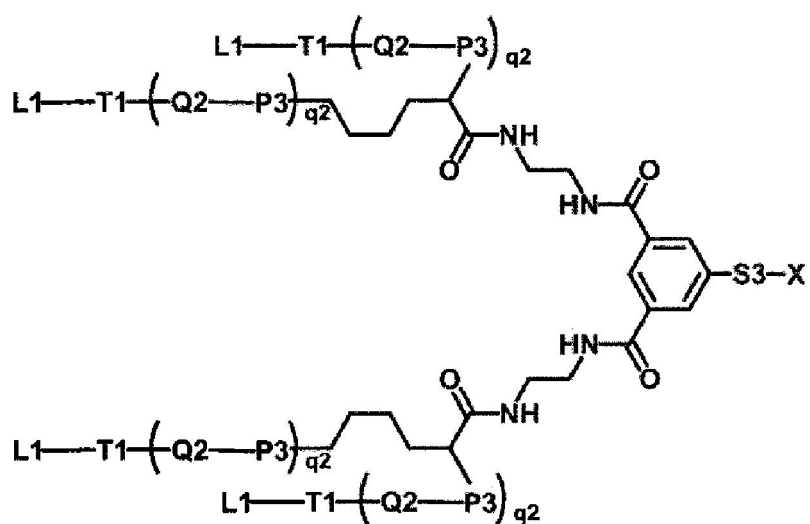


Fórmula 6-3:

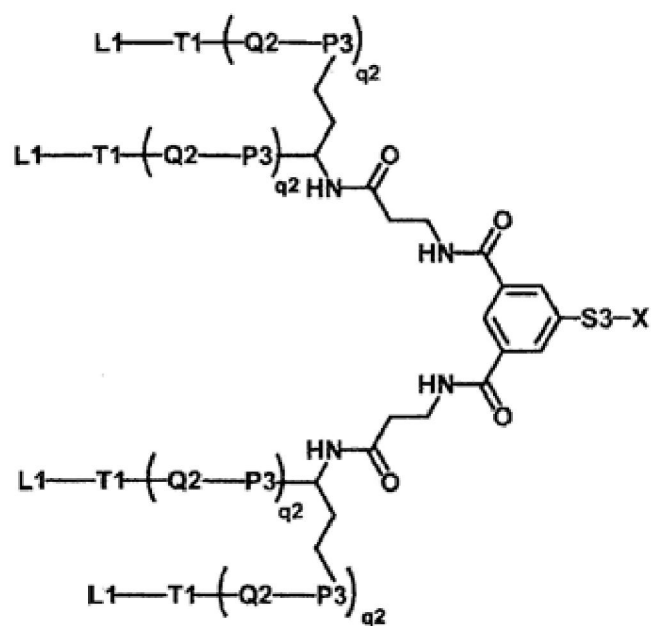


15

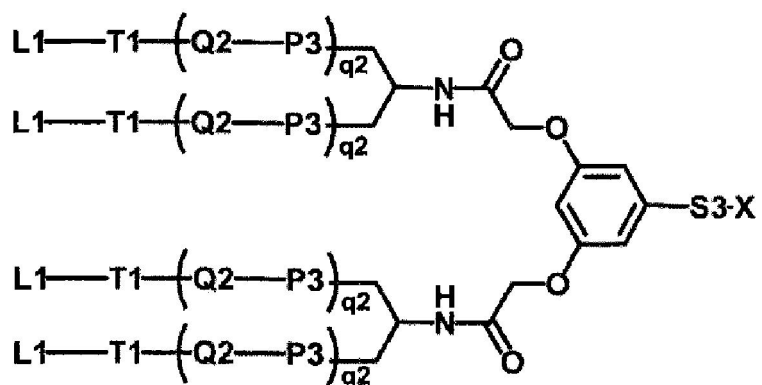
Fórmula 6-4:



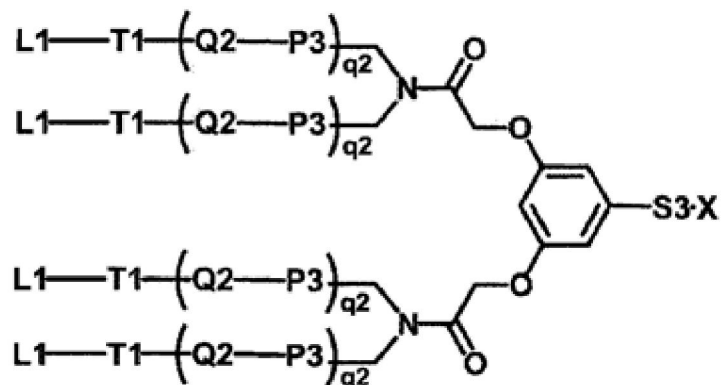
Fórmula 6-5:



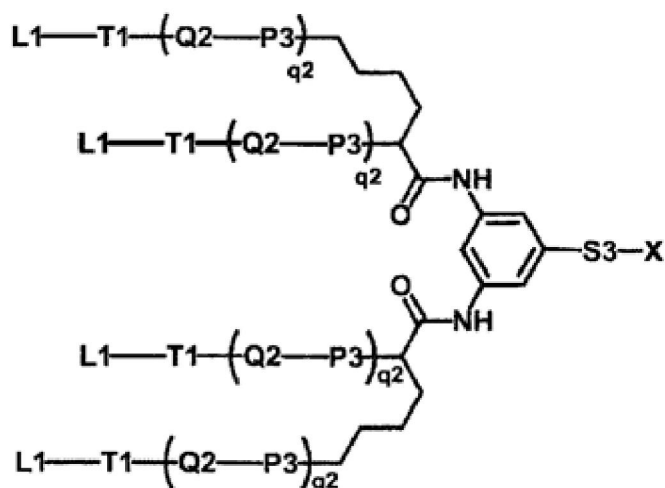
5 Fórmula 6-6:



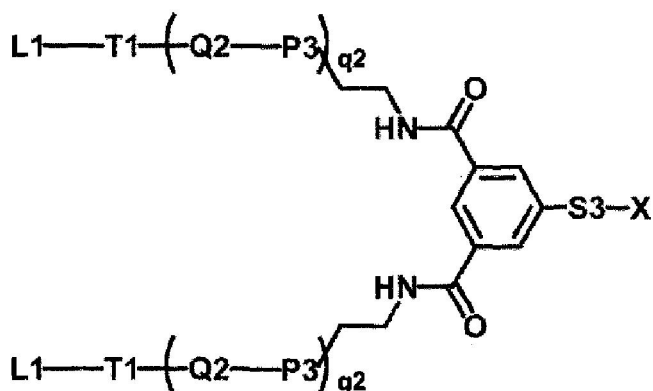
Fórmula 6-7:



Fórmula 6-8:



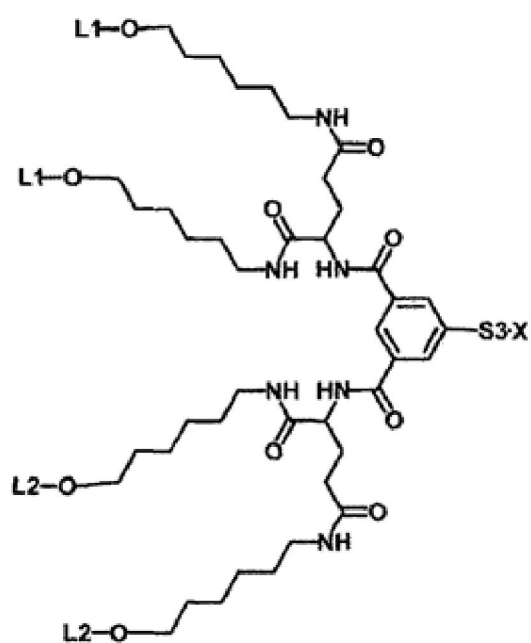
5 Fórmula 6-9:



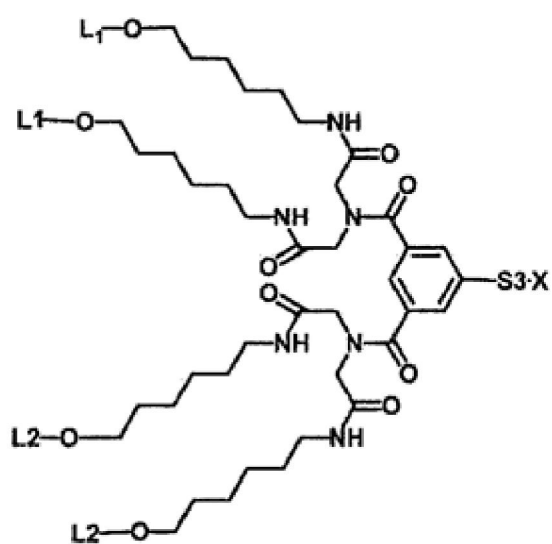
10 En las fórmulas 6-1 a 6-9,
X, S3, P3, Q2, T1 y L1 son cada uno como se define arriba.

En la presente invención, el conjugado de ácidos nucleicos es un conjugado de ácidos nucleicos que tiene cualquier estructura representada por las siguientes fórmulas 7-1 a 7-9:

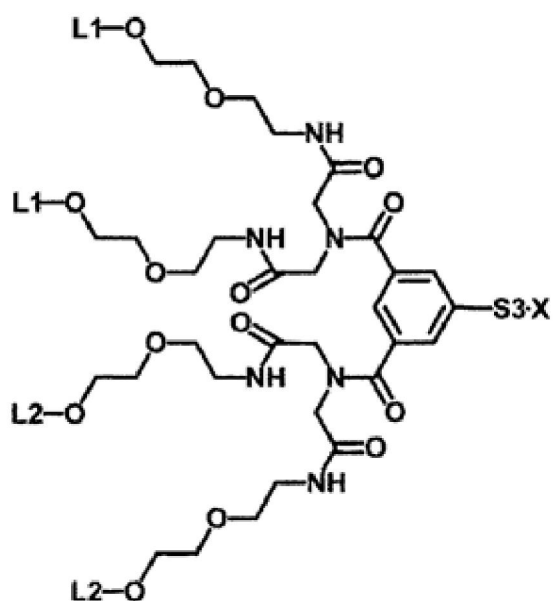
Fórmula 7-1:



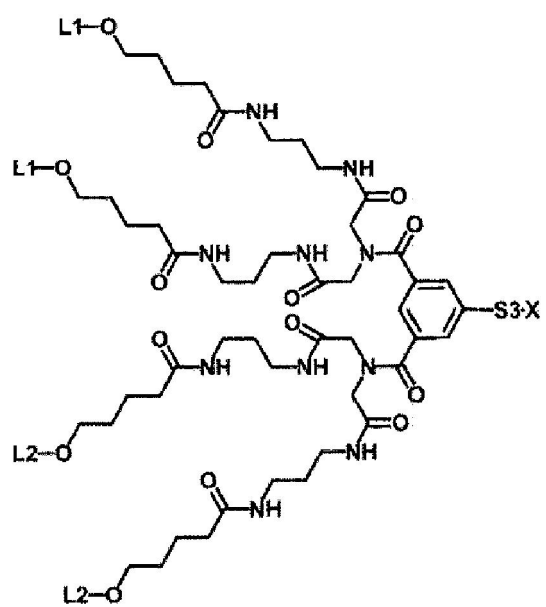
Fórmula 7-2:



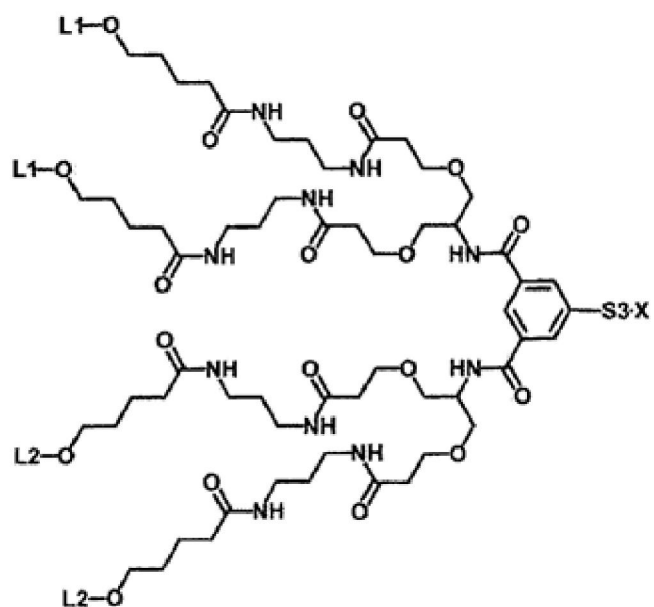
Fórmula 7-3:



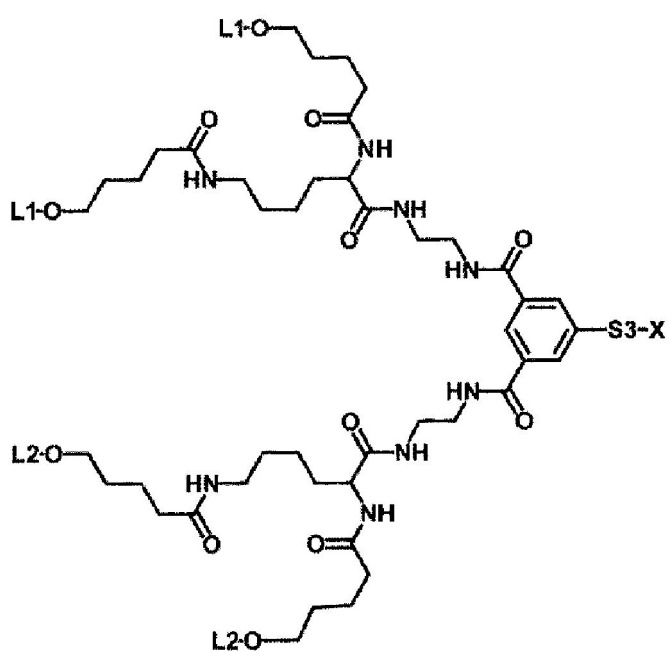
Fórmula 7-4:



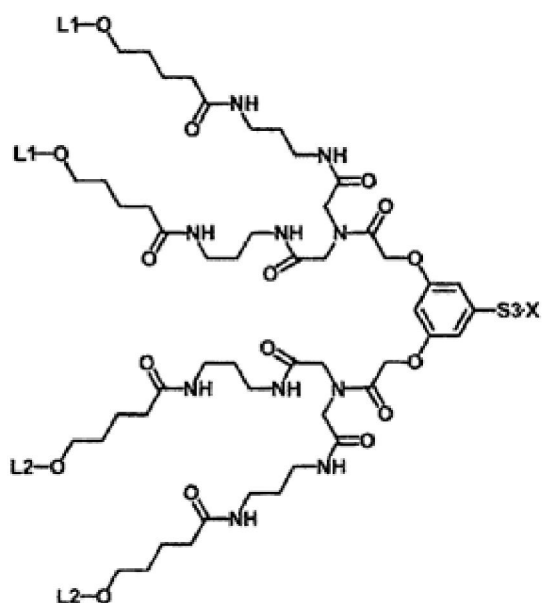
Fórmula 7-5:



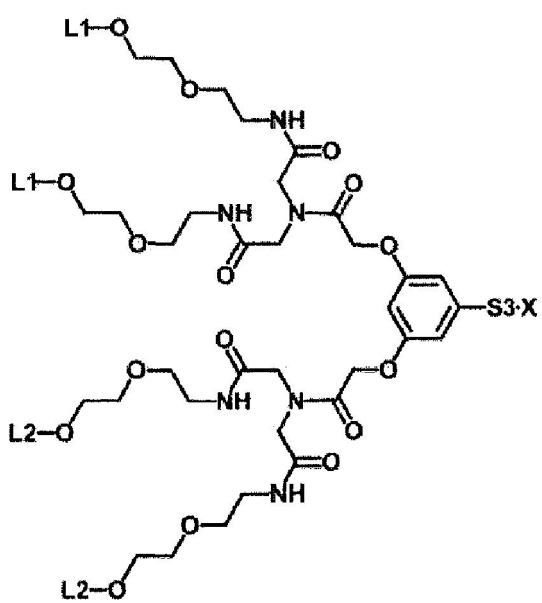
Fórmula 7-6:



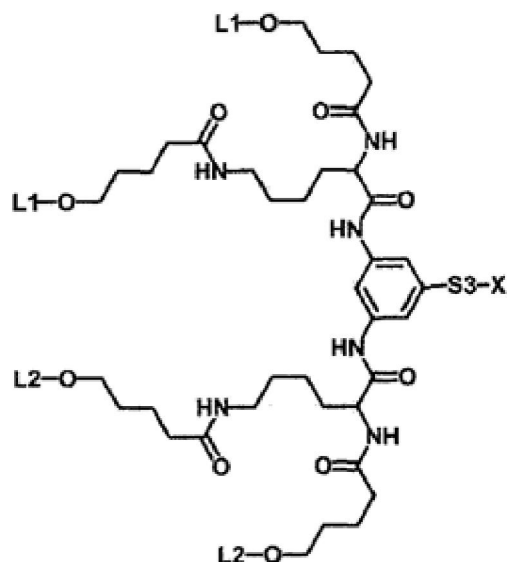
Fórmula 7-7:



Fórmula 7-8:



Fórmula 7-9:



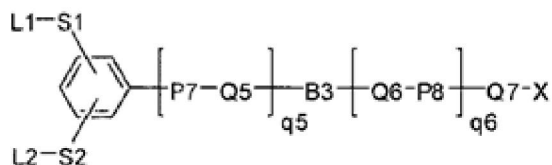
En las fórmulas 7-1 a 7-9,

X, L1, L2 y S3 son cada uno como se define arriba. L1 y L2 pueden ser iguales o pueden ser diferentes y son preferiblemente iguales.

También se puede producir un derivado de ácidos nucleicos distinto del conjugado de ácidos nucleicos que tenga cualquier estructura representada por las fórmulas 7-1 a 7-9, introduciendo cadenas de alquileo que difieran en longitud de la cadena como cada resto del grupo alquileo en las fórmulas 7-1 a 7-9, o reemplazando un enlace amida o similar por otro enlace.

En la presente divulgación, el conjugado de ácidos nucleicos es preferiblemente un conjugado de ácidos nucleicos que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula 11:

Fórmula 11:



En la fórmula 11,

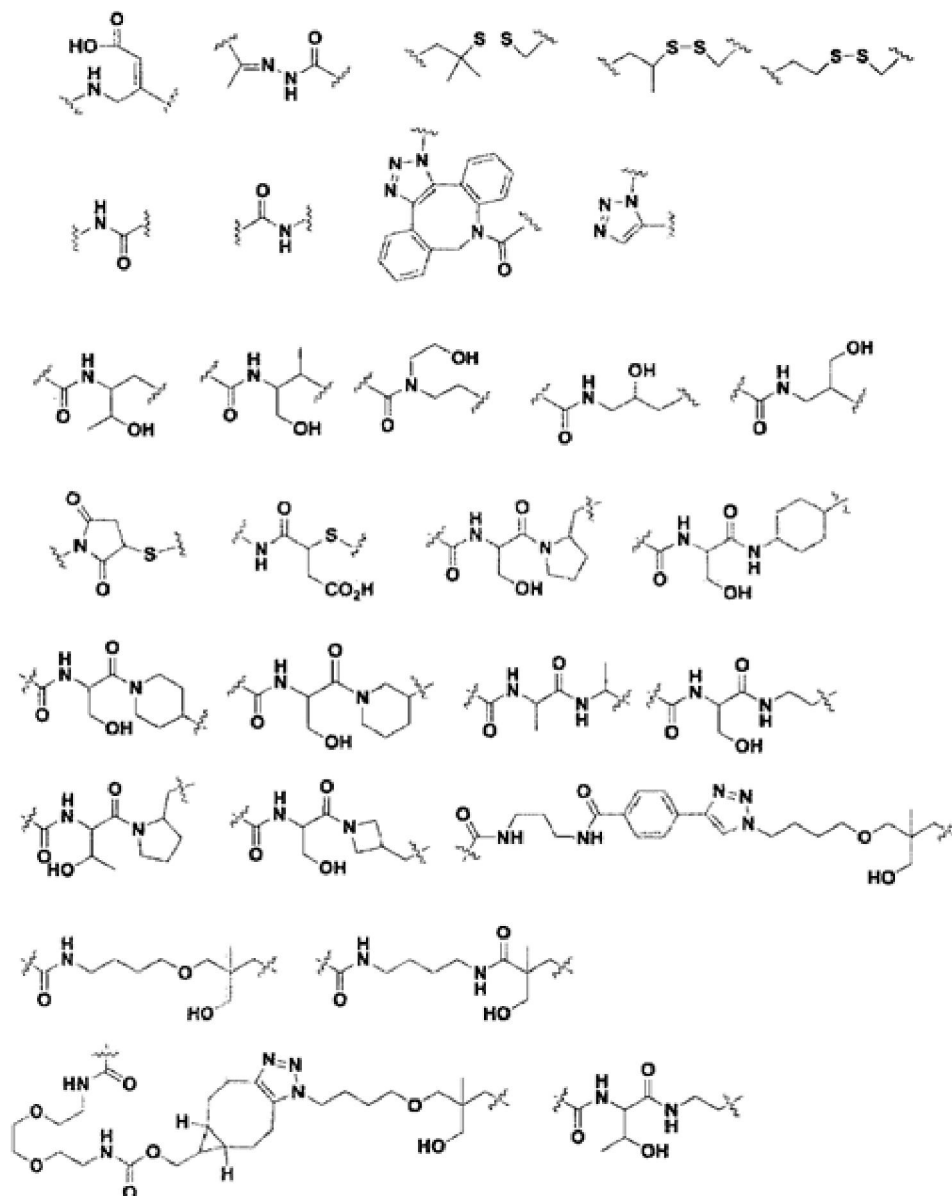
L1, L2, S1 y S2 son cada uno como se define arriba,

P7 y P8 están, cada uno independientemente, ausentes, o son -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH-,

Q5, Q6 y Q7 están, cada uno independientemente, ausentes, o son alquileo con 1 a 12 átomos de carbono, sustituido o no sustituido, o $-(CH_2CH_2O)_{n8}-CH_2CH_2-$, en donde n8 es un número entero de 0 a 99,

B3, al que se alude como una unidad de ramificación en la presente memoria descriptiva, es cualquier estructura representada por la siguiente fórmula 11-1, en donde las líneas discontinuas significan respectivamente enlaces a Q5 y Q6:

Fórmula 11-1:



y

q5 y q6 son, cada uno independientemente, un número entero de 0 a 10,

- 5 P7 está ausente, o es -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH- y es preferiblemente -O-, -NH-CO- o -CO-NH-, más preferiblemente -O- o -NH-CO-. Cuando P7 es, por ejemplo, -O-, está presente una subestructura anillo de benceno-O-.

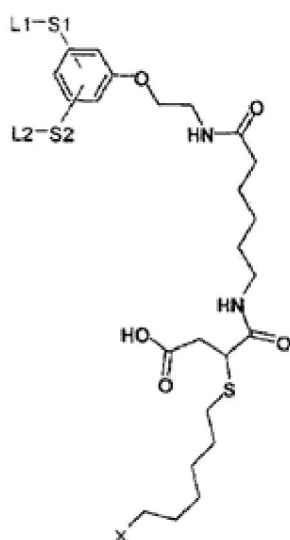
- 10 P8 está ausente, o es -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH-. Cuando P8 está presente, P8 es preferiblemente -CO-O- o -CO-NH-, más preferiblemente -CO-NH-. Cuando P8 es, por ejemplo, -CO-NH-, está presente una subestructura Q6-CO-NH-.

- 15 Q5, Q6 y Q7 están cada uno independientemente ausentes, o son alquileo sustituido o no sustituido que tiene de 1 a 12 átomos de carbono o $-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-$, en donde n8 es un número entero de 0 a 99, y son cada uno preferiblemente alquileo sustituido o no sustituido que tiene 1 a 12 átomos de carbono, más preferiblemente alquileo no sustituido que tiene 1 a 12 átomos de carbono, más preferiblemente alquileo no sustituido que tiene 1 a 6 átomos de carbono.

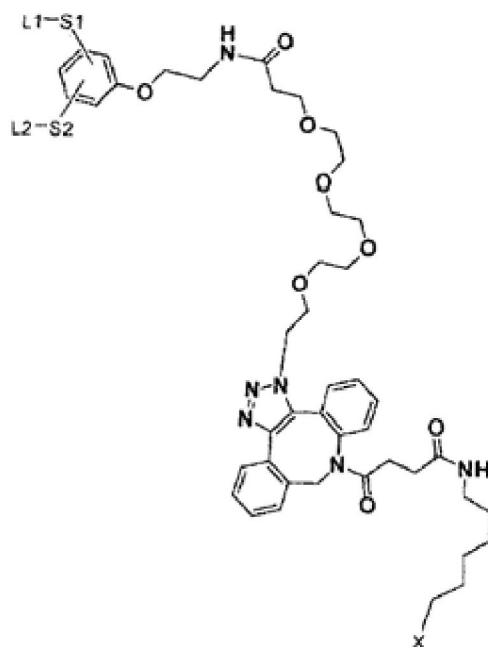
- 20 Preferiblemente, $-(P7-Q5)_{q5}-$ es -O- $(CH_2)_{m15}-NH-$ o $-NH-CO-(CH_2)_{m16}-NH-$, y m15 y m16 son, cada uno independientemente, un número entero de 1 a 10.

En la presente divulgación, el conjugado de ácidos nucleicos es preferiblemente un conjugado de ácidos nucleicos que tiene una estructura representada por las siguientes fórmulas 12-1 a 12-12:

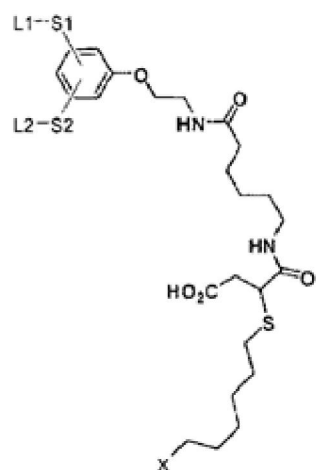
Fórmula 12-1:



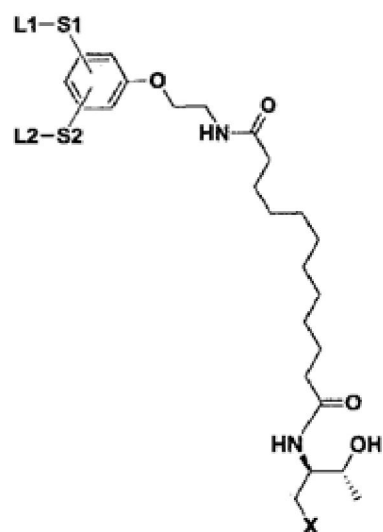
Fórmula 12-2:



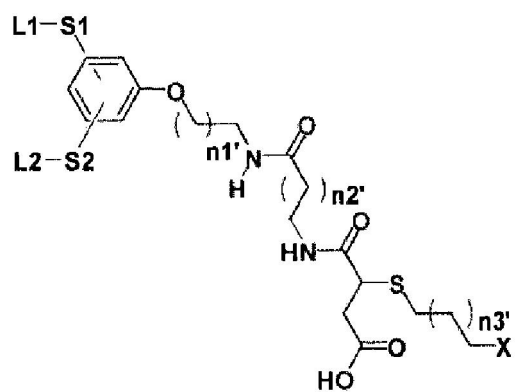
Fórmula 12-3:



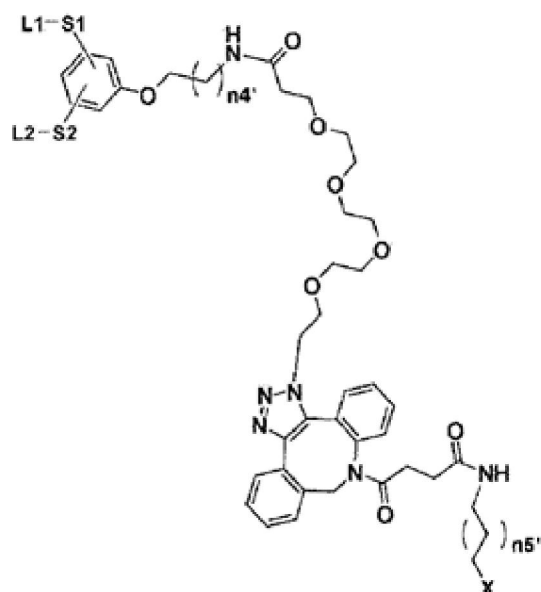
Fórmula 12-4:



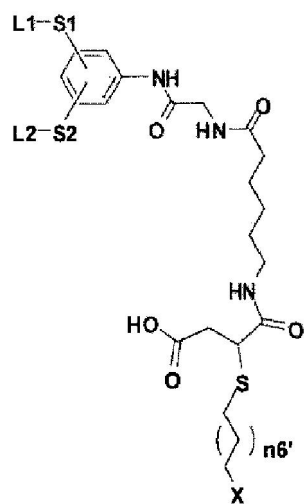
5 Fórmula 12-5:



Fórmula 12-6:

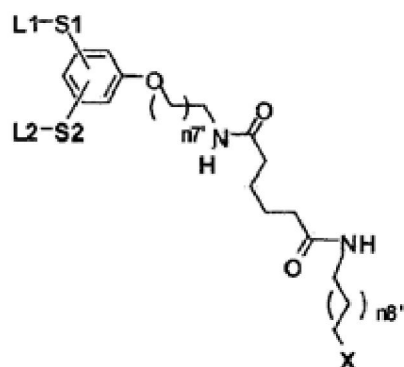


Fórmula 12-7:

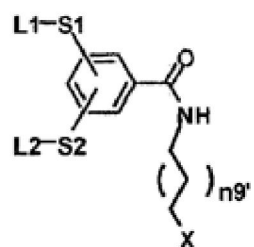


5

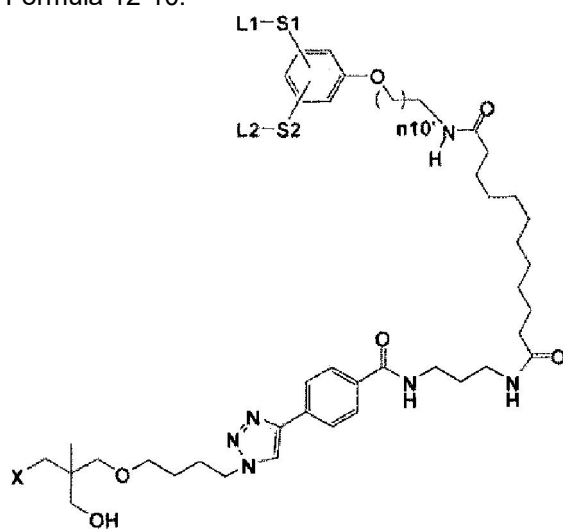
Fórmula 12-8:



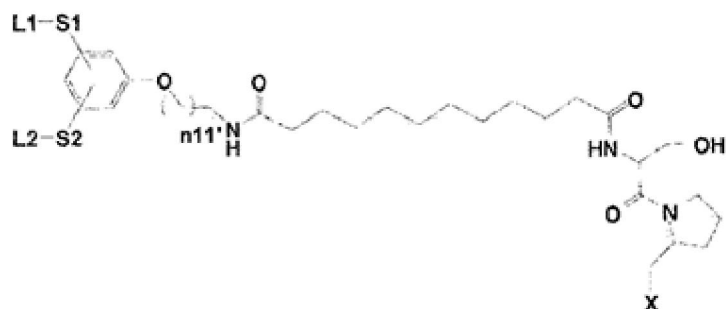
Fórmula 12-9:



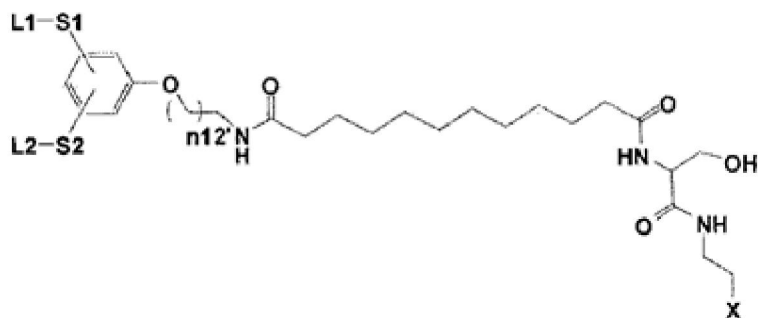
Fórmula 12-10:



Fórmula 12-11:



Fórmula 12-12:



En las fórmulas 12-1 a 12-12,
X, L1, L2, S1 y S2 son cada uno como se definió arriba, y n1' a n12' son, cada uno independientemente, un número entero de 1 a 10.

El conjugado de ácidos nucleicos de la presente divulgación es preferiblemente un conjugado de ácidos nucleicos que tiene tanto las estructuras de la fórmula 2 y la fórmula 11 como el conjugado de ácidos nucleicos representado por la fórmula 1. El conjugado de ácidos nucleicos tiene la estructura de la fórmula 11, y la fórmula 2 puede ser cualquiera de las fórmulas 4-1 a 4-9, puede ser cualquiera de las fórmulas 6-1 a 6-9, o puede ser cualquiera de las fórmulas 7-1 a 7-9. Cuando la fórmula 2 es cualquiera de las fórmulas 4-1 a 4-9, las fórmulas 6-1 a 6-9 o las fórmulas 7-1 a 7-9, la fórmula 11 puede ser cualquiera de las fórmulas 12-1 a 12-12. El conjugado de ácidos nucleicos de la presente divulgación es más preferiblemente un conjugado de ácidos nucleicos que tiene tanto una estructura cualquiera de fórmulas 4-1 a 4-9 como una estructura cualquiera de fórmulas 12-1 a 12-12, un conjugado de ácidos nucleicos que tiene tanto una estructura cualquiera de fórmulas 6-1 a 6-9 como una estructura cualquiera de fórmulas 12-1 a 12-12, o un conjugado de ácidos nucleicos que tiene tanto una estructura cualquiera de fórmulas 7-1 a 7-9 como una estructura cualquiera de las fórmulas 12-1 a 12-12, tal como el conjugado de ácidos nucleicos representado por la fórmula 1.

El conjugado de ácidos nucleicos de la presente divulgación puede formar una sal con un anión farmacéuticamente aceptable cuando los iones hidrógeno se coordinan con un solo par de electrones en cualquier átomo de nitrógeno.

En la presente invención, ejemplos del anión farmacéuticamente aceptable incluyen: iones inorgánicos, tales como iones cloruro, iones bromuro, iones nitrato, iones sulfato e iones fosfato; e iones de ácidos orgánicos, tales como iones acetato, iones oxalato, iones maleato, iones fumarato, iones citrato, iones benzoato e iones metanosulfonato.

Se describirá un método para producir el conjugado de ácidos nucleicos de la presente invención. En los métodos de producción que se dan más adelante, si los grupos definidos reaccionan bajo las condiciones de los métodos de producción o no son adecuados para llevar a cabo los métodos de producción, los compuestos de interés se pueden producir mediante el uso de métodos para introducir y eliminar grupos protectores comúnmente utilizados en la química orgánica sintética [p. ej., métodos descritos en *Protective Groups in Organic Synthesis*, tercera edición, T.W. Greene, John Wiley & Sons Inc. (1999)] o similares. Si es necesario, se puede cambiar el orden de las etapas de reacción, incluida la introducción de sustituyentes y similares.

El polímero de ácidos nucleicos representado por la fórmula 1 también se puede sintetizar mediante síntesis en fase sólida.

El polímero de ácidos nucleicos representado por la fórmula 1 se puede sintetizar con referencia a un método para sintetizar una estructura de enlazador conocida en la técnica para conjugados de ácidos nucleicos.

La síntesis de una unidad de anillo LI-benceno que tiene el enlazador S1 o una unidad de anillo L2-benceno que tiene el enlazador S2 en el conjugado de ácidos nucleicos representado por la fórmula 1 se describirá tomando el conjugado de ácidos nucleicos representado por la fórmula 2 como ejemplo.

La unidad de anillo LI-benceno y la unidad de anillo L2-benceno en el conjugado de ácidos nucleicos representado por la fórmula 2 tienen enlaces por P1, P2, P3, P4, P5 y P6, y T1 y T2.

El enlace -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH- representado por P1, P2, P3, P4, P5 y P6, y T1 y T2 se puede sintetizar apropiadamente seleccionando un material de partida adecuado para formar la estructura representada por la fórmula 2 con referencia a métodos para la reacción de unión descritos en, por ejemplo, *The Fourth Series of Experimental Chemistry 19, "Synthesis of Organic Compound I"*, Maruzen Co., Ltd. (1992) y *The Fourth Series of Experimental Chemistry 20, "Synthesis of Organic Compound II"*, Maruzen Co., Ltd. (1992).

Se puede producir una subestructura de la unidad de anillo de LI-benceno uniendo secuencialmente al anillo de benceno un compuesto que tiene Q1 como subestructura y un compuesto que tiene B1 como subestructura.

La estructura de la unidad de anillo L1-benceno se puede producir sintetizando por separado un compuesto que tiene L1 y Q2 como subestructura, y uniendo el compuesto que tiene L1 y Q2 como subestructura a un compuesto que tiene una subestructura de una unidad de anillo L1-benceno que tiene el anillo de benceno, Q1 y B1 como subestructura.

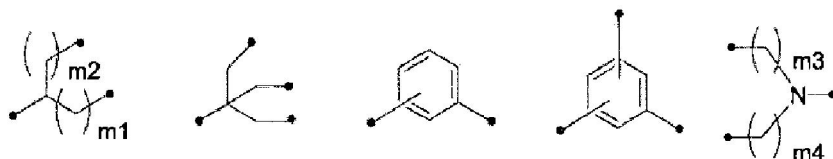
Asimismo, se puede producir una subestructura de la unidad de anillo de L2-benceno uniendo secuencialmente al anillo de benceno un compuesto que tiene Q3 como subestructura y un compuesto que tiene B2 como subestructura.

La estructura de la unidad de anillo L2-benceno se puede producir sintetizando por separado un compuesto que tiene L2 y Q4 como subestructura, y uniendo el compuesto que tiene L2 y Q4 como subestructura a un compuesto que tiene una subestructura de una unidad de anillo L2-benceno que tiene el anillo de benceno, Q3 y B2 como subestructura.

Ejemplos del compuesto que tiene Q1 como subestructura y el compuesto que tiene Q3 como subestructura incluyen compuestos que tienen un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo, un grupo amino y/o un grupo tiol en ambos extremos del alquileo que tiene 1 a 10 átomos de carbono o $-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-$.

Ejemplos del compuesto que tiene B1 como subestructura y el compuesto que tiene B2 como subestructura incluyen compuestos que tienen cualquier estructura representada por la siguiente fórmula 2-1 y que tienen un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo, un grupo amino o un grupo tiol en cada uno de los puntos terminales en cada una de las estructuras:

Fórmula 2-1:



Ejemplos específicos del compuesto que tiene B1 como subestructura y del compuesto que tiene B2 como subestructura incluyen glicol, ácido glutámico, ácido aspártico, lisina, Tris, ácido iminodiacético y 2-amino-1,3-propanodiol. Se prefieren ácido glutámico, ácido aspártico, lisina o ácido iminodiacético.

La estructura de unidad de anillo de L1-benceno se puede producir sintetizando un compuesto que tiene L1, Q2 y B1 como subestructura y luego uniendo este compuesto a un compuesto que tiene Q1 y el anillo de benceno.

La estructura de unidad de anillo de L2-benceno se puede producir sintetizando un compuesto que tiene L2, Q4 y B2 como subestructura y luego uniendo este compuesto a un compuesto que tiene Q3 y el anillo de benceno.

En la presente invención, la subestructura $[L1-T1-(Q2-P3)_{q2}]_{p1}$ -B1-(P2-Q1) $_{q1}$ -P1- y la subestructura $[L2-T2-(Q3-P6)_{q4}]_{p2}$ -B2-(P5-Q3) $_{q3}$ -P2- pueden ser iguales o diferentes y preferiblemente son iguales.

Ejemplos de la unidad correspondiente a L1-T1-Q2 en el ligando de azúcar incluyen L3-T1-Q2-COOH y L3-T1-(Q2-P3) $_{q2}$ -Q2-NH₂. Ejemplos específicos de las mismas incluyen L3-O-alquileo que tiene 1 a 12 átomos de carbono-COOH y L3-alquileo que tiene 1 a 12 átomos de carbono-CO-NH-alquileo que tiene de 2 a 12 átomos de carbono-NH₂.

L3 no está particularmente limitado, siempre que L3 sea un derivado de ligando de azúcar que se convierte en L1 por desprotección. El sustituyente en el ligando de azúcar no está particularmente limitado siempre que el sustituyente se utilice de forma rutinaria en el campo de la química de los hidratos de carbono. Se prefiere un grupo Ac.

Específicamente, la unidad de anillo L1-benceno que tiene el enlazador S1 o la unidad de anillo L2-benceno que tiene el enlazador S2 se puede sintetizar aumentando o disminuyendo apropiadamente el número de átomos de carbono de una cadena de alquileo y utilizando un compuesto con un grupo amino terminal o un grupo carboxilo terminal convertido en un grupo capaz de formar un enlace -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH-, con referencia a un método descrito en los Ejemplos. La manosa o N-acetilgalactosamina se toma como ejemplo de ligando de azúcar L1 en los Ejemplos. Sin embargo, el ligando de azúcar L1 se puede cambiar por otros ligandos de azúcar para la práctica.

La síntesis de una unidad de anillo X-benceno que tiene el enlazador S3 en el conjugado de ácidos nucleicos representado por la fórmula 1 se describirá tomando el conjugado de ácidos nucleicos representado por la fórmula 11 como ejemplo.

La unidad de anillo X-benceno en el conjugado de ácidos nucleicos representado por la fórmula 11 tiene enlaces representados por P7 y P8, además del enlace del oligonucleótido.

El enlace -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH- representado por P7 y P8 se puede sintetizar apropiadamente seleccionando un material de partida adecuado para formar la estructura representada por la fórmula 11 con referencia a métodos para la reacción de unión descritos en, por ejemplo, The Fourth Series of Experimental Chemistry 19, "Synthesis of Organic Compound I", Maruzen Co., Ltd. (1992) y The Fourth Series of Experimental Chemistry 20, "Synthesis of Organic Compound II", Maruzen Co., Ltd. (1992).

Se puede producir una subestructura de la unidad de anillo de X-benceno uniendo secuencialmente al anillo de benceno un compuesto que tiene Q5 como subestructura y un compuesto que tiene B3 como subestructura.

La estructura de la unidad de anillo X-benceno se puede producir sintetizando por separado un compuesto que tiene X y Q7 como subestructura o un compuesto que tiene X y Q6 como subestructura y uniendo el compuesto que tiene X y Q7 como subestructura o el compuesto que tiene X y Q6 como subestructura a un compuesto que tiene una subestructura de una unidad de anillo X-benceno que tiene el anillo de benceno y Q5 como subestructura para construir el resto B3.

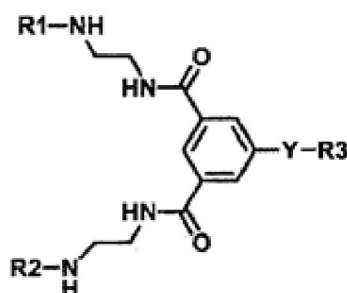
Específicamente, se tomará como ejemplo el caso de tener un grupo azida al final del compuesto que tiene una subestructura de una unidad de anillo X-benceno que tiene el anillo de benceno y Q5 como subestructura. La estructura de la unidad de anillo de X-benceno se puede producir haciendo reaccionar un oligonucleótido al que se le permite tener un grupo funcional de unión terminal tal como se describe en los Ejemplos, de modo que se forma un anillo de triazol por cicloadición para construir el resto B3.

Ejemplos del compuesto que tiene Q5 como subestructura y el compuesto que tiene Q6 como subestructura y el compuesto que tiene Q7 como subestructura incluyen compuestos que tienen un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo, un grupo amino y/o un grupo tiol en ambos extremos del alqueno que tiene 1 a 10 átomos de carbono o $-(CH_2CH_2O)_{n8}-CH_2CH_2-$.

La estructura de la unidad de anillo de L1-benceno, la estructura de la unidad de anillo de L2-benceno y la estructura de la unidad de anillo de X-benceno se pueden producir secuencialmente. Se prefiere sintetizar la estructura de la unidad de anillo de L1-benceno y la estructura de la unidad de anillo de L2-benceno y luego unir a ello la estructura de la unidad de anillo de X-benceno. Particularmente, se prefiere introducir X que tiene el resto oligonucleotídico en el compuesto cerca de la etapa final de la síntesis del conjugado de ligando de azúcar.

En la presente invención se obtiene un compuesto representado por las siguientes fórmulas 8 a 10 como compuesto intermedio de síntesis:

Fórmula 8:

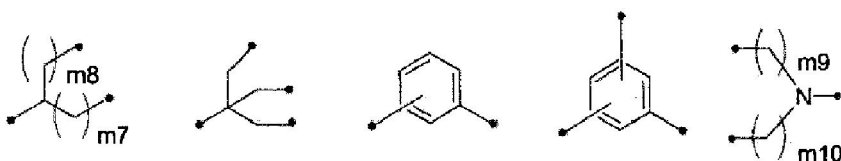


en donde

R1 y R2 son, cada uno independientemente, un átomo de hidrógeno, un grupo t-butoxicarbonilo (grupo Boc), un grupo benciloxicarbonilo (grupo Z), un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (grupo Fmoc), $-CO-R4$ o $-CO-B4-[(P9-Q8)_{q7}-T3-L3]_{p3}$, P9 y T3 están, cada uno independientemente, ausentes, o son $-CO-$, $-NH-$, $-O-$, $-S-$, $-O-CO-$, $-S-CO-$, $-NH-CO-$, $-CO-O-$, $-CO-S-$ o $-CO-NH-$,

Q8 está ausente, o es alqueno sustituido o no sustituido que tiene 1 a 12 átomos de carbono o $-(CH_2CH_2O)_{n1}-CH_2CH_2-$, en donde $n1$ es un número entero de 0 a 99, B4 es un enlace o cualquier estructura representada por la siguiente fórmula 8-1, en donde cada uno de los puntos terminales en cada una de las estructuras es un sitio de unión a un grupo carbonilo o P9, y $m7$, $m8$, $m9$ y $m10$ son, cada uno independientemente, un número entero de 0 a 10:

Fórmula 8-1:



$p3$ es un número entero de 1, 2 o 3,

$q7$ es un número entero de 0 a 10,

L3 es un ligando de azúcar,

Y es $-O-(CH_2)_{m11}-NH-$ o $-NH-CO-(CH_2)_{m12}-NH-$, en donde $m11$ y $m12$ son, cada uno independientemente, un número entero de 1 a 10,

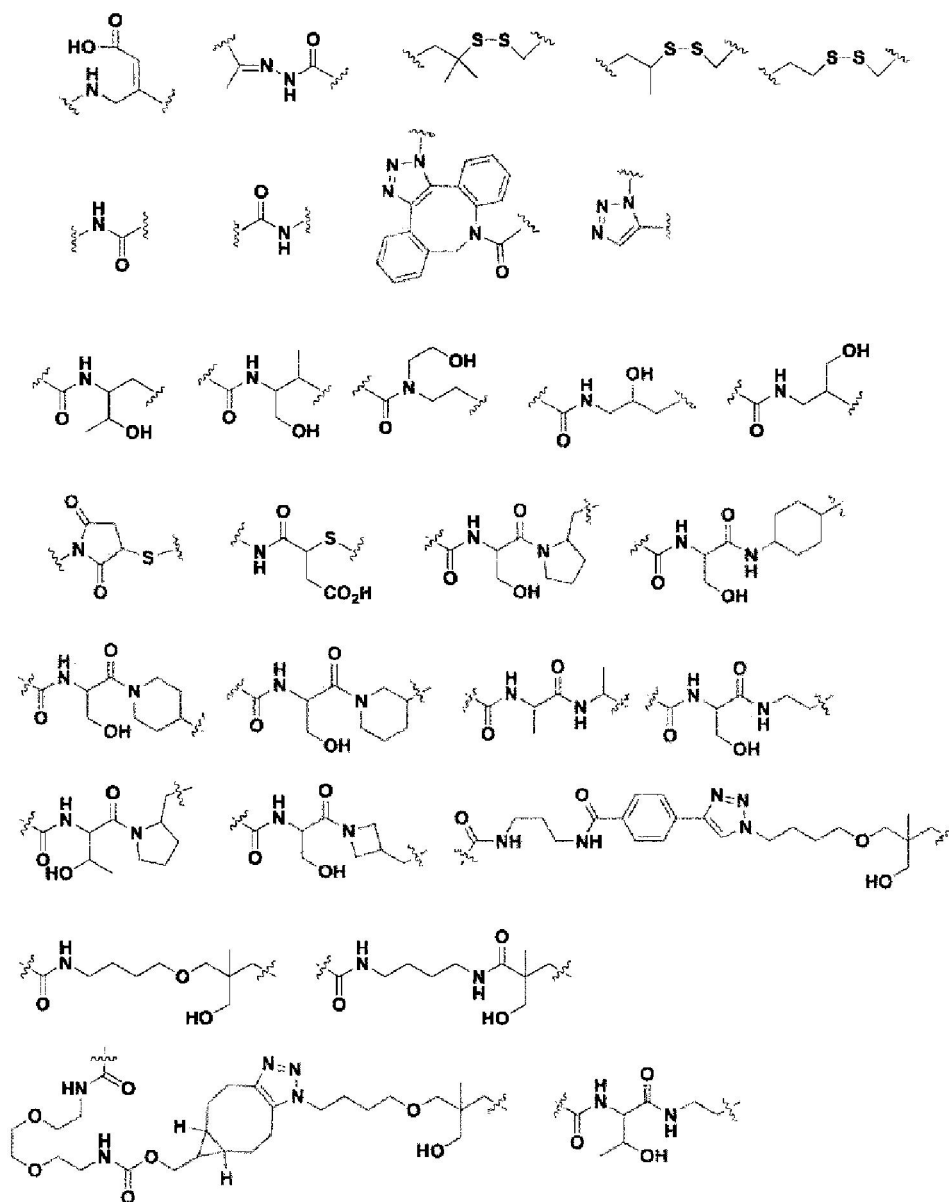
R3 es un átomo de hidrógeno, un grupo t-butoxicarbonilo, un grupo benciloxicarbonilo, un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, $-CO-R4$, $-CO-(CH_2CH_2O)_{n2}-CH_2CH_2-N3$ o $-CO-Q9-B5-(Q10-P10)_{q8}-X1$, en donde $n2$ es un número entero de 0 a 99,

P10 está ausente, o es $-CO-$, $-NH-$, $-O-$, $-S-$, $-O-CO-$, $-S-CO-$, $-NH-CO-$, $-CO-O-$, $-CO-S-$ o $-CO-NH-$,

Q9 y Q10 están, cada uno independientemente, ausentes, o son alqueno con 1 a 12 átomos de carbono, sustituido o no sustituido, o $-(CH_2CH_2O)_{n3}-CH_2CH_2-$, en donde $n3$ es un número entero de 0 a 99,

B5 es cualquier estructura representada por la siguiente fórmula 8-2, en donde las líneas discontinuas significan respectivamente enlaces a Q9 y Q10:

Fórmula 8-2:



q8 es un número entero de 0 a 10,

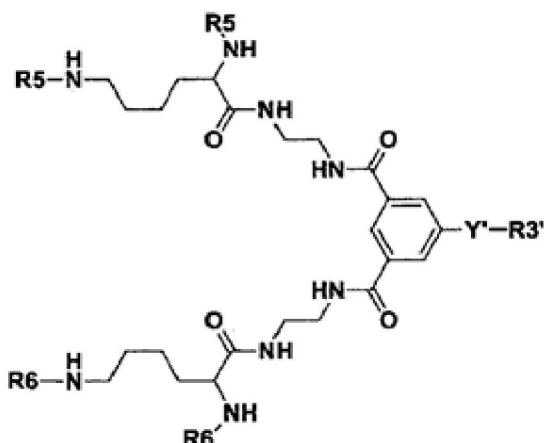
X1 es un átomo de hidrógeno o un soporte en fase sólida, y

R4 es un grupo alquilo que tiene de 2 a 10 átomos de carbono sustituidos con 1 o 2 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un grupo amino no sustituido o sustituido con un grupo t-butoxicarbonilo, un grupo benciloxicarbonilo o un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, un grupo carboxi, un grupo maleimida y un grupo aralquilocarbonilo.

5

En la presente divulgación se obtiene un compuesto representado por la siguiente fórmula 9 como compuesto intermedio de síntesis:

Fórmula 9:



en donde

R5 y R6 son, cada uno independientemente, un átomo de hidrógeno, un grupo t-butoxicarbonilo, un grupo benciloxicarbonilo, un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, -CO-R4' o -CO-Q11-(P11-Q11')_{q9}-T4-L4,

5 P11 y T4 están, cada uno independientemente, ausentes, o son -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH-,

cada uno de Q11 y Q11' está ausente o es alquileo con 1 a 12 átomos de carbono, sustituido o no sustituido, o -

(CH₂CH₂O)_{n4}-CH₂CH₂-, en donde n4 es un número entero de 0 a 99,

q9 es un número entero de 0 a 10,

10 L4 es un ligando de azúcar,

Y' es -O-(CH₂)_{m11}-NH- o -NH-CO-(CH₂)_{m12}-NH-, en donde m11' y m12' son, cada uno independientemente, un número

entero de 1 a 10,

R3' es un átomo de hidrógeno, un grupo t-butoxicarbonilo, un grupo benciloxicarbonilo, un grupo 9-

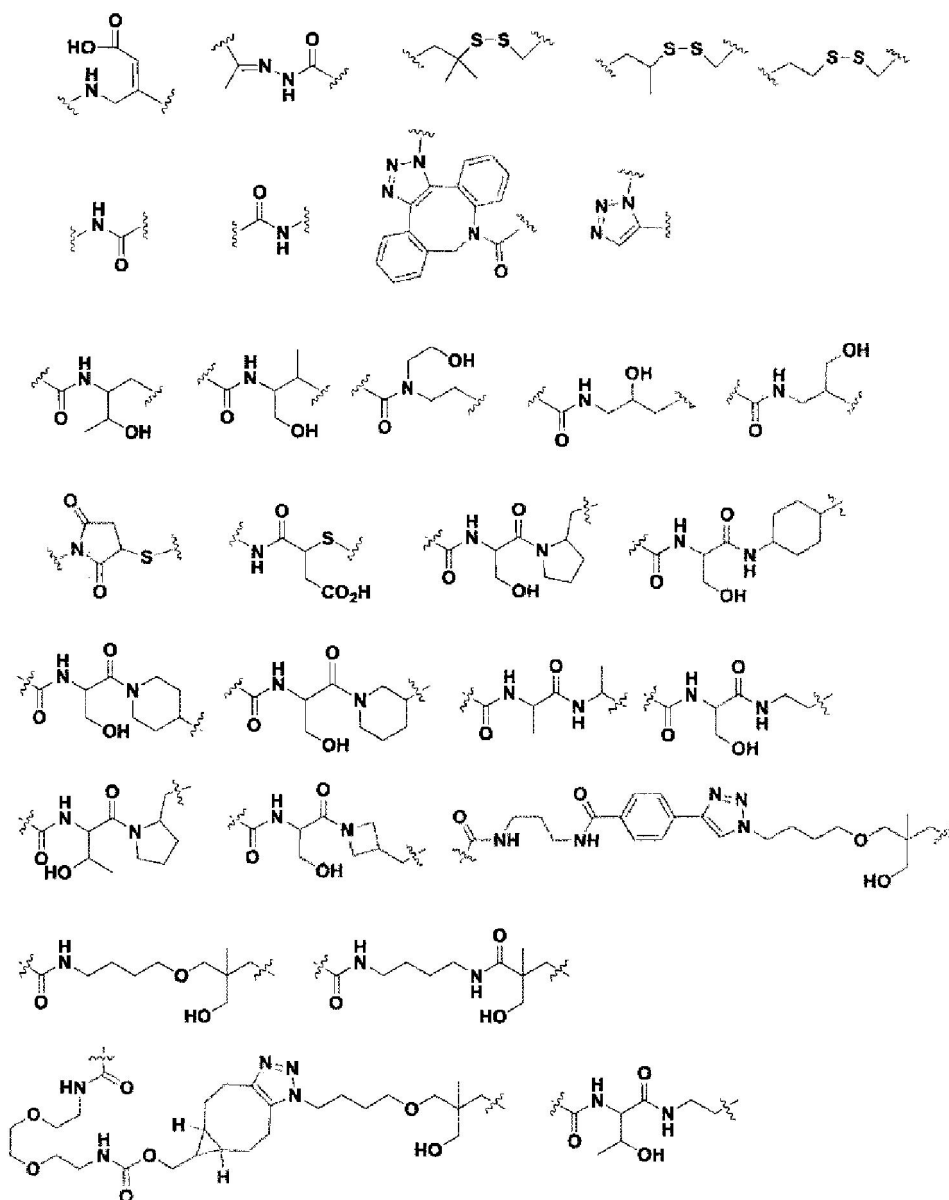
15 fluorenilmetiloxicarbonilo, -CO-R4', -CO-(CH₂CH₂O)_{n2}-CH₂CH₂-N₃ o -CO-Q9'-B5'-(Q10'-P10')_{q8}-X1', en donde n2 es un número entero de 0 a 99,

P10' está ausente, o es -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH-,

Q9' y Q10' están, cada uno independientemente, ausentes, o son alquileo con 1 a 12 átomos de carbono, sustituido o no sustituido, o - (CH₂CH₂O)_{n3}-CH₂CH₂-, en donde n3' es un número entero de 0 a 99,

20 B5' es cualquier estructura representada por la siguiente fórmula 9-1, en donde las líneas discontinuas significan respectivamente enlaces a Q9' y Q10':

Fórmula 9-1:



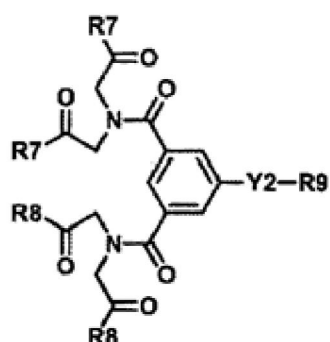
q8' es un número entero de 0 a 10,

X1' es un átomo de hidrógeno o un soporte en fase sólida, y

5 R4' es un grupo alquilo que tiene de 2 a 10 átomos de carbono sustituidos con 1 o 2 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un grupo amino no sustituido o sustituido con un grupo t-butoxicarbonilo, un grupo benciloxicarbonilo o un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, un grupo carboxi, un grupo maleimida y un grupo aralquiloxicarbonilo.

10 En la presente divulgación se obtiene un compuesto representado por la siguiente fórmula 10 como compuesto intermedio de síntesis:

Fórmula 10:



en donde

R7 y R8 son, cada uno independientemente, un grupo hidroxilo, un grupo t-butoxi, un grupo benciloxi, -NH-R10 o -NH-Q12- (P12-Q12')_{q10}-T4-L4,

P12 y T4 están, cada uno independientemente, ausentes, o son -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH-,

cada uno de Q12 y Q12' está ausente o es alquileo con 1 a 12 átomos de carbono, sustituido o no sustituido, o - (CH₂CH₂O)_{n2}-CH₂CH₂-, en donde n2 es un número entero de 0 a 99,

L4 es un ligando de azúcar,

Y2 es -O- (CH₂)_{m9}-NH- o -NH-CO-(CH₂)_{m10}-NH-, en donde m9 y m10 son, cada uno independientemente, un número entero de 1 a 10,

q10 es un número entero de 0 a 10,

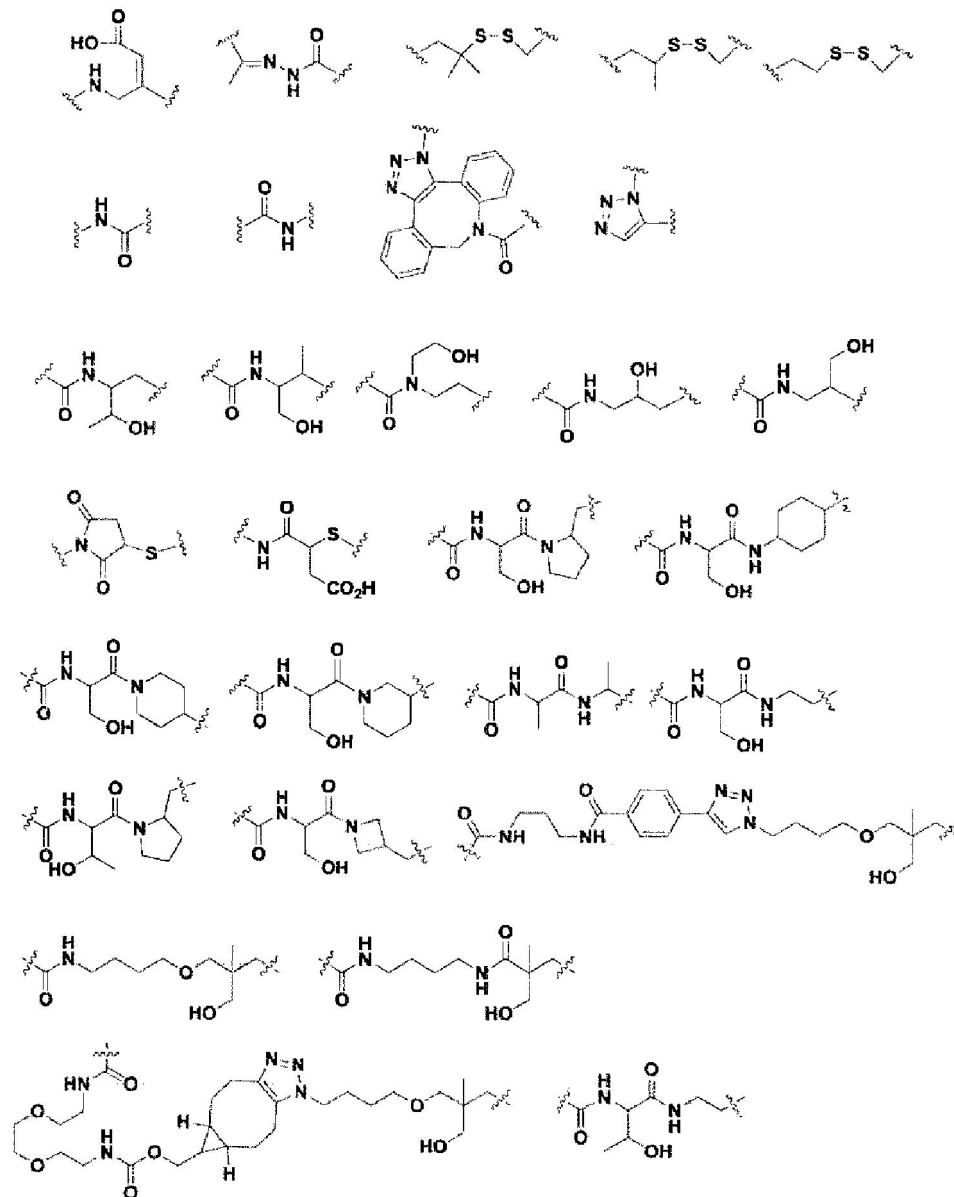
R9 es un átomo de hidrógeno, un grupo t-butoxicarbonilo, un grupo benciloxicarbonilo, un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, -CO-R10, -CO-(CH₂CH₂O)_{n6}-CH₂CH₂-N₃ o -CO-Q13-B6-(Q14-P13)_{q11}-X2, en donde n6 es un número entero de 0 a 99,

P13 está ausente, o es -CO-, -NH-, -O-, -S-, -O-CO-, -S-CO-, -NH-CO-, -CO-O-, -CO-S- o -CO-NH-,

Q13 y Q14 están, cada uno independientemente, ausentes, o son alquileo con 1 a 12 átomos de carbono, sustituido o no sustituido, o - (CH₂CH₂O)_{n7}-CH₂CH₂-, en donde n7 es un número entero de 0 a 99,

B6 es cualquier estructura representada por la siguiente fórmula 10-1, en donde las líneas discontinuas significan respectivamente enlaces a Q13 y Q14:

Fórmula 10-1:



q11 es un número entero de 0 a 10,

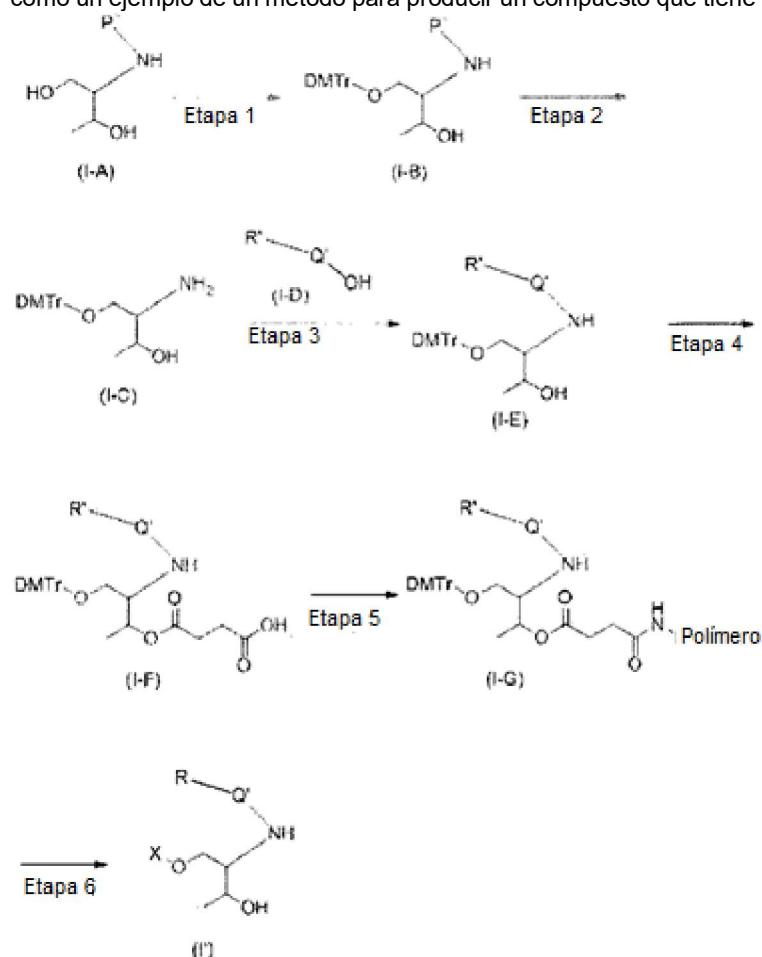
X2 es un átomo de hidrógeno o un soporte en fase sólida, y

R10 es un grupo alquilo que tiene de 2 a 10 átomos de carbono sustituidos con 1 o 2 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un grupo amino no sustituido o sustituido con un grupo t-butoxicarbonilo, un grupo benciloxicarbonilo o un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, un grupo carboxi, un grupo maleimida y un grupo aralquiloxicarbonilo.

En lo que sigue se darán ejemplos de métodos de producción en relación con la presente divulgación. En la descripción sobre los métodos de producción 1 a 17 dada más adelante se pueden utilizar los mismos símbolos que los que representan grupos en los compuestos representados por las fórmulas 1 a 12 en el derivado de ácido nucleico, etc. de la presente divulgación. Estos símbolos en los métodos de producción 1 a 17 deben entenderse por separado de los en los compuestos representados por las fórmulas 1 a 12. La presente divulgación no debe interpretarse de manera restrictiva por la descripción de los grupos sobre los métodos de producción 1 a 12. Para el derivado de ácido nucleico de acuerdo con la presente divulgación, X que representa el oligonucleótido se describe como -O-X en los métodos de producción 1 a 17.

Método de producción 1

Para el derivado de ácido nucleico de acuerdo con la presente divulgación, el método de producción se puede tomar como un ejemplo de un método para producir un compuesto que tiene una subestructura representada por la fórmula (I'):



en donde P1 es un grupo protector desprotegable de bases tal como Fmoc, DMTr representa un grupo p,p'-dimetoxitritilo, R representa una unidad ligando-unidad de enlace, R' representa un grupo, en el que cada uno de los grupos hidroxilo del ligando de azúcar en R está protegido con un grupo protector desprotegable de bases tal como un grupo acetilo, Polímero representa un soporte en fase sólida y Q' es -CO-.

Etapa 1

El compuesto (I-B) se puede producir haciendo reaccionar el compuesto (I-A) con cloruro de p,p'-dimetoxitritilo a una temperatura entre 0°C y 100°C durante 5 minutos a 100 horas en un disolvente tal como piridina, si es necesario, en presencia de un co-disolvente.

Ejemplos del co-disolvente incluyen metanol, etanol, diclorometano, cloroformo, 1,2-dicloroetano, tolueno, acetato de etilo, acetonitrilo, dietil éter, tetrahidrofurano, 1,2-dimetoxietano, dioxano, N,N-dimetilformamida (DMF), N,N-dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, piridina y agua. Estos co-disolventes se pueden utilizar solos o en mezcla.

5 Etapa 2

El compuesto (I-C) se puede producir haciendo reaccionar el compuesto (I-B) a una temperatura entre la temperatura ambiente y 200°C durante 5 minutos a 100 horas en presencia de 1 a 1000 equivalentes de una amina secundaria sin un disolvente o en un disolvente.

10

Ejemplos del disolvente incluyen metanol, etanol, diclorometano, cloroformo, 1,2-dicloroetano, tolueno, acetato de etilo, acetonitrilo, dietil éter, tetrahidrofurano, 1,2-dimetoxietano, dioxano, N,N-dimetilformamida (DMF), N,N-dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, piridina y agua. Estos disolventes se pueden utilizar solos o en mezcla.

15 Ejemplos de amina secundaria incluyen dietilamina y piperidina.

Etapa 3

20 El compuesto (I-E) se puede producir haciendo reaccionar el compuesto (I-C) con el compuesto (I-D) a una temperatura entre la temperatura ambiente y 200°C durante 5 minutos a 100 horas en presencia de 1 a 30 equivalentes de una base, un agente de condensación y, si es necesario, de 0,01 a 30 equivalentes de un aditivo sin un disolvente o en un disolvente.

Ejemplos del disolvente incluyen los enumerados en la etapa 2.

25 Ejemplos de la base incluyen carbonato de cesio, carbonato de potasio, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, metóxido de sodio, terc-butoxido de potasio, trietilamina, diisopropiletilamina, N-metilmorfolina, piridina, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno (DBU) y N,N-dimetil-4-aminopiridina (DMAP).

30 Ejemplos del agente de condensación incluyen 1,3-diciclohexanocarbodiimida (DCC), hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), carbonildiimidazol, hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio, hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio, hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N',N'-tetrametiluronio(HATU), hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU) y yoduro de 2-cloro-1-metilpiridinio.

35 Ejemplos del aditivo incluyen 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP)

El compuesto (I-D) puede obtenerse mediante un método conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Journal of American Chemical Society, 136, 16958, (2014) o un método equivalente al mismo.

40 Etapa 4

El compuesto (I-F) se puede producir haciendo reaccionar el compuesto (I-E) con anhídrido succínico a una temperatura entre la temperatura ambiente y 200°C durante 5 minutos a 100 horas en presencia de 1 a 30 equivalentes de una base en un disolvente.

45

Ejemplos del disolvente incluyen los enumerados en la etapa 2.

Ejemplos de la base incluyen los enumerados en la etapa 3.

50 Etapa 5

El compuesto (I-G) se puede producir haciendo reaccionar el compuesto (I-F) con un soporte en fase sólida aminado en el extremo a una temperatura entre la temperatura ambiente y 200°C durante 5 minutos a 100 horas en presencia de 1 a 30 equivalentes de una base, un agente de condensación y, si es necesario, de 0,01 a 30 equivalentes de un aditivo sin un disolvente o en un disolvente, y luego haciendo reaccionar lo resultante con una solución de anhídrido acético en piridina a una temperatura entre la temperatura ambiente y 200°C durante 5 minutos a 100 horas.

55

Ejemplos del disolvente incluyen los enumerados en la etapa 2.

60 Ejemplos de la base, del agente de condensación y del aditivo incluyen los enumerados respectivamente en la etapa 3.

Ejemplos del soporte en fase sólida aminado incluyen vidrio de poro controlado con alquilamina de cadena larga (LCAA-CPG). Un soporte en fase sólida aminado de este tipo se puede obtener como un producto disponible comercialmente.

65 Etapa 6

El conjugado de ácidos nucleicos que tiene la unidad ligando de azúcar-enlace-ramificador representado por la fórmula (I') se puede producir alargando una cadena de nucleótidos correspondiente mediante un método de síntesis química de oligonucleótidos conocido en la técnica utilizando el compuesto (I-G), seguido de la disociación de la fase sólida, desprotección del grupo protector y purificación.

5

Ejemplos del método de síntesis química de oligonucleótidos conocido en la técnica pueden incluir un método de fosforamidita, un método de fosforotioato, un método de fosfotriéster y un método CEM [véase, Nucleic Acid Research, 35, 3287 (2007)]. La cadena de oligonucleótido se puede sintetizar utilizando, por ejemplo, un sintetizador de ácidos nucleicos de alto rendimiento ABI3900 (fabricado por Applied Biosystems, Inc.).

10

La disociación de la fase sólida y la desprotección se pueden realizar mediante tratamiento con una base a una temperatura entre -80°C y 200°C durante 10 segundos a 72 horas en un disolvente o sin disolvente después de la síntesis química de oligonucleótidos.

15

Ejemplos de la base incluyen amoníaco, metilamina, dimetilamina, etilamina, dietilamina, isopropilamina, diisopropilamina, piperidina, trietilamina, etilendiamina, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno (DBU) y carbonato de potasio.

Ejemplos del disolvente incluyen agua, metanol, etanol y THF.

20

El oligonucleótido se puede purificar utilizando una columna de fase inversa C18 o una columna de intercambio aniónico, preferiblemente estos dos enfoques en combinación. La pureza del conjugado de ácidos nucleicos así purificado es deseablemente del 90% o mayor, preferiblemente del 95% o mayor.

25

En la etapa 3 arriba descrita, si es necesario, el compuesto (I-D) se puede dividir en dos unidades y condensar con el compuesto (I-C) en dos etapas separadas. Específicamente, cuando R-Q' es, por ejemplo, R-NH-CO-Q4'-CO- (Q4' es alquileo sustituido o no sustituido que tiene 1 a 12 átomos de carbono), en la etapa 3, el compuesto (I-C) y CH₃CH₂-O-CO-Q4'-CO-OH (Q4' es como se definió arriba) se condensan de la misma manera que en la etapa 3, y el éster etílico del compuesto obtenido se puede hidrolizar con una base tal como hidróxido de litio en un disolvente tal como etanol o agua, seguido de una condensación adicional con R'-NH₂ (R' es como se definió arriba) para obtener el compuesto de interés.

30

CH₃CH₂-O-CO-Q4'-CO-OH (Q4' es como se definió arriba) y R'-NH₂ (R' es como se definió arriba) se pueden obtener por un método conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Journal of American Chemical Society, 136, 16958 (2014)) o un método equivalente al mismo. En este contexto, el sustituyente y el resto alquileo en el alquileo sustituido o no sustituido que tiene 1 a 12 átomos de carbono, representados por Q4' son como se definieron arriba.

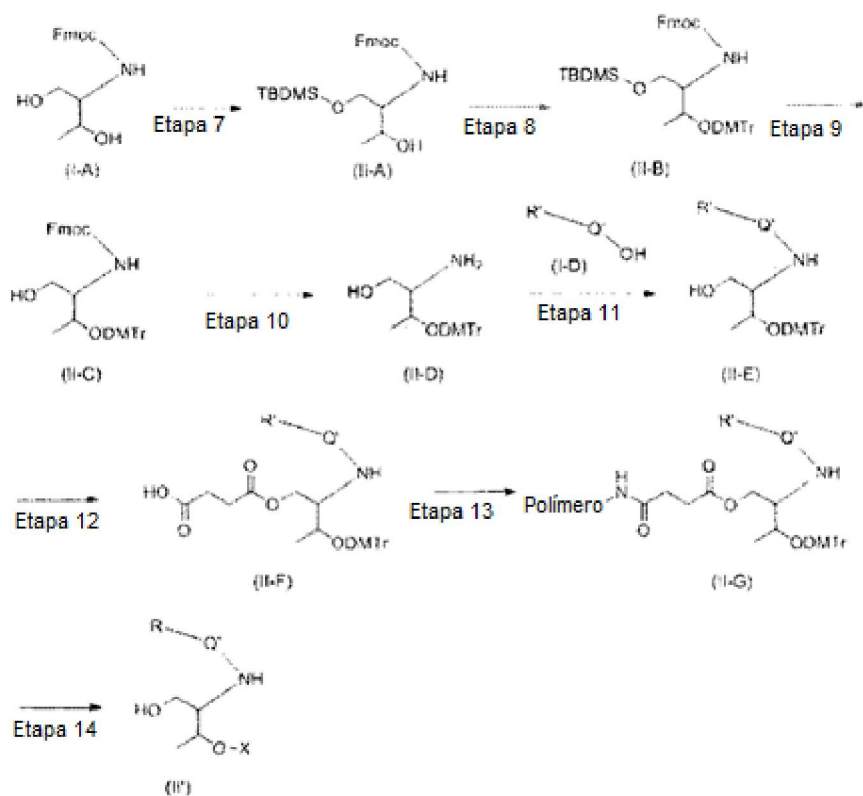
35

Aunque el caso en el que Q es -CO- se toma arriba como ejemplo, un compuesto en el que Q no es -CO- también se puede preparar de acuerdo con el mismo método que arriba o un método conocido en la técnica, o una combinación de los mismos, cambiando apropiadamente la estructura de Q y cambiando apropiadamente las condiciones de reacción.

Método de producción 2

40

Para el derivado de ácido nucleico de acuerdo con la presente divulgación, el método de producción se puede tomar como un ejemplo de un método para producir un compuesto que tiene una subestructura representada por la fórmula (II'):



en donde DMTr, R, R', X, Q' y Polímero son como se definieron arriba, TBDMS representa un grupo t-butildimetilsililo y Fmoc representa un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo.

Etapa 7

El compuesto (II-A) se puede producir haciendo reaccionar el compuesto (I-A) con cloruro de t-butildimetilsililo y dimetilaminopiridina a una temperatura entre 0°C y 100°C durante 5 minutos a 100 horas en un disolvente tal como N,N-dimetilformamida (DMF), preferiblemente en presencia de 2 equivalentes de una base.

Ejemplos de la base incluyen los enumerados en la etapa 3 del método de producción 1.

Etapa 8

El compuesto (II-B) se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 1 del método de producción 1 utilizando el compuesto (II-A).

Etapa 9

El compuesto (II-C) se puede producir haciendo reaccionar el compuesto (II-B) con fluoruro de n-tetrabutilamonio (TBAF) a una temperatura entre la temperatura ambiente y 200°C durante 5 minutos a 100 horas en un disolvente.

Ejemplos del disolvente incluyen los enumerados en la etapa 2.

Etapa 10

El compuesto (II-D) se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 2 del método de producción 1 utilizando el compuesto (II-C).

Etapa 11

El compuesto (II-E) se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 3 del método de producción 1 utilizando el compuesto (II-D) y el compuesto (I-D).

Etapas 12 a 14

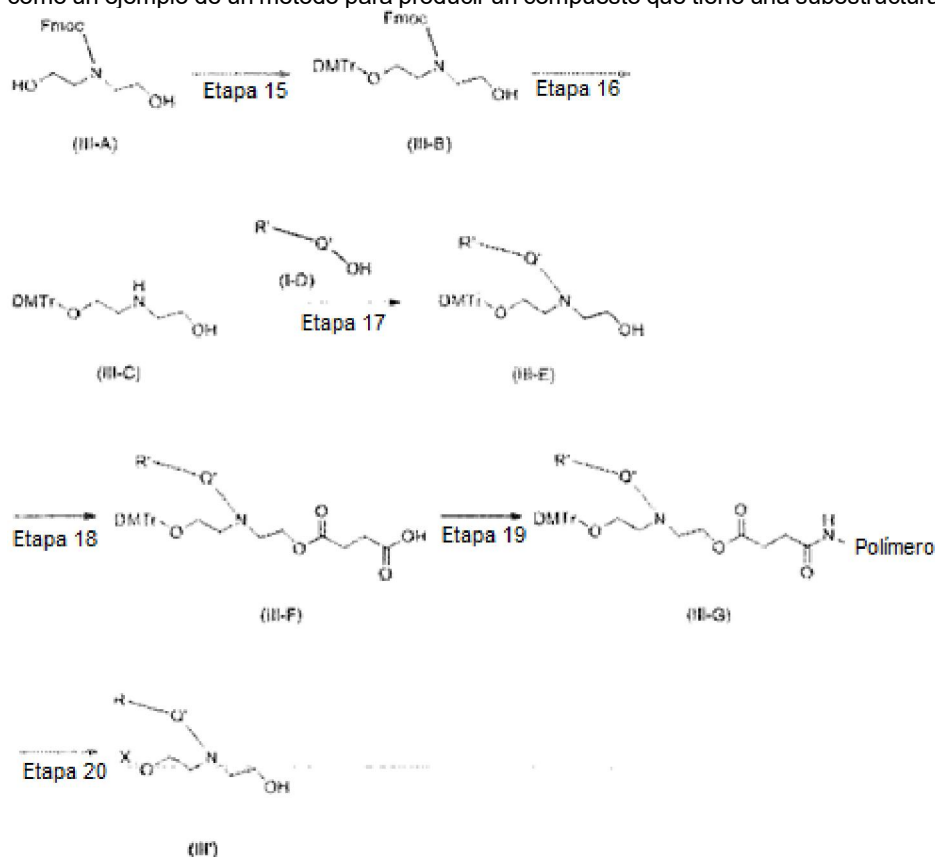
El compuesto (II') se puede producir bajo las mismas condiciones que en las etapas 4 a 6 del método de producción 1 utilizando el compuesto (II-E).

En la etapa 11 arriba descrita, si es necesario, el compuesto (I-D) se puede dividir en dos unidades y condensar con el compuesto (II-C) en dos etapas separadas. Específicamente, cuando R-Q' es, por ejemplo, R-NH-CO-Q4'-CO- (Q4' es alquileo sustituido o no sustituido que tiene 1 a 12 átomos de carbono), en la etapa 11 el compuesto (II-C) y CH₃CH₂-O-CO-Q4'-CO-OH (Q4' es como se definió arriba) se condensan de la misma manera que en la etapa 11, y el éster etílico del compuesto obtenido se puede hidrolizar con una base tal como hidróxido de litio en un disolvente tal como etanol o agua, seguido de una condensación adicional con R'-NH₂ (R' es como se definió arriba) para obtener el compuesto de interés. CH₃CH₂-O-CO-Q4'-CO-OH (Q4' es como se definió arriba) y R'-NH₂ (R' es como se definió arriba) se pueden obtener por un método conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Journal of American Chemical Society, 136, 16958 (2014)) o un método equivalente al mismo.

Aunque el caso en el que Q es -CO- se toma arriba como ejemplo, un compuesto en el que Q no es -CO- también se puede preparar de acuerdo con el mismo método que arriba o un método conocido en la técnica, o una combinación de los mismos, cambiando apropiadamente la estructura de Q y cambiando apropiadamente las condiciones de reacción.

Método de producción 3

Para el derivado de ácido nucleico de acuerdo con la presente divulgación, el método de producción se puede tomar como un ejemplo de un método para producir un compuesto que tiene una subestructura representada por la fórmula (III'):



en donde DMTr, Fmoc, R, R', Q', X y Polímero son como se definieron arriba.

El compuesto (III') se puede producir bajo las mismas condiciones que en las etapas 1 a 6 del método de producción 1 utilizando el compuesto (III-A). El compuesto (III-A) se puede obtener como un producto disponible comercialmente.

Etapa 15

El compuesto (III-B) se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 1 del método de producción 1 utilizando el compuesto (III-A).

El compuesto (III-A) se puede adquirir como un producto disponible comercialmente.

Etapa 16

El compuesto (III-C) se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 2 del método de producción 1 utilizando el compuesto (III-B).

Etapa 17

El compuesto (III-E) se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 3 del método de producción 1 utilizando el compuesto (III-C).

Etapas 18 a 20

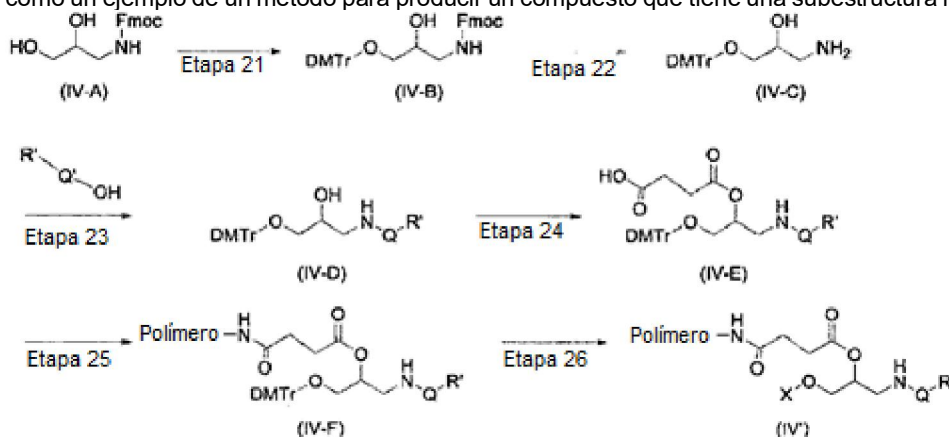
El compuesto (III') se puede producir bajo las mismas condiciones que en las etapas 4 a 6 del método de producción 1 utilizando el compuesto (III-E).

En la etapa 17 arriba descrita, si es necesario, el compuesto (I-D) se puede dividir en dos unidades y condensar con el compuesto (III-C) en dos etapas separadas. Específicamente, cuando R-Q' es, por ejemplo, -NH-CO-Q4'-CO- (Q4' es alquileo sustituido o no sustituido que tiene 1 a 12 átomos de carbono), en la etapa 17 el compuesto (III-C) y CH₃CH₂-O-CO-Q4'-CO-OH (Q4' es como se definió arriba) se condensan de la misma manera que en la etapa 17, y el éster etílico del compuesto obtenido se puede hidrolizar con una base tal como hidróxido de litio en un disolvente tal como etanol o agua, seguido de una condensación adicional con R'-NH₂ (R' es como se definió arriba) para obtener el compuesto de interés. CH₃CH₂-O-CO-Q4'-CO-OH (Q4' es como se definió arriba) y R'-NH₂ (R' es como se definió arriba) se pueden obtener por un método conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Journal of American Chemical Society, 136, 16958 (2014)) o un método equivalente al mismo.

Aunque el caso en el que Q es -CO- se toma arriba como ejemplo, un compuesto en el que Q no es -CO- también se puede preparar de acuerdo con el mismo método que arriba o un método conocido en la técnica, o una combinación de los mismos, cambiando apropiadamente la estructura de Q y cambiando apropiadamente las condiciones de reacción.

Método de producción 4

Para el derivado de ácido nucleico de acuerdo con la presente divulgación, el método de producción se puede tomar como un ejemplo de un método para producir un compuesto que tiene una subestructura representada por la fórmula (IV'):



en donde DMTr, Fmoc, R, R', Q', X y Polímero son como se definieron arriba.

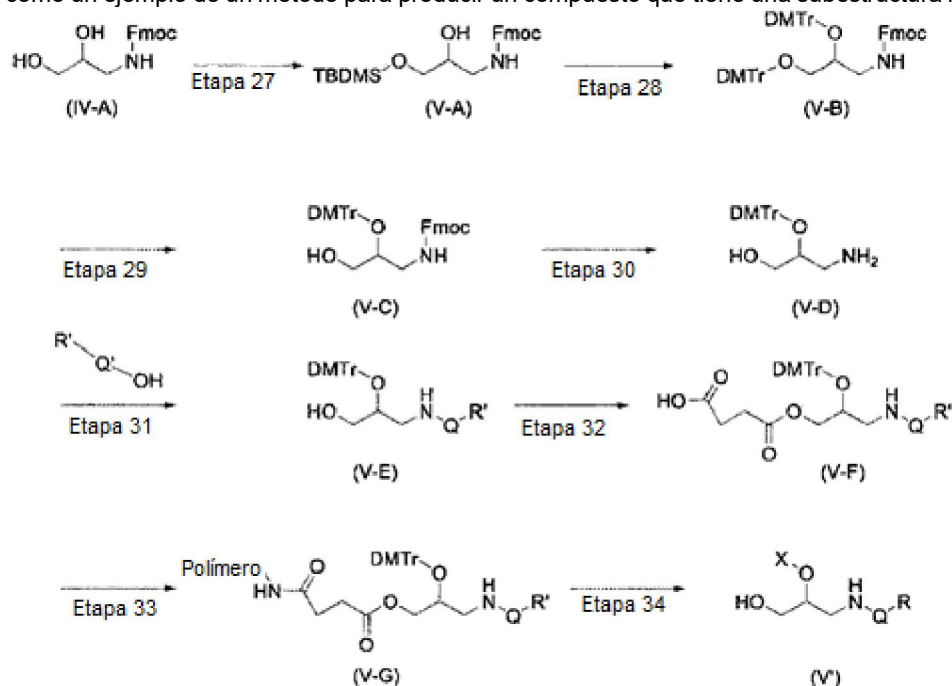
El compuesto (IV') se puede producir bajo las mismas condiciones que en las etapas 1 a 6 del método de producción 1 utilizando el compuesto (IV-A). El compuesto (IV-A) se puede obtener como un producto disponible comercialmente.

En la etapa 23 arriba descrita, si es necesario, el compuesto (I-D) se puede dividir en dos unidades y condensar con el compuesto (IV-C) en dos etapas separadas. Específicamente, cuando R-Q' es, por ejemplo, -NH-CO-Q4'-CO- (Q4' es alquileo sustituido o no sustituido que tiene 1 a 12 átomos de carbono), en la etapa 23 el compuesto (IV-C) y CH₃CH₂-O-CO-Q4'-CO-OH (Q4' es como se definió arriba) se condensan de la misma manera que en la etapa 23, y el éster etílico del compuesto obtenido se puede hidrolizar con una base tal como hidróxido de litio en un disolvente tal como etanol o agua, seguido de una condensación adicional con R'-NH₂ (R' es como se definió arriba) para obtener el compuesto de interés. CH₃CH₂-O-CO-Q4'-CO-OH (Q4' es como se definió arriba) y R'-NH₂ (R' es como se definió arriba) se pueden obtener por un método conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Journal of American Chemical Society, 136, 16958 (2014)) o un método equivalente al mismo.

Aunque el caso en el que Q es -CO- se toma arriba como ejemplo, un compuesto en el que Q no es -CO- también se puede preparar de acuerdo con el mismo método que arriba o un método conocido en la técnica, o una combinación de los mismos, cambiando apropiadamente la estructura de Q y cambiando apropiadamente las condiciones de reacción.

Método de producción 5

Para el derivado de ácido nucleico de acuerdo con la presente divulgación, el método de producción se puede tomar como un ejemplo de un método para producir un compuesto que tiene una subestructura representada por la fórmula (V'):



en donde DMTr, R, R', X, Q', TBDMS, Fmoc y Polímero son como se definieron arriba.

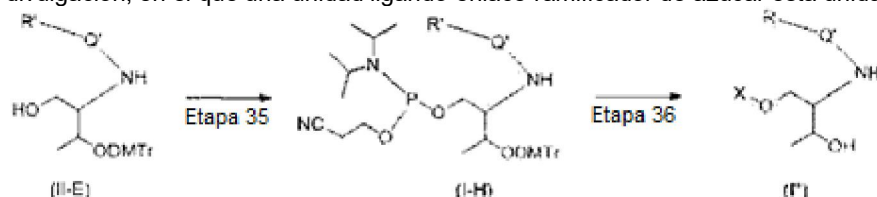
El compuesto (V') se puede producir bajo las mismas condiciones que en las etapas 1 a 7 del método de producción 2 utilizando el compuesto (IV-A). El compuesto (IV-A) se puede obtener como un producto disponible comercialmente.

En la etapa 31 arriba descrita, si es necesario, el compuesto (I-D) se puede dividir en dos unidades y condensar con el compuesto (V-D) en dos etapas separadas. Específicamente, cuando $R'-Q'$ es, por ejemplo, $-NH-CO-Q4'-CO-$ ($Q4'$ es alquileo sustituido o no sustituido que tiene 1 a 12 átomos de carbono), en la etapa 31 el compuesto (V-D) y $CH_3CH_2-O-CO-Q4'-CO-OH$ ($Q4'$ es como se definió arriba) se condensan de la misma manera que en la etapa 31, y el éster etílico del compuesto obtenido se puede hidrolizar con una base tal como hidróxido de litio en un disolvente tal como etanol o agua, seguido de una condensación adicional con $R'-NH_2$ (R' es como se definió arriba) para obtener el compuesto de interés. $CH_3CH_2-O-CO-Q4'-CO-OH$ ($Q4'$ es como se definió arriba) y $R'-NH_2$ (R' es como se definió arriba) se pueden obtener por un método conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Journal of American Chemical Society, 136, 16958 (2014)) o un método equivalente al mismo.

Aunque el caso en el que Q es $-CO-$ se toma arriba como ejemplo, un compuesto en el que Q no es $-CO-$ también se puede preparar de acuerdo con el mismo método que arriba o un método conocido en la técnica, o una combinación de los mismos, cambiando apropiadamente la estructura de $Q-OH$ y cambiando apropiadamente las condiciones de reacción.

Método de producción 6

A continuación se proporcionará un método ilustrativo para producir el conjugado de ácidos nucleicos de la presente divulgación, en el que una unidad ligando-enlace-ramificador de azúcar está unida al extremo 5' del oligonucleótido.



en donde R, R', Q', DMTr y X son como se definieron arriba.

Etapa 35

El compuesto (I-H) se puede producir haciendo reaccionar el compuesto (II-E) con 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosfodiámidita a una temperatura entre la temperatura ambiente y 200°C durante 5 minutos a 100 horas en presencia de una base y un acelerador de la reacción sin un disolvente o en un disolvente.

Ejemplos del disolvente incluyen los enumerados en la etapa 2 del método de producción 1.

Ejemplos de la base incluyen los enumerados en la etapa 3 del método de producción 1.

Ejemplos del acelerador de la reacción incluyen 1H-tetrazol, 4,5-dicianimidazol, 5-etiltiotetrazol y 5-benciltiotetrazol. Estos aceleradores de la reacción pueden adquirirse como productos disponibles comercialmente.

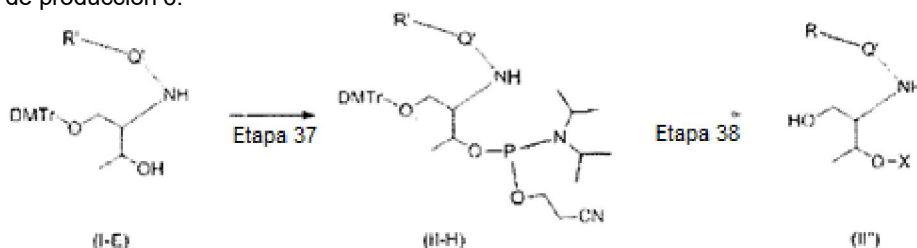
Etapa 36

El compuesto (I'') se puede producir alargando una cadena de oligonucleótidos y finalmente modificando el extremo 5' del oligonucleótido con una unidad ligando de azúcar-enlace-ramificador utilizando el compuesto (I-H), seguido de disociación de la fase sólida, desprotección del grupo protector y purificación. En este contexto, la disociación de la fase sólida, la desprotección del grupo protector y la purificación pueden realizarse cada una de la misma manera que en la etapa 7 del método de producción 1.

Método de producción 7

A continuación se proporcionará un método ilustrativo para producir el conjugado de ácidos nucleicos de la presente divulgación, en el que una unidad ligando-enlace-ramificador de azúcar está unida al extremo 5' del oligonucleótido.

El conjugado de ácidos nucleicos se puede producir bajo las mismas condiciones que en las etapas 35 y 36 del método de producción 6.

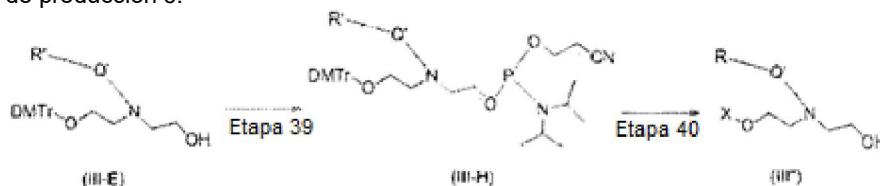


en donde R, R', Q', DMTr y X son como se definieron arriba.

Método de producción 8

A continuación se proporcionará un método ilustrativo para producir el conjugado de ácidos nucleicos de la presente divulgación, en el que una unidad ligando-enlace-ramificador de azúcar está unida al extremo 5' del oligonucleótido.

El conjugado de ácidos nucleicos se puede producir bajo las mismas condiciones que en las etapas 35 y 36 del método de producción 6.

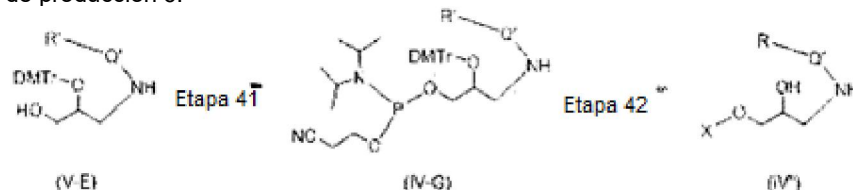


en donde R, R', Q', DMTr y X son como se definieron arriba.

Método de producción 9

A continuación se proporcionará un método ilustrativo para producir el conjugado de ácidos nucleicos de la presente divulgación, en el que una unidad ligando-enlace-ramificador de azúcar está unida al extremo 5' del oligonucleótido.

El conjugado de ácidos nucleicos se puede producir bajo las mismas condiciones que en las etapas 35 y 36 del método de producción 6.

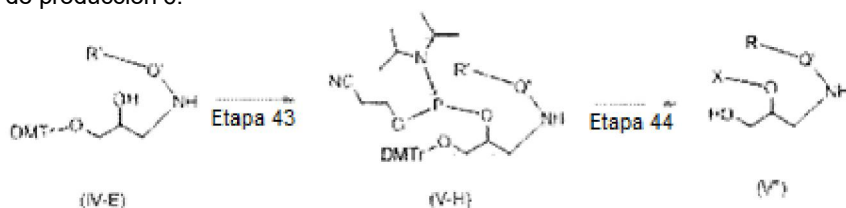


en donde R, R', Q', DMTr y X son como se definieron arriba.

Método de producción 10

A continuación se proporcionará un método ilustrativo para producir el conjugado de ácidos nucleicos de la presente divulgación, en el que una unidad ligando-enlace-ramificador de azúcar está unida al extremo 5' del oligonucleótido.

- 5 El conjugado de ácidos nucleicos se puede producir bajo las mismas condiciones que en las etapas 35 y 36 del método de producción 6.



en donde R, R', Q', DMTr y X son como se definieron arriba.

10 Método de producción 11

Puede obtenerse un conjugado de ácidos nucleicos que tiene un ácido nucleico de doble cadena disolviendo cada una de una cadena sentido que tiene una unidad ligando de azúcar-enlace-ramificador en el extremo 3' o 5' de una cadena sentido que constituye el ácido nucleico de doble cadena, y una cadena antisentido que constituye el ácido nucleico de doble cadena, en agua o una solución tampón apropiada, y mezclando las soluciones.

Ejemplos de la solución tampón incluyen soluciones tampón acetato, soluciones tampón Tris, soluciones tampón citrato, soluciones tampón fosfato y agua. Estos soluciones tampón se pueden utilizar solos o en mezcla.

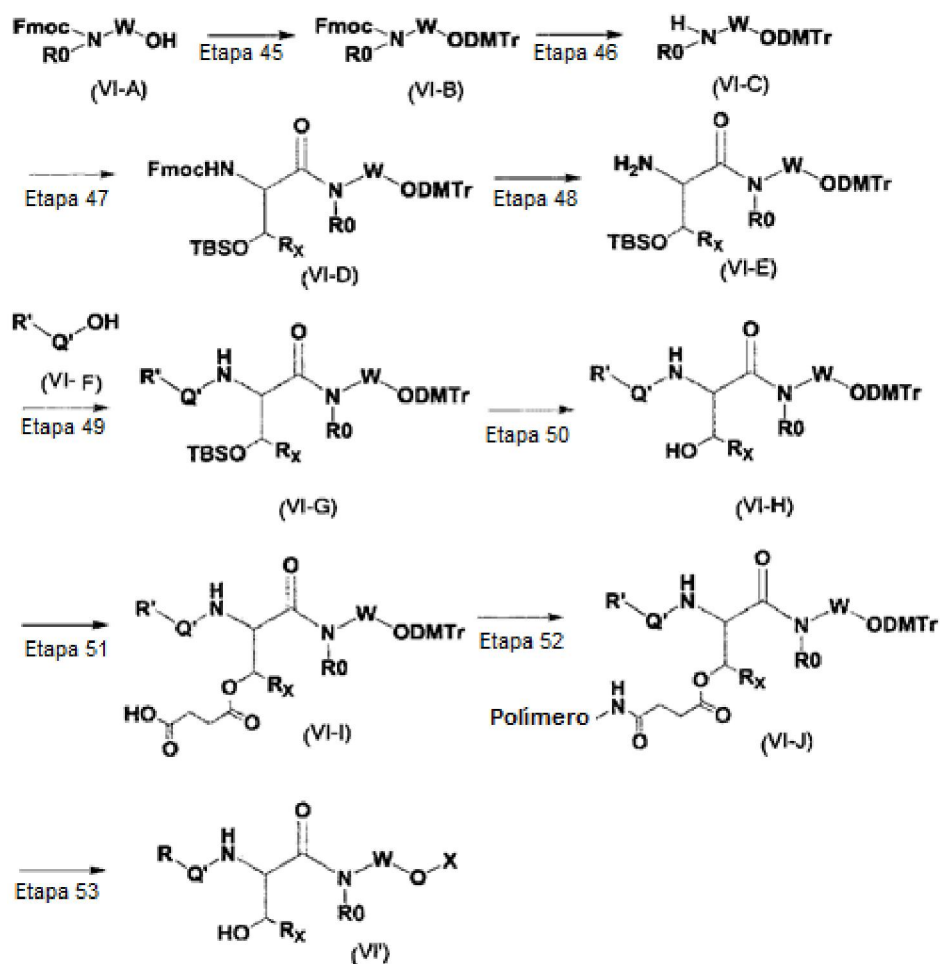
- 20 La relación de mezcla entre la cadena sentido y la cadena antisentido es preferiblemente de 0,5 a 2 equivalentes, más preferiblemente de 0,9 a 1,1 equivalentes, más preferiblemente de 0,95 equivalentes a 1,05 equivalentes, de la cadena antisentido con respecto a 1 equivalente de la cadena sentido.

- 25 La cadena sentido y la cadena antisentido así mezcladas pueden someterse de manera apropiada a un tratamiento de reasociación. El tratamiento de reasociación se puede realizar calentando la mezcla de la cadena sentido y la cadena antisentido a preferiblemente 50 a 100°C, más preferiblemente a 60 hasta 100°C, más preferiblemente a 80 hasta 100°C, seguido de enfriamiento lento a temperatura ambiente.

- 30 La cadena antisentido se puede obtener de conformidad con el método de síntesis de oligonucleótidos antes mencionado conocido en la técnica.

Método de producción 12

- 35 Para el derivado de ácido nucleico de acuerdo con la presente divulgación, el método de producción se puede tomar como un ejemplo de un método para producir un compuesto que tiene una subestructura representada por la fórmula (VI'):



en donde DMTr, R, R', X, Q', Polímero, TBS y Fmoc son como se definieron arriba, R0 y Rx son iguales o diferentes y cada uno representa un átomo de hidrógeno, alquileo C1-C10 o cicloalquileo C3-C8, y W es alquileo C1-C10 o cicloalquileo C3-C8 o puede formar un anillo heterocíclico que contiene nitrógeno C4-C8 junto con R0.

5

Etapa 45

El compuesto (VI-B) se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 1 del método de producción 1 utilizando el compuesto (VI-A).

10

El compuesto (VI-A) se puede obtener como un producto disponible comercialmente, o mediante un método conocido en la técnica (p. ej., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 11, págs. 383-386) o un método equivalente al mismo.

Etapa 46

15

El compuesto (VI-C) se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 2 del método de producción 1 utilizando el compuesto (VI-B).

Etapa 47

20

El compuesto (VI-D) se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 3 del método de producción 1 utilizando el compuesto (VI-C).

Etapa 48

25

El compuesto (VI-E) se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 2 del método de producción 1 utilizando el compuesto (VI-D).

Etapa 49

30

El compuesto (VI-G) se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 3 del método de producción 1 utilizando el compuesto (VI-E) y el compuesto (VI-F).

Etapa 50

El compuesto (VI-H) se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 9 del método de producción 2 utilizando el compuesto (VI-G).

Etapas 51 a 53

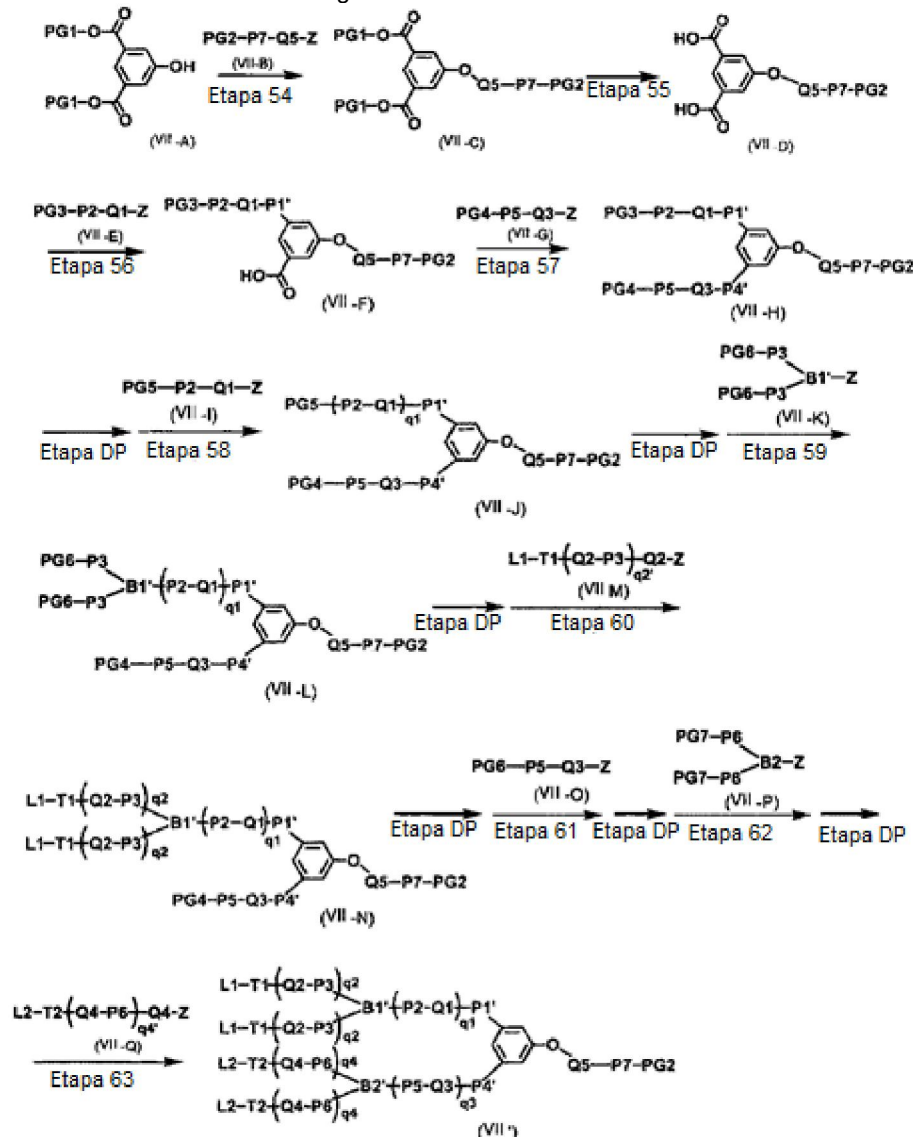
El compuesto (VI') se puede producir bajo las mismas condiciones que en las etapas 4 a 6 del método de producción 1 utilizando el compuesto (VI-H), el compuesto (VI-I) y el compuesto (I-J).

Las etapas 45 a 53 también se pueden llevar a cabo mediante un método conocido en la técnica (p. ej., un método descrito en la Publicación Internacional N° WO 2015/105083) o un método equivalente al mismo.

El compuesto (VI-F) puede obtenerse mediante un método conocido en la técnica (p. ej., Journal of American Chemical Society, 136, pág. 16958, (2014) o un método equivalente al mismo.

Método de producción 13

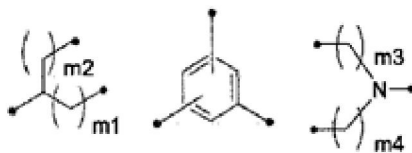
Se puede producir una unidad de ligando de azúcar-enlace en la que cada uno de P1 y P4 en la fórmula 2 es -NH-CO-, -O-CO- o -S-CO- mediante el siguiente método.



en donde Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, P2, P3, P5, P6, P7, T1, T2, L1, L2, q1, q2, q3 y q4 son cada uno como se definió arriba, q1' representa un número entero menor en 1 que q1, q2' representa un número entero menor en 1 que q2, P1' y P4' representan cada uno independientemente -CO-O-, -CO-NH- o -CO-S-, Z representa H, OH, NH₂, SH, un átomo de cloro,

un átomo de bromo, un átomo de yodo, metanosulfonilo, p-toluensulfonilo o ácido carboxílico, B1' y B2' representan cada uno una estructura cualquiera de las siguientes fórmulas, y PG1, PG2, PG3, PG4, PG5, PG6 y PG7 representa cada uno un grupo protector apropiado.

Fórmulas:



5 m1, m2, m3 y m4, cada uno independientemente, representan un número entero de 0 a 10,

Etapa 54

10 El compuesto (VII-C) se puede producir añadiendo trifenilfosfina soportada en polímero al compuesto (VII-A) con el compuesto (VII-B) en un disolvente tal como tetrahidrofurano y haciendo reaccionar la mezcla con una solución de azodicarboxilato de diisopropilo en tolueno bajo enfriamiento con hielo.

Ejemplos del disolvente incluyen los enumerados en la etapa 2 de la etapa de producción 1.

15 El compuesto (VII-A) se puede obtener como un producto disponible comercialmente.

Etapa 55

20 El compuesto (VII-D) se puede producir haciendo reaccionar el compuesto (VII-C) bajo enfriamiento con hielo en presencia de una base en un disolvente tal como metanol.

Ejemplos del disolvente incluyen los enumerados en la etapa 2 de la etapa de producción 1.

25 Ejemplos de la base incluyen los enumerados en la etapa 3 de la etapa de producción 1.

Etapa 56

30 El compuesto (VII-F) se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 3 de la etapa de producción 1 utilizando el compuesto (VII-D) y el compuesto (VII-E).

Etapa 57

35 El compuesto (VII-H) se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 3 de la etapa de producción 1 utilizando el compuesto (VII-F) y el compuesto (VII-G).

Etapa 58

40 El compuesto (VII-J) se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 3 de la etapa de producción 1 utilizando el compuesto (VII-H) y el compuesto (VII-I).

Etapa 59

45 El compuesto (VII-L) se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 3 de la etapa de producción 1 utilizando el compuesto (VII-J) y el compuesto (VII-K).

Etapa 60

50 El compuesto (VII-N) se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 3 de la etapa de producción 1 utilizando el compuesto (VII-L) y el compuesto (VII-M).

Etapas 61 a 63

55 El compuesto (VII') se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 3 de la etapa de producción 1 utilizando el compuesto (VII-O), el compuesto (VII-P) y el compuesto (VII-Q).

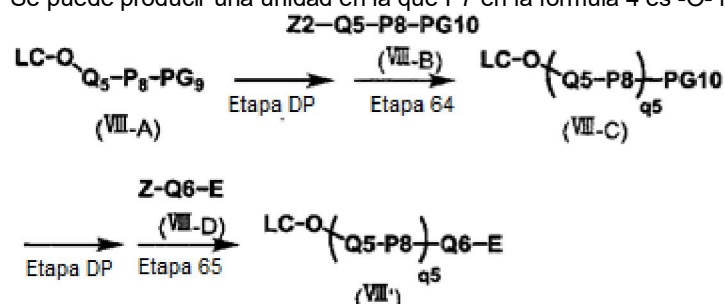
Etapa DP

Un método comúnmente utilizado en química orgánica sintética [p. ej., un método descrito en *Protective Groups in Organic Synthesis*, tercera edición, T.W. Greene, John Wiley & Sons Inc. (1999)] puede utilizarse apropiadamente en la producción.

El compuesto (VII-B), el compuesto (VII-E), el compuesto (VII-G), el compuesto (VII-I), el compuesto (VII-K), el compuesto (VII-M), el compuesto (VII-O), el compuesto (VII-P) y el compuesto (VII-Q) se pueden obtener como productos comercialmente disponibles, o mediante métodos descritos en "The Fourth Series of Experimental Chemistry, Organic Synthesis, pág. 258, Maruzen Co., Ltd. (1992)" y "March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 7ª edición" en combinación o métodos equivalentes a los mismos.

Método de producción 14

Se puede producir una unidad en la que P7 en la fórmula 4 es -O- mediante el siguiente método.



en donde Q5, Q6, P8 y q5 son cada uno como se definió arriba, Z2 representa H, OH, NH₂ o SH, PG9 y PG10 representan cada uno un grupo protector apropiado, LC representa una unidad ligando de azúcar-enlace, y E representa ácido carboxílico o maleimida.

Etapa 64

El compuesto (VIII-C) se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 3 de la etapa de producción 1 utilizando el compuesto (VIII-A) y el compuesto (VIII-B).

El compuesto (VIII-B) se puede obtener como un producto disponible comercialmente, o mediante los métodos descritos en "The Fourth Series of Experimental Chemistry, Organic Synthesis, pág. 258, Maruzen Co., Ltd. (1992)" y "March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 7ª edición" en combinación o métodos equivalentes a los mismos.

Etapa 65

El compuesto (VIII') se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 3 de la etapa de producción 1 utilizando el compuesto (VIII-C) y el compuesto (VIII-D).

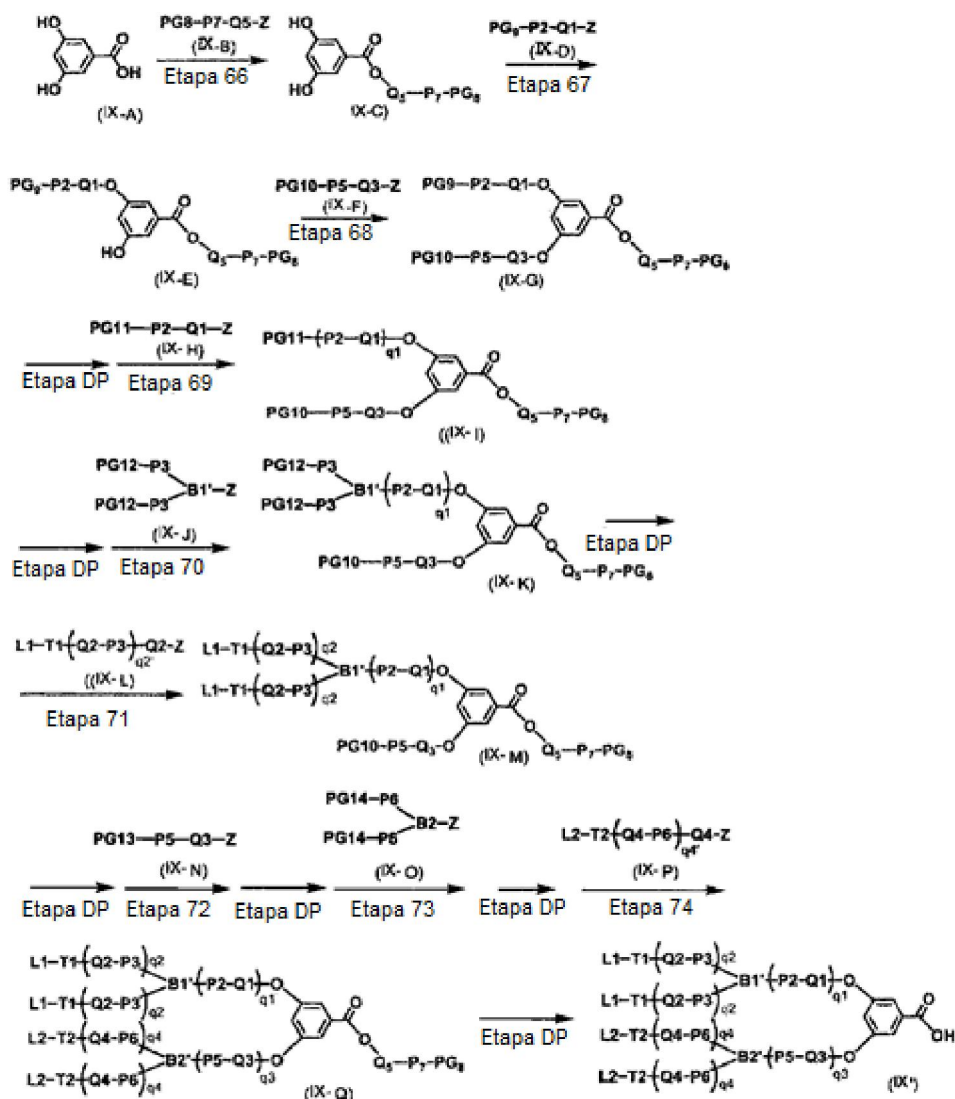
El compuesto (VIII-D) se puede obtener como un producto disponible comercialmente, o mediante los métodos descritos en "The Fourth Series of Experimental Chemistry, Organic Synthesis, pág. 258, Maruzen Co., Ltd. (1992)" y "March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 7ª edición" en combinación o métodos equivalentes a los mismos.

Etapa DP

Un método comúnmente utilizado en química orgánica sintética [p. ej., un método descrito en *Protective Groups in Organic Synthesis*, tercera edición, T.W. Greene, John Wiley & Sons Inc. (1999)] puede utilizarse apropiadamente en la producción.

Método de producción 15

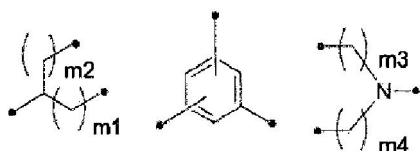
Se puede producir una unidad de ligando de azúcar-enlace en la que cada uno de P1 y P4 en la fórmula 2 es -O- mediante el siguiente método.



en donde Q1, Q2, Q3, Q4, P2, P3, P5, P6, T1, T2, L1, L2, q1, q2, q3, q4, Z, B1' y B2' son cada uno como se definió arriba, q1' representa un número entero menor en 1 que q1, q2' representa un número entero menor en 1 que q2, y PG8, PG9, PG10, PG11, PG12, PG13 y PG14 representan cada uno un grupo protector apropiado.

5

Fórmulas:



m1, m2, m3 y m4 son como se define arriba,

10

Etapa 66

El compuesto (IX-C) se puede producir disolviendo el compuesto (IX-A) y el compuesto (IX-B) en un disolvente tal como N,N'-dimetilformamida, añadiendo una base tal como bicarbonato de potasio a la solución y haciendo reaccionar la mezcla a temperatura ambiente hasta 200°C durante 5 minutos a 100 horas.

15

Ejemplos del disolvente incluyen los enumerados en la etapa 2 de la etapa de producción 1.

Ejemplos de la base incluyen los enumerados en la etapa 3 de la etapa de producción 1.

20

Etapa 67

El compuesto (IX-E) se puede producir disolviendo el compuesto (IX-C) y el compuesto (IX-D) en un disolvente tal como N,N'-dimetilformamida, añadiendo una base tal como bicarbonato de potasio a la solución y haciendo reaccionar la mezcla a temperatura ambiente hasta 200°C durante 5 minutos a 100 horas.

5 Ejemplos del disolvente incluyen los enumerados en la etapa 2 de la etapa de producción 1.

Ejemplos de la base incluyen los enumerados en la etapa 3 de la etapa de producción 1.

El compuesto (IX-A) se puede obtener como un producto disponible comercialmente.

10

Etapas 68

El compuesto (IX-G) se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 3 de la etapa de producción 1 utilizando el compuesto (IX-E) y el compuesto (IX-F).

15

Etapas 69

El compuesto (IX-I) se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 3 de la etapa de producción 1 utilizando el compuesto (IX-G) y el compuesto (IX-H).

20

Etapas 70

El compuesto (IX-K) se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 3 de la etapa de producción 1 utilizando el compuesto (IX-I) y el compuesto (IX-J).

25

Etapas 71

El compuesto (IX-M) se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 3 de la etapa de producción 1 utilizando el compuesto (IX-K) y el compuesto (IX-L).

30

Etapas 72 a 74

El compuesto (IX') se puede producir bajo las mismas condiciones que en la etapa 3 de la etapa de producción 1 utilizando el compuesto (IX-M), el compuesto (IX-N), el compuesto (IX-O) y el compuesto (IX-P).

35

Etapas DP

Un método comúnmente utilizado en química orgánica sintética [p. ej., un método descrito en Protective Groups in Organic Synthesis, tercera edición, T.W. Greene, John Wiley & Sons Inc. (1999)] puede utilizarse apropiadamente en la producción.

40

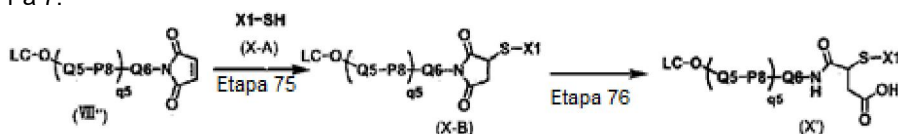
El compuesto (IX'-B), el compuesto (IX'-D), el compuesto (IX'-F), el compuesto (IX'-H), el compuesto (IX'-J), el compuesto (IX'-L), el compuesto (IX'-N), el compuesto (IX'-O) y el compuesto (IX'-P) se pueden obtener como productos comercialmente disponibles, o mediante métodos descritos en "The Fourth Series of Experimental Chemistry, Organic Synthesis, pág. 258, Maruzen Co., Ltd. (1992)" y "March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 7ª edición" en combinación o métodos equivalentes a los mismos.

45

Método de producción 16

El siguiente método también se puede utilizar como método para producir los conjugados de ácidos nucleicos de fórmulas 1 a 7.

50



en donde LC, Q5, P8 y Q6 son como se definieron arriba, y X1-SH representa un oligonucleótido que tiene una estructura terminal que contiene un grupo alquilo C1-C10 sustituido con SH.

55 Etapas 75

El compuesto (X-B) se puede producir haciendo reaccionar el compuesto (VIII'') con compuesto (X-A) a 0°C hasta 100°C durante 10 segundos a 100 horas en un disolvente.

60 Ejemplos del disolvente incluyen agua, soluciones tampón fosfato, soluciones tampón acetato de sodio y dimetilsulfóxido. Estos disolventes se pueden utilizar solos o en mezcla.

El compuesto (VIII') puede obtenerse utilizando el método de producción 14.

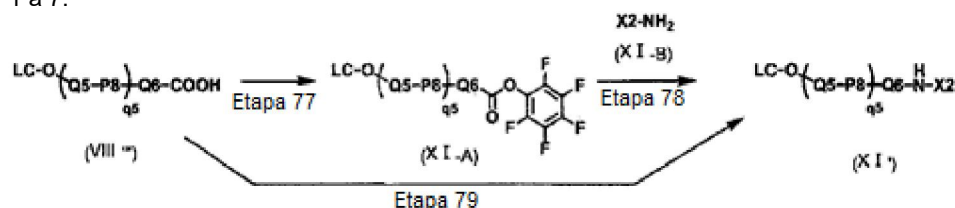
El compuesto (X-B) también se puede obtener mediante un método conocido en la técnica (p. ej., Bioconjugate Chemistry, Vol. 21, págs. 187-202, 2010; y Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, septiembre de 2010; CAPÍTULO: Unidad 4.41) o un método equivalente al mismo.

Etapa 76

El compuesto (X') se puede producir haciendo reaccionar el compuesto (X-B) a una temperatura entre la temperatura ambiente y 200°C durante 5 minutos a 100 horas bajo condiciones de pH 8 o superiores tal como en una solución acuosa de carbonato de sodio o agua amoniacal.

Método de producción 17

El siguiente método también se puede utilizar como método para producir los conjugados de ácidos nucleicos de fórmulas 1 a 7.



en donde LC, Q5, P8 y Q6 son como se definieron arriba, y X2-NH₂ representa un oligonucleótido que tiene una estructura terminal que contiene un grupo alquilo C1-C10 sustituido con NH₂.

Etapa 77

El compuesto (XI-A) puede obtenerse utilizando el compuesto (VIII') y un método conocido en la técnica (p. ej., un método descrito en Bioconjugate Chemistry, Vol. 26, pág. 1451-1455, 2015) o un método equivalente al mismo.

El compuesto (VIII') puede obtenerse mediante el uso del método de producción 14.

Etapa 78

El compuesto (XI') puede obtenerse utilizando el compuesto (XI-B) y un método conocido en la técnica (p. ej., un método descrito en Bioconjugate Chemistry, Vol. 26, pág. 1451-1455, 2015) o un método equivalente al mismo.

Etapa 79

En otro método, el compuesto (XI') se puede obtener directamente del compuesto (XI-A) mediante un método conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Bioconjugate Chemistry, Vol. 22, pág. 1723-1728, 2011) o un método equivalente al mismo.

El conjugado de ácidos nucleicos descrito en la presente memoria descriptiva puede obtenerse como una sal, por ejemplo, una sal por adición de ácidos, una sal metálica, una sal de amonio, una sal por adición de amina orgánica o una sal por adición de aminoácido.

Ejemplos de la sal por adición de ácidos incluyen: sales de ácidos inorgánicos, tales como hidrócloruro, sulfato y fosfato; y sales de ácidos orgánicos, tales como acetato, maleato, fumarato, citrato y metanosulfonato. Ejemplos de la sal metálica incluyen: sales de metales alcalinos, tales como sal de sodio y sal de potasio; sales de metales alcalinotérreos, tales como sal de magnesio y sal de calcio; y sal de aluminio y sal de zinc. Ejemplos de la sal de amonio incluyen sales de amonio, tetrametilamonio y similares. Ejemplos de sales por adición de amina orgánica incluyen sales por adición de morfolina, piperidina y similares. Ejemplos de las sales por adición de aminoácidos incluyen sales por adición de lisina, glicina, fenilalanina y similares.

En el caso de preparar la sal del conjugado de ácidos nucleicos descrita en la presente memoria descriptiva, el conjugado obtenido en forma de la sal deseada se puede purificar directamente, o el conjugado obtenido en forma libre se puede disolver o suspender en un disolvente apropiado, y se añade un ácido o base correspondiente a la solución o suspensión, seguido de aislamiento o purificación. Con el fin de convertir los contraiones que forman la sal del conjugado en diferentes contraiones, la sal del conjugado se puede disolver o suspender en un disolvente apropiado, y luego, varios equivalentes a un gran exceso de un ácido, una base y/o una sal (p. ej., una sal inorgánica, tal como cloruro de sodio o cloruro de amonio) se añaden a la solución o suspensión, seguido de aislamiento o purificación.

Algunos conjugados de ácidos nucleicos descritos en la presente memoria descriptiva pueden tener estereoisómeros, tales como isómeros geométricos e isómeros ópticos, tautómeros o similares. Todos los posibles isómeros y mezclas de los mismos también están incluidos en la presente divulgación.

- 5 El conjugado de ácidos nucleicos descrito en la presente memoria descriptiva puede estar presente en forma de un aducto con agua o diversos disolventes. Estos aductos también se incluyen en la presente divulgación.

10 El conjugado de ácidos nucleicos de la presente divulgación abarca, además, moléculas en las que una parte o la totalidad de los átomos está sustituida con un átomo que tiene un número de masa atómica diferente del mismo (isótopo) (p. ej., un átomo de deuterio).

15 La composición farmacéutica de la presente divulgación comprende el conjugado de ácidos nucleicos representado por la fórmula 1. El conjugado de ácidos nucleicos de la presente divulgación, debido a que tiene ligandos de azúcar L1 y L2, es reconocido por una célula diana y transferido a la célula.

El conjugado de ácidos nucleicos de la presente divulgación puede utilizarse en el tratamiento de enfermedades relacionadas con un gen diana inhibiendo (reduciendo o silenciando) la expresión del gen diana *in vivo* cuando se administra a un mamífero.

20 En el caso de utilizar el conjugado de ácidos nucleicos de la presente divulgación como un agente terapéutico o un agente profiláctico, la vía de administración no está particularmente limitada, y se utiliza deseablemente una vía de administración más eficaz para el tratamiento. Ejemplos de los mismos incluyen administración intravenosa, administración subcutánea y administración intramuscular. Se prefiere la administración intravenosa.

25 La dosis difiere dependiendo del estado patológico o de la edad del receptor, de la vía de administración, etc. La dosis puede ser, por ejemplo, una dosis diaria de 0,1 µg a 1000 mg, más preferiblemente de 1 a 100 mg, en términos de la cantidad del oligonucleótido de doble cadena.

30 Ejemplos de la preparación apropiada para la administración intravenosa o la administración intramuscular incluyen inyecciones. Una formulación líquida preparada puede utilizarse directamente en forma de, por ejemplo, una inyección. Alternativamente, la formulación líquida puede utilizarse después de la eliminación del solvente mediante, por ejemplo, filtración o centrifugación, o la formulación líquida puede utilizarse después de liofilizarse y/o puede utilizarse después de ser complementada con, por ejemplo, un excipiente, tal como manitol, lactosa, trehalosa, maltosa o glicina, y luego liofilizada.

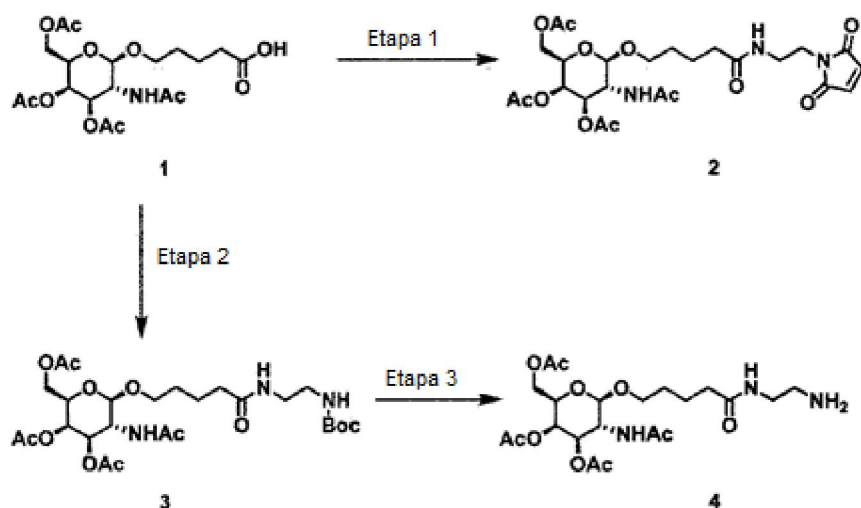
35 En el caso de una inyección, la formulación líquida o la composición libre de disolvente o liofilizada se mezcla preferiblemente con, por ejemplo, agua, un ácido, un álcali, diversas soluciones tampón, solución salina fisiológica o una transfusión de aminoácidos, para preparar la inyección. Alternativamente, la inyección puede prepararse mediante la adición de, por ejemplo, un antioxidante, tal como ácido cítrico, ácido ascórbico, cisteína o EDTA, o un agente de tonicidad, tal como glicerol, glucosa o cloruro de sodio. También, la inyección también se puede crioconservar mediante la adición de un agente crioconservador tal como glicerol.

Ejemplos

45 A continuación, la presente invención se describirá específicamente con referencia a Ejemplos de Referencia, Ejemplos y Ejemplos de Ensayo. Sin embargo, la presente invención no está limitada por estos Ejemplos y Ejemplos de Ensayo. Espectros de resonancia magnética nuclear de protón (¹H RMN) mostrados en los Ejemplos y Ejemplos de Referencia se midieron a 270 MHz, 300 MHz o 400 MHz, y ningún protón intercambiable se puede observar claramente en función de compuestos y condiciones de medición. La multiplicidad de señales se indica como se utiliza habitualmente, y br significa ancho y representa una señal aparentemente ancha.

50 El análisis de UPLC empleó las siguientes condiciones:
Fase móvil A: solución acuosa que contiene ácido fórmico al 0,1%, B: solución de acetonitrilo
Gradiente: gradiente lineal del 10% al 90% de la fase móvil B (3 min)
55 Columna: ACQUITY UPLC BEH C18 fabricada por Waters Corp. (1,7 µm, diámetro interior: 2,1 x 50 mm)
Caudal: 0,8 mL/min
Longitud de onda de detección de PDA: 254 nm (intervalo de detección: 190 a 800 nm)

Ejemplo de Referencia 1 Síntesis de unidad de ligando de azúcar



Síntesis de compuesto 2

Etapa 1

5

10

15

El compuesto 1 (0,8755 g, 1,9567 mmol), sintetizado mediante el método descrito en Journal of American Chemical Society, Vol. 136, págs. 16958-16961, 2014 se disolvió en tetrahidrofurano (10 mL). A la solución, se agitaron durante la noche 1,3-diciclohexanocarbodiimida (DCC, 0,4247 g, 2,0584 mmol) y N-hidroxisuccinimida (0,2412 g, 2,0958 mmol) a temperatura ambiente. Se eliminó un sólido precipitado de la mezcla de reacción y el disolvente se separó por destilación a presión reducida. La mezcla obtenida se disolvió en N,N'-dimetilformamida (DMF). A la solución se añadieron bromato de 2-aminoetil maleimida (0,6479 g, 2,5491 mmol) y diisopropiletilamina (1,7 mL, 9,7835 mmol) y luego la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente en la solución de reacción se separó por destilación a presión reducida, seguido de elución por cromatografía en columna de fase inversa (agua/metanol = 80/20) para obtener el compuesto 2 (0,8502 g, rendimiento: 76%).

20

Síntesis de compuesto 4

Etapa 2

25

30

El compuesto 1 (0,9602 g, 2,1460 mmol) descrito en la etapa 1 se disolvió en N,N'-dimetilformamida (10 mL). A la solución se añadieron N-Boc-etilendiamina (fabricada por Sigma-Aldrich Co. LLC, 0,6877 g, 4,292 mmol), diisopropiletilamina (1,90 mL, 10,87 mmol) y hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 1,6437 g, 4,3229 mmol) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se añadió agua a la solución de reacción, seguido de extracción con cloroformo dos veces. Luego, la capa orgánica se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener un producto bruto del compuesto 3.

ESI-MS m/z: 590 (M + H)⁺

Etapa 3

35

40

45

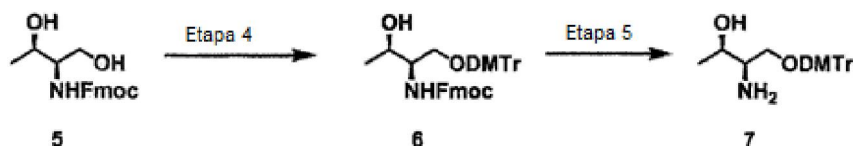
El compuesto 3 (1,2654 g, 2,1460 mmol) sintetizado en la etapa 2 se disolvió en diclorometano (15 mL). A la solución se añadió ácido trifluoroacético (4 mL) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se añadió agua a la solución de reacción, seguido de extracción con acetato de etilo. Luego, la capa orgánica se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida, seguido de elución por cromatografía en columna de fase inversa (agua/metanol = 80/20) para obtener el compuesto 4 (0,3879 g, rendimiento: 37%).

ESI-MS m/z: 490 (M + H)⁺;

¹H-RMN (DMSO-D₆) δ: 1,46-1,52 (4H, m), 1,78 (3H, s), 1,90 (3H, s), 2,00 (3H, s), 2,08 (2H, t, J = 7,4 Hz), 2,11 (3H, s), 2,85 (2H, t, J = 6,3 Hz), 3,27 (2H, dd, J = 12,3, 6,2 Hz), 3,67-3,69 (1H, m), 3,68-3,73 (1H, m), 3,86-3,90 (1H, m), 4,01-4,04 (3H, m), 4,49 (1H, d, J = 8,4 Hz), 4,97 (1H, dd, J = 11,3, 3,4 Hz), 5,22 (1H, d, J = 3,5 Hz), 7,86 (1H, d, J = 9,1 Hz), 7,95-8,02 (1H, m).

Ejemplo de Referencia 2 Síntesis de unidad de ramificador

Síntesis de compuesto 7



Etapa 4

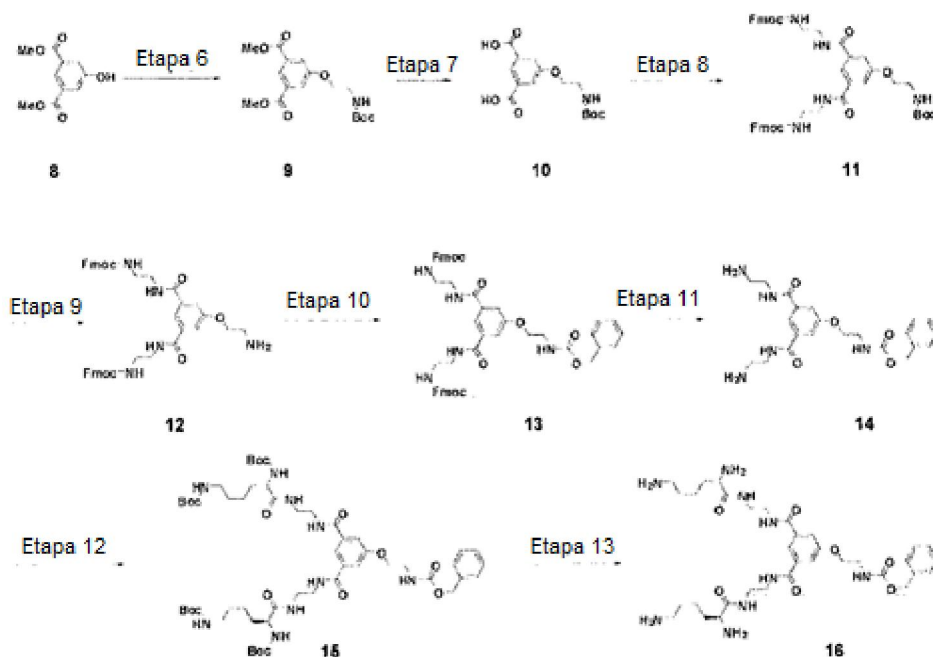
El compuesto 5 (1,50 g, 4,58 mmol) se disolvió en piridina (20 mL). A la solución se añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (fabricado por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 1,71 g, 5,04 mmol) bajo enfriamiento con hielo y luego, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de reacción se enfrió con hielo y se añadió una solución acuosa de ácido cítrico al 10%, seguido de extracción con acetato de etilo. Luego, la capa orgánica se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/acetato de etilo = 90/10) para obtener el compuesto 6 (1,07 g, rendimiento: 37%).
ESI-MS m/z : 630 ($M + H$)⁺

Etapa 5

El compuesto 6 (1,07 g, 1,699 mmol), sintetizado en la etapa 4, se disolvió en N,N'-dimetilformamida (10 mL). A la solución se añadió piperidina (0,336 mL, 3,40 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 3 horas. Se añadió agua a la solución de reacción, seguido de extracción con acetato de etilo. Luego, la capa orgánica se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo/metanol = 90/10) para obtener el compuesto 7 (0,59 g, rendimiento: 85%).
ESI-MS m/z : 408 ($M + H$)⁺

Ejemplo 1 Síntesis de unidad de enlace - 1

Síntesis de compuesto 16



Etapa 6

5-hidroxiisofalato de dimetilo (compuesto 8, fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 5,0443 g, 24 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 25 mL). A la solución se añadieron 2-(terc.-butoxicarbonilamino)-1-etanol (fabricado por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 4,0343 g, 25,03 mmol) y trifenilfosfina soportada en polímero (fabricada por Sigma-Aldrich Co. LLC, 6,61 g, 25,2 mmol), luego se añadió una solución al 40% de azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) en tolueno (fabricado por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 13,26 mL, 25,2 mmol) enfriando con hielo y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La solución de

reacción se filtró y el disolvente en el filtrado se separó por destilación a presión reducida. A continuación, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de aminosílice (hexano/acetato de etilo = 95/5 a 80/20) para obtener el compuesto 9 (5,3071 g, rendimiento: 63%).

ESI-MS m/z : 254 ($M + H$)⁺, detectado como una forma Boc-desprotegida

5

Etapas 7

El compuesto 9 (5,3071 g, 15,02 mmol) sintetizado en la etapa 6 se disolvió en metanol (25 mL). A la solución se añadió 2 mol/L de una solución acuosa de hidróxido de sodio (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 13 mL) bajo enfriamiento con hielo y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La solución de reacción se enfrió con hielo y se añadió una solución acuosa de ácido cítrico al 10%, seguido de extracción con acetato de etilo. Luego, la capa orgánica se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener cuantitativamente el compuesto 10.

10

ESI-MS m/z : 324 ($M - H$)⁻

15

Etapas 8

El compuesto 10 (1,9296 g, 5,93 mmol), sintetizado en la etapa 7, se disolvió en N,N'-dimetilformamida (70 mL). A la solución se añadieron hidrócloruro de N-1-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonil)-etilendiamina (3,3493 g, 11,86 mmol), diisopropiletilamina (5,18 mL, 29,7 mmol) y hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (4,5168 g, 11,88 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La solución de reacción se enfrió con hielo y se añadió una solución acuosa de ácido cítrico al 10%, seguido de extracción con cloroformo. Luego, la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y solución salina saturada y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo/metanol) para obtener el compuesto 11 (3,4407 g, rendimiento: 68%).

20

25

ESI-MS m/z : 898 ($M + HCOO$)⁻

Etapas 9

30

El compuesto 11 (1,6087 g, 1,884 mmol) sintetizado en la etapa 8 se disolvió en diclorometano (20 mL). A la solución se añadió ácido trifluoroacético (5 mL, 64,9 mmol) bajo enfriamiento con hielo y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. El disolvente en la solución de reacción se separó por destilación a presión reducida para obtener cuantitativamente el compuesto 12 (2,4079 g).

35

ESI-MS m/z : 798 ($M + HCOO$)⁻

Etapas 10

El compuesto 12 (386 mg, 0,512 mmol) sintetizado en la etapa 9 se disolvió en tetrahidrofurano (10 mL). A la solución se añadió cloruro de benzoilo (175 mg, 1,024 mmol) bajo enfriamiento con hielo y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente en la solución de reacción se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo/metanol) para obtener el compuesto 13 (373 mg, rendimiento: 82%).

40

ESI-MS m/z : 888 ($M + H$)⁺

45

Etapas 11

El compuesto 13 (108 mg, 0,122 mmol) sintetizado en la etapa 10 se disolvió en diclorometano (5 mL). A la solución se añadió dietilamina (0,5 mL, 4,8 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 1 hora. El disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener cuantitativamente el compuesto 14 (54,9 mg).

50

ESI-MS m/z : 444 ($M + H$)⁺

Etapas 12

Se añadieron compuesto 14 (180 mg, 0,406 mmol), sintetizado en la etapa 11, N α ,N ϵ -bis(terc.-butoxicarbonil)-L-lisina (fabricado por Novabiochem/Merck Millipore, 295 mg, 0,852 mmol), diisopropiletilamina (0,354 mL, 2,029 mmol) y hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (324 mg, 0,852 mmol) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La solución de reacción se enfrió con hielo y se añadió una solución acuosa de ácido cítrico al 10%, seguido de extracción con cloroformo. Luego, la capa orgánica se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo/metanol) para obtener cuantitativamente el compuesto 15 (450 mg).

55

60

ESI-MS m/z : 1101 ($M + H$)⁺

65

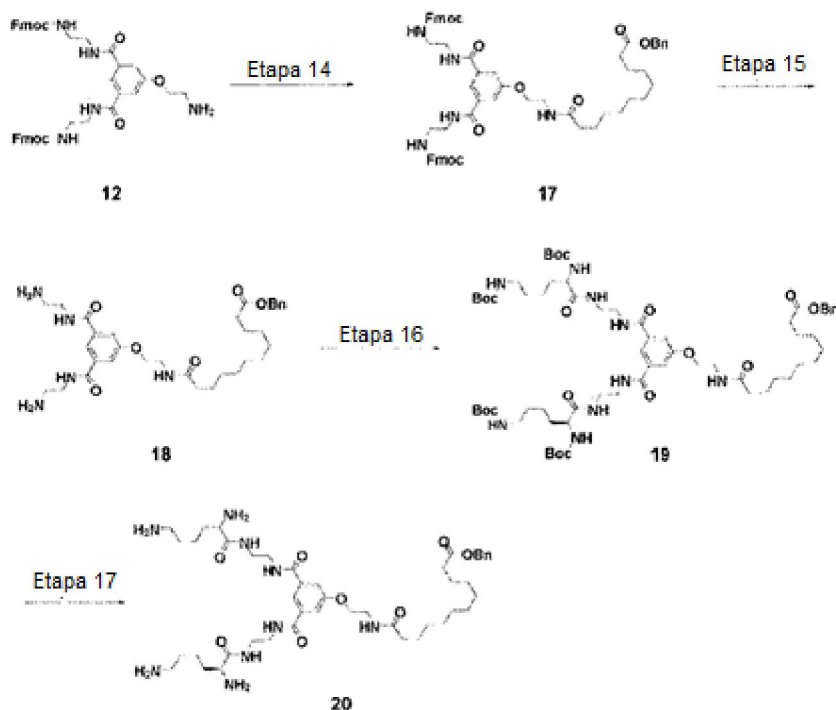
Etapas 13

El compuesto 15 (2,1558 g, 1,9593 mmol) sintetizado en la etapa 12 se disolvió en diclorometano (20 mL). A la solución se añadió ácido trifluoroacético (5 mL) bajo enfriamiento con hielo y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. El disolvente en la solución de reacción se separó por destilación a presión reducida para obtener cuantitativamente el compuesto 16.

ESI-MS m/z : 700 ($M + H$)⁺

Ejemplo 2 Síntesis de unidad de enlace - 2

Síntesis de compuesto 20



Etapa 14

Compuesto 12 (0,5716 g, 0,7582 mmol) sintetizado en la etapa 9, éster monobencílico del ácido dodecanoico (0,4859 mg, 1,5164 mmol) sintetizado mediante el método descrito en Bioconjugate Chemistry, vol. 22, pág. 690-699, 2011, diisopropiletilamina (0,662 mL, 3,79 mmol) y hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (0,5766 g, 1,516 mmol) se disolvieron en N,N-dimetilformamida (12 mL). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de reacción se enfrió con hielo y a ello se añadió una solución acuosa saturada de ácido cítrico, seguido de extracción con cloroformo. Luego, la capa orgánica se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo/metanol) para obtener el compuesto 17 (0,88 g, rendimiento: 84%).

ESI-MS m/z : 1057 ($M + H$)⁺

Etapa 15

El compuesto 17 (0,7545 g, 0,714 mmol), sintetizado en la etapa 14, se disolvió en diclorometano-tetrahidrofurano (20 mL). A la solución se añadió dietilamina (5 mL, 47,9 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante la noche. El disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener cuantitativamente el compuesto 18. ESI-MS m/z : 612 ($M + H$)⁺

Etapa 16

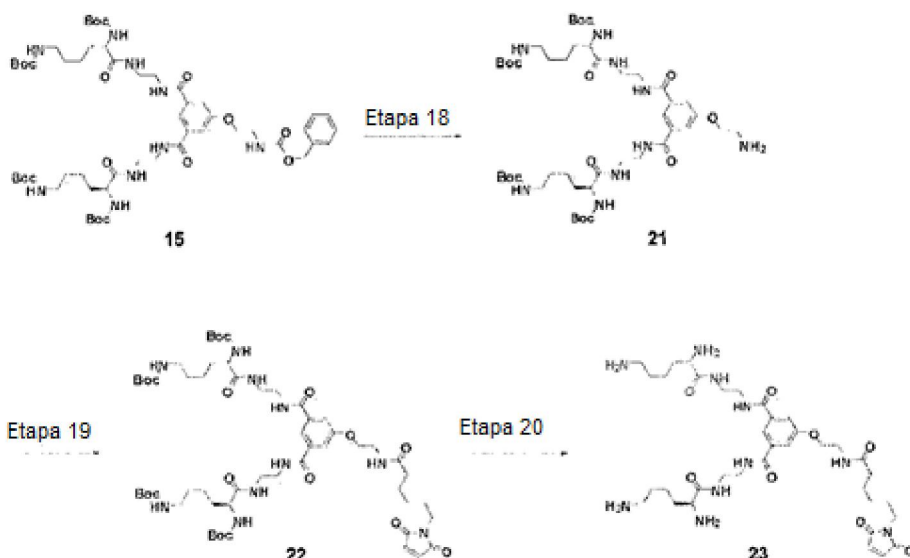
Se añadieron compuesto 18 (0,437 g, 0,7143 mmol), sintetizado en la etapa 15, N α ,N ϵ -bis(terc.-butoxicarbonil)-L-lisina (fabricada por Novabiochem/Merck Millipore, 0,5483 g, 1,583 mmol), diisopropiletilamina (0,624 mL, 3,57 mmol) y hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (0,5703 g, 1,5 mmol) y la mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadió una solución acuosa de ácido cítrico al 10% a la solución de reacción, seguido de extracción con acetato de etilo. Luego, la capa orgánica se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener cuantitativamente el compuesto 19. ESI-MS m/z : 1269 ($M + H$)⁺

Etapa 17

El compuesto 19 (0,906 g, 0,7143 mmol) sintetizado en la etapa 16 se disolvió en diclorometano (12 mL). A la solución se añadió ácido trifluoroacético (3 mL, 38,9 mmol) bajo enfriamiento con hielo y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas.. El disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener cuantitativamente el compuesto 20. ESI-MS m/z: 869 (M + H)⁺

Ejemplo 3 Síntesis de unidad de enlace - 3

Síntesis de compuesto 23



Etapa 18

El compuesto 15 (100 mg, 0,091 mmol) sintetizado en la etapa 12 se disolvió en metanol (3 mL). A la solución se añadió ácido acético (2 μ L), seguido de reducción catalítica con hidrógeno utilizando paladio/carbono. El disolvente en la fracción de solución obtenida se separó por destilación a presión reducida para obtener cuantitativamente el compuesto 21. ESI-MS m/z: 967 (M + H)⁺

Etapa 19

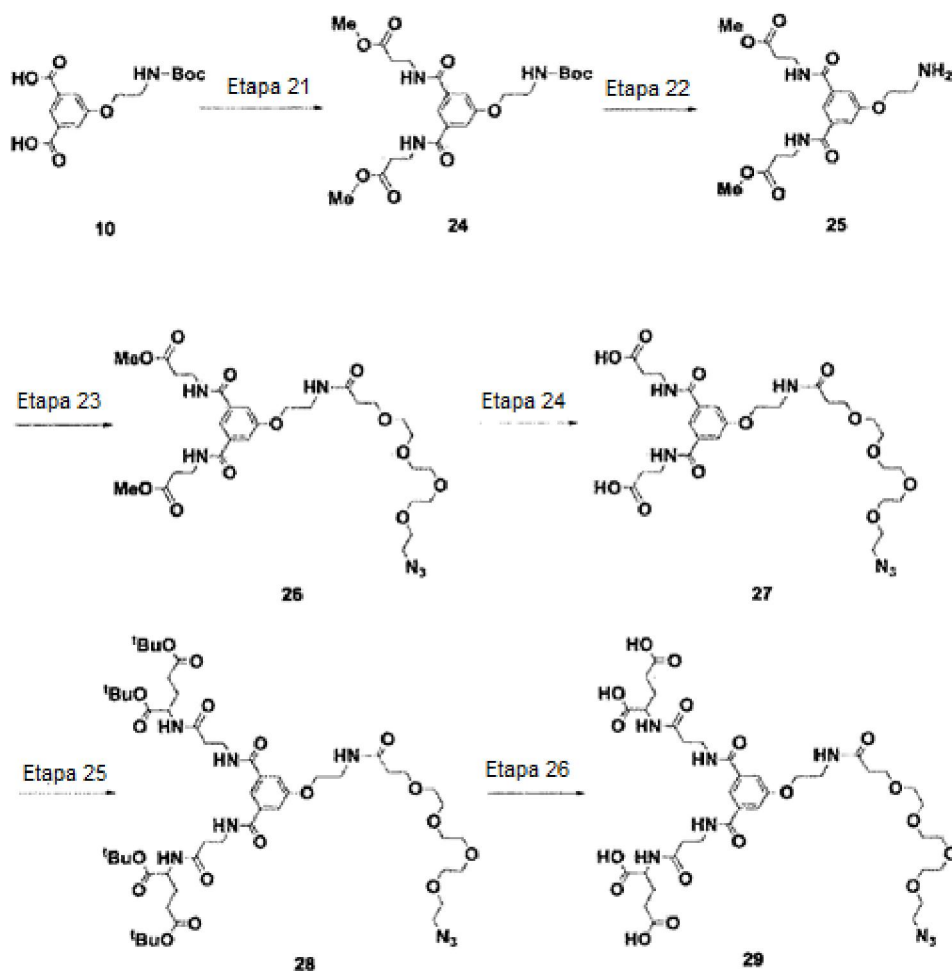
El compuesto 21 (50 mg, 0,052 mmol), sintetizado en la etapa 18 y N-(6-maleimidocaproiloxi)succinimida (48 mg, 0,155 mmol) se disolvieron en tetrahidrofurano (2 mL). A la solución se añadió diisopropiletilamina (0,045 mL, 0,259 mmol) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo/metanol) para obtener el compuesto 22 (18 mg, rendimiento: 30%). ESI-MS m/z: 1160 (M + H)⁺

Etapa 20

El compuesto 22 (18 mg, 0,016 mmol) sintetizado en la etapa 19 se disolvió en diclorometano (2 mL). A la solución se añadió ácido trifluoroacético (0,2 mL, 2,6 mmol) bajo enfriamiento con hielo y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente en la solución de reacción se separó por destilación a presión reducida y el residuo se cristalizó en dietil éter para obtener el compuesto 23 (7,5 mg, rendimiento: 64%) en forma de un sólido blanco. ESI-MS m/z: 759 (M + H)⁺

Ejemplo 4 Síntesis de unidad de enlace - 4

Síntesis de compuesto 29



Etapa 21

El compuesto 24 se obtuvo cuantitativamente de la misma manera que en la etapa 8 del Ejemplo 1 utilizando el compuesto 10 (0,9372 g, 2,8809 mmol) sintetizado en la etapa 7 e hidrocloreto de éster metílico de β -alanina (fabricado por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 0,8082 g, 5,7902 mmol).
ESI-MS m/z: 495 (M + H)⁺

Etapa 22

El compuesto 25 se obtuvo cuantitativamente de la misma manera que en la etapa 9 del Ejemplo 1 utilizando el compuesto 24 (0,9622 g, 1,952 mmol) sintetizado en la etapa 21.
ESI-MS m/z: 396 (M + H)⁺

Etapa 23

El compuesto 26 se obtuvo cuantitativamente de la misma manera que en la etapa 19 del Ejemplo 3 utilizando el compuesto 25 (0,1146 g, 0,290 mmol) sintetizado en la etapa 22 y ácido N-succinimidil 15-azido-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico (N3-PEG4-NHS, fabricado por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 0,0750 g, 0,1931 mmol).
ESI-MS m/z: 669 (M + H)⁺

Etapa 24

El compuesto 27 se obtuvo cuantitativamente de la misma manera que en la etapa 7 del Ejemplo 1 utilizando el compuesto 26 (0,1291 g, 0,193 mmol) sintetizado en la etapa 23.
ESI-MS m/z: 641 (M + H)⁺

Etapa 25

El compuesto 28 (0,0521 g, rendimiento: 24%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 8 del Ejemplo 1 utilizando el compuesto 27 (0,1252 g, 0,193 mmol) sintetizado en la etapa 24 y éster di-terc-butílico del ácido L-glutámico (fabricado por Watanabe Chemical Industries, Ltd., 0,1180 g, 0,399 mmol).

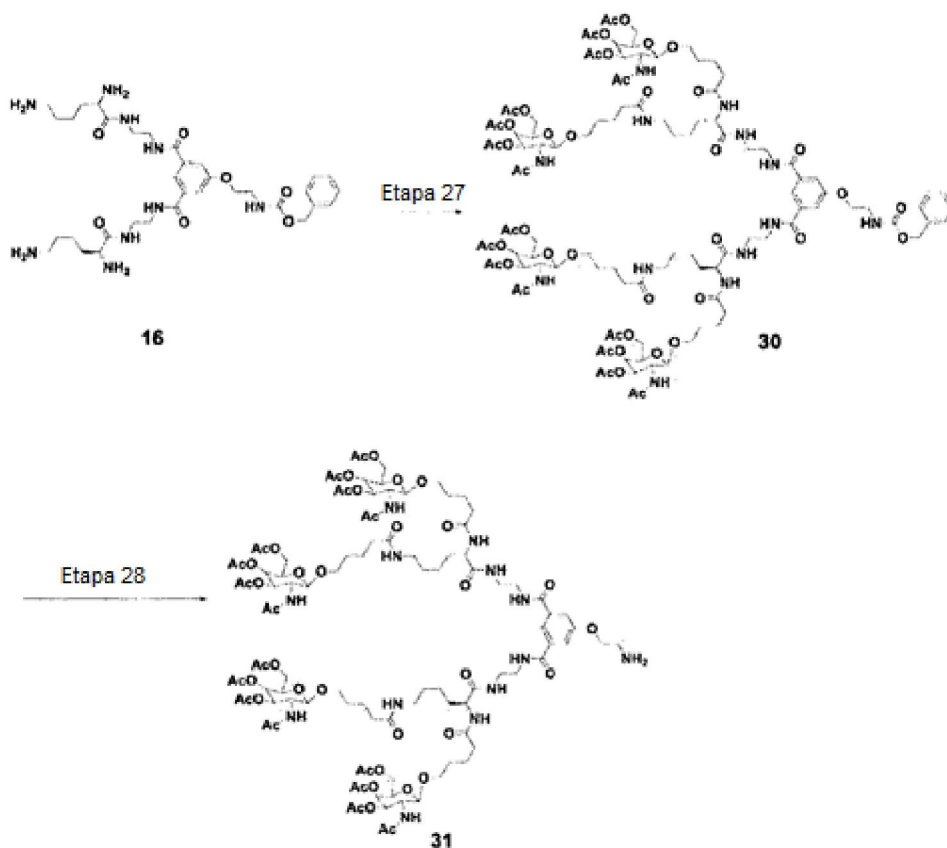
ESI-MS m/z: 1124 (M + H)⁺

Etapa 26

- 5 El compuesto 29 (36 mg, rendimiento: 86%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 9 del Ejemplo 1 utilizando el compuesto 28 (0,0521 g, 0,0464 mmol) sintetizado en la etapa 25. ESI-MS m/z: 899 (M + H)⁺

Ejemplo 5 Síntesis de unidad de anillo de ligando de azúcar-benceno - 1

- 10 Síntesis de compuesto 31



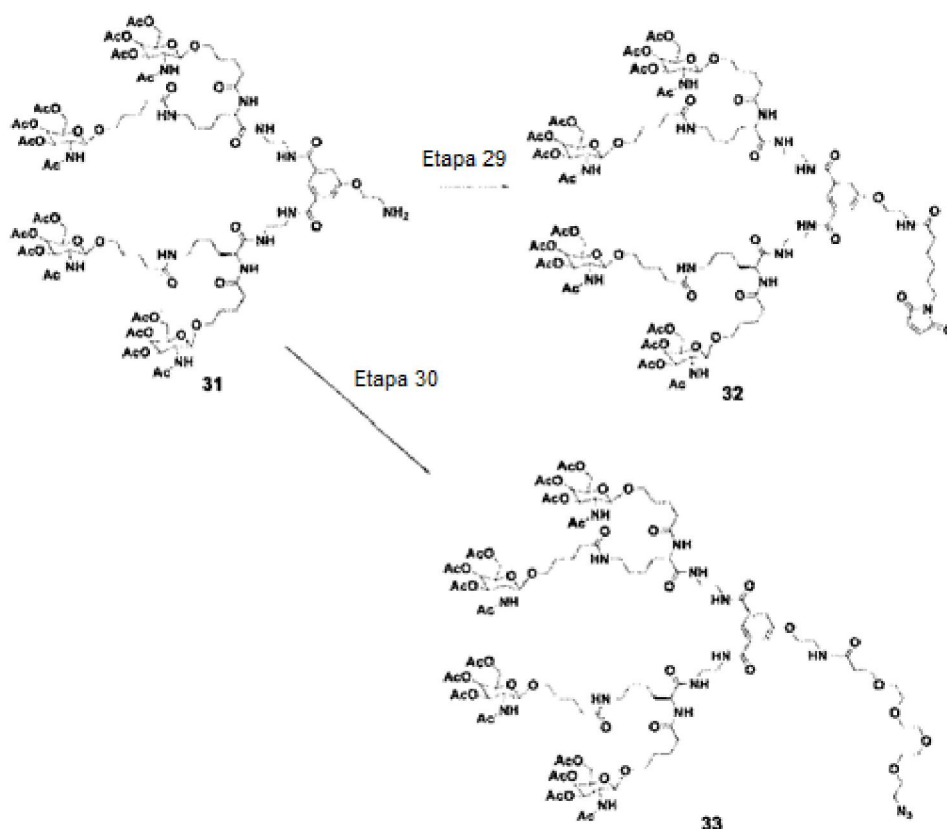
Etapa 27

- 15 El compuesto 30 (0,5272 g, rendimiento: 61%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 8 del Ejemplo 1 utilizando el compuesto 16 (0,2586 g, 0,3695 mmol) sintetizado en la etapa 13 y el compuesto 1 (0,8559 g, 1,7927 mmol), sintetizado por el método descrito en Journal of American Chemical Society, Vol. 136, págs. 16958-16961, 2014. ESI-MS m/z: 2418 (M + H)⁺

- 20 Etapa 28

El compuesto 31 (0,1524 g, rendimiento: 61%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 21 del Ejemplo 3 utilizando el compuesto 30 (0,2653 g, 0,1097 mmol) sintetizado en la etapa 27. ESI-MS m/z: 2284 (M + H)⁺

- 25 Ejemplo 6 Síntesis de ligando de azúcar-enlace - 2



Síntesis de compuesto 32

Etapa 29

5

El compuesto 32 (0,0077 g, rendimiento: 47%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 19 del Ejemplo 3 utilizando el compuesto 31 (0,0152 g, 0,006657 mmol) sintetizado en la etapa 28.

ESI-MS m/z: 1239(M + 2H)²⁺

10 ¹H-RMN (DMSO-D₆) δ: 1,11-1,66 (34H, m), 1,77 (12H, d, J = 1,5 Hz), 1,89 (12H, s), 2,01-2,14 (10H, m), 2,01 (12H, s), 2,10 (12H, s), 2,92-2,99 (4H, m), 3,16-3,54 (14H, m), 3,65-3,74 (4H, m), 3,81-3,91 (4H, m), 3,98-4,08 (14H, m), 4,11-4,24 (4H, m), 4,48 (4H, dd, J = 8,4, 1,8 Hz), 4,93-5,00 (4H, m), 5,21 (4H, d, J = 3,5 Hz), 6,99 (2H, s), 7,52 (2H, s), 7,66-7,75 (2H, m), 7,78-7,87 (6H, m), 7,91 (1H, s a), 8,01-8,08 (3H, m a), 8,54-8,60 (2H, m a).

Síntesis de compuesto 33

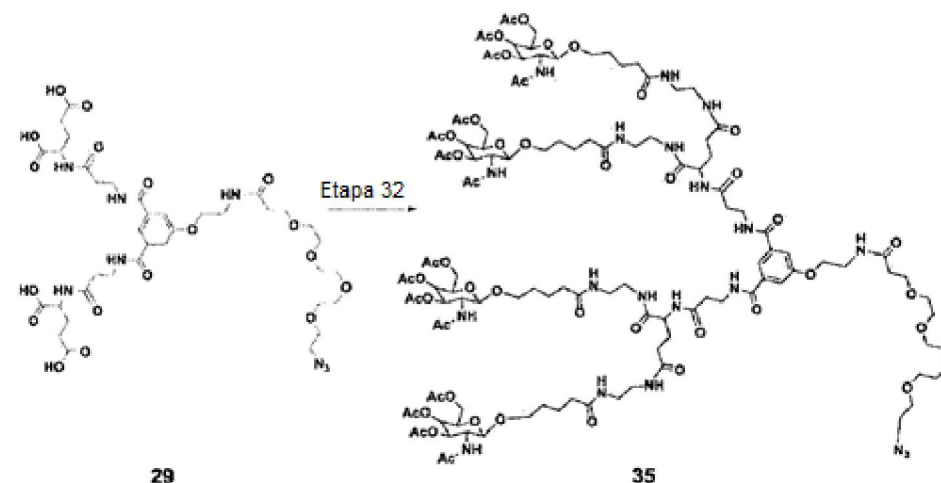
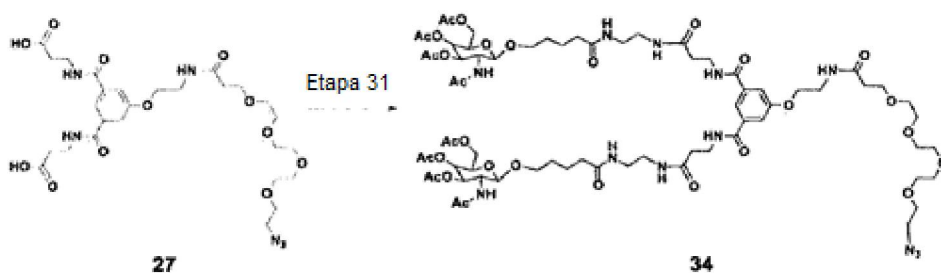
15

Etapa 30

El compuesto 33 (0,0062 g, rendimiento: 37%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 23 del Ejemplo 4 utilizando el compuesto 31 (0,0150 g, 0,00657 mmol) sintetizado en la etapa 28. ESI-MS m/z: 1279(M + 2H)²⁺

20 ¹H-RMN (DMSO-D₆) δ: 1,11-1,66 (30H, m), 1,77 (12H, s), 1,89 (12H, s), 2,01-2,14 (8H, m), 2,01 (12H, s), 2,10 (12H, s), 2,33-2,38 (2H, m), 2,92-2,99 (4H, m), 3,16-3,54 (14H, m), 3,58-3,63 (16H, m), 3,65-3,74 (4H, m), 3,81-3,91 (4H, m), 3,98-4,08 (12H, m), 4,11-4,24 (4H, m), 4,48 (4H, dd, J = 8,4, 1,8 Hz), 4,93-5,00 (4H, m), 5,21 (4H, d, J = 3,5 Hz), 7,52 (2H, s), 7,66-7,75 (2H, m), 7,78-7,87 (6H, m), 7,91 (1H, s a), 8,01-8,08 (3H, m a), 8,54-8,60 (2H, m a).

25 Ejemplo 7 Síntesis de ligando de azúcar-enlace - 3



Síntesis de compuesto 34

Etapa 31

5

Se obtuvo un producto bruto del compuesto 34 de la misma manera que en la etapa 8 del Ejemplo 1 utilizando el compuesto 27 (0,00436 g, 0,00681 mmol) sintetizado en la etapa 24 y el compuesto 4 (0,010 g, 0,020 mmol) sintetizado en la etapa 3 del Ejemplo de Referencia 1.

ESI-MS m/z: 1584 (M + H)⁺

10

Síntesis de compuesto 35

Etapa 32

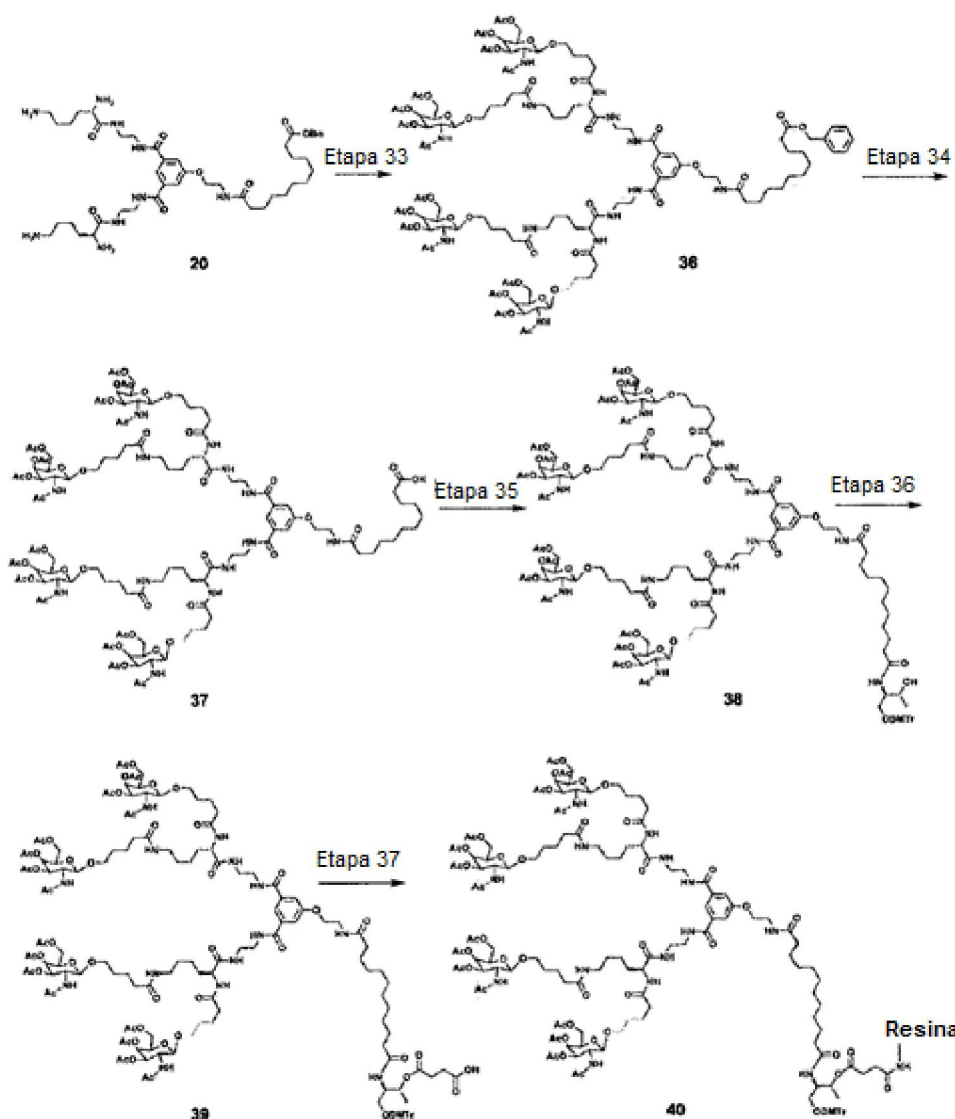
15

El compuesto 35 (0,0223 g, rendimiento: 72%) se obtuvo de la misma forma que en la etapa 8 del Ejemplo 1 utilizando el compuesto 29 (0,0100 g, 0,01112 mmol) sintetizado en la etapa 26. ESI-MS m/z: 1393 (M + 2H)²⁺

Ejemplo 8 Síntesis unidad de ligando de azúcar-enlace

20

Síntesis de compuesto 40



Etapa 33

El compuesto 36 (334,8 mg, rendimiento: 58%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 8 del Ejemplo 1 utilizando el compuesto 20 (0,1952 g, 0,225 mmol) sintetizado en la etapa 17 y el compuesto 1 (0,4162 g, 0,93 mmol), sintetizado por el método descrito en Journal of American Chemical Society, Vol. 136, págs. 16958-16961, 2014.

ESI-MS m/z: 1294 (M + 2H)²⁺

Etapa 34

El compuesto 37 (112 mg, rendimiento: 80%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 18 del Ejemplo 3 utilizando el compuesto 36 (0,1459 g, 0,056 mmol) sintetizado en la etapa 33.

ESI-MS m/z: 1249 (M + 2H)²⁺

¹H-RMN (DMSO-D₆) δ: 1,11-1,66 (44H, m), 1,77 (12H, d, J = 1,5 Hz), 1,89 (12H, s), 2,01-2,20 (12H, m), 2,01 (12H, s), 2,10 (12H, s), 2,92-2,99 (4H, m), 3,16-3,54 (10H, m), 3,58-3,64 (4H, m), 3,65-3,74 (4H, m), 3,81-3,91 (4H, m), 3,98-4,08 (12H, m), 4,11-4,24 (4H, m), 4,48 (4H, dd, J = 8,4, 1,8 Hz), 4,93-5,00 (4H, m), 5,21 (4H, d, J = 3,5 Hz), 6,99 (2H, s), 7,52 (2H, s), 7,66-7,75 (2H, m), 7,78-7,87 (6H, m), 7,91 (1H, s a), 8,01-8,08 (3H, m a), 8,54-8,60 (2H, m a).

Etapa 35

El compuesto 38 se obtuvo en forma de un producto bruto de la misma manera que en la etapa 8 del Ejemplo 1 utilizando el compuesto 37 (0,1091 g, 0,044 mmol) sintetizado en el etapa 34 y el compuesto 7 (0,0748 g, 0,184 mmol) producido en el etapa 5 del Ejemplo de Referencia 2.

ESI-MS m/z: 1292 (M + 2H)²⁺, detectado como una forma DTMr-desprotegida

Etapa 36

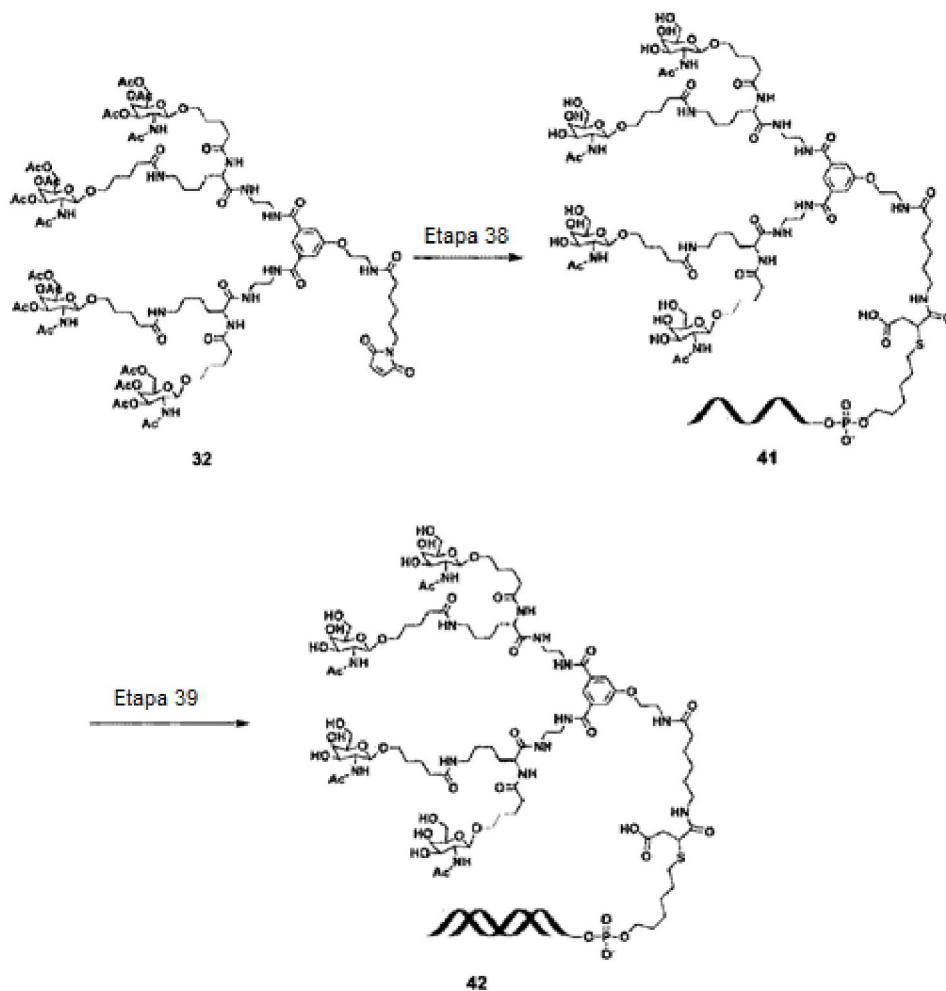
El compuesto 38 (0,161 g, 0,05586 mmol) sintetizado en la etapa 35 se disolvió en diclorometano (5 mL). A la solución se añadieron anhídrido succínico (fabricado por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 0.1182 g, 1.181 mmol), N,N-dimetilaminopiridina (0.0224 g, 0.183 mmol) y trietilamina (0.55 mL, 3.95 mmol), y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La solución de reacción se enfrió con hielo y se añadió agua a la misma, seguido de extracción con acetato de etilo dos veces. Luego, la capa orgánica se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener un producto bruto del compuesto 39.

ESI-MS m/z : 1342 ($M + 2H$)²⁺, detectado como una forma DTMr-desprotegida

Etapa 37

Compuesto 39 (0,0816 g, 0,02734 mmol) sintetizado en la etapa 36, hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (0.0221 g, 0.05827 mmol) y diisopropiletilamina (0.02 mL, 0,1094 mmol) se disolvieron en N,N-dimetilformamida (4 mL). A la solución se añadió LCAA-CPG (fabricado por ChemGenes Corp., 0,4882 g) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla se recogió por filtración, se lavó con diclorometano, una solución al 10% de metanol en diclorometano y dietil éter en este orden y luego se dejó actuar sobre una solución de anhídrido acético en piridina para obtener el compuesto 40 (49,5 μ mol/g, rendimiento: 89%). El rendimiento se calculó a partir de la velocidad de introducción a un soporte en fase sólida que se puede calcular a partir de la absorción derivada de un grupo DMTr añadiendo una solución al 1% de ácido trifluoroacético en diclorometano a la forma soportada por la fase sólida.

Ejemplo 9 Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos - 1



Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos 41

Etapa 38

Se añadieron el compuesto 32 sintetizado en la etapa 29 y un oligonucleótido modificado terminalmente con un grupo mercapto, sintetizado mediante el método descrito en Molecules, Vol. 17, págs. 13825-13843, 2012 y se dejaron reposar

a temperatura ambiente durante 4 horas. Se añadió carbonato de sodio a la mezcla de reacción y la mezcla se dejó reposar durante la noche a 4°C. Se obtuvieron tres tipos de conjugados de ácidos nucleicos de cadena sencilla 41 que difieren en oligonucleótidos mediante purificación mediante cualquier método de cromatografía de intercambio aniónico (GE Healthcare Japan Corp., Mono Q 5/50 GL, 10 µm, 5,0 mm x 50 mm, solución A: Solución tampón Tris 10 mmol/L/acetronitrilo al 30%, solución B: gradiente con solución tampón Tris 10 mmol/L/acetronitrilo al 30%/NaBr 1 mol/L) y cromatografía líquida de fase inversa (Waters Corp., X Bridge C18, 5 µm, 4,6 mm x 250 mm, solución tampón de acetato de trietilamonio 0,1 mol/L, solución B: gradiente con acetronitrilo).

Las secuencias y los resultados de la espectrometría de masas de los conjugados de ácidos nucleicos sintetizados en este Ejemplo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Compuesto	Secuencia (5' a 3')	Peso molecular teórico	Encontrado
ApoBASO	G(L) ⁵ (L) ^a t ^t g ^a t ^a t ^t T(L) ⁵ (L) ^A (L)	-	-
41_3'-ApoBASO	G(L) ⁵ (L) ^a t ^t g ^a t ^a t ^t T(L) ⁵ (L) ^A (L) <u>41</u>	6514	6512
41_5'-ApoBASO	<u>41</u> G(L) ⁵ (L) ^a t ^t g ^a t ^a t ^t T(L) ⁵ (L) ^A (L)	6514	6511
41_3'-AT3-ssRNA	G(F) ^a G(M) ^a U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F)A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>41</u>	8971	8971

En la tabla, n representa ADN; N(M) representa ARN modificado con 2'-O-metilo; N(F) representa ARN modificado con 2'-flúor; N(L) representa LNA; 5(L) representa LNA^mC; ^ representa la modificación de fosforotioato; ss representa una cadena sentido; as representa una cadena antisentido; un número subrayado representa un grupo de modificación correspondiente al N° de compuesto en el Ejemplo. Lo mismo es válido para cada una de las tablas que se describen más adelante.

Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos 42

Etapas 39

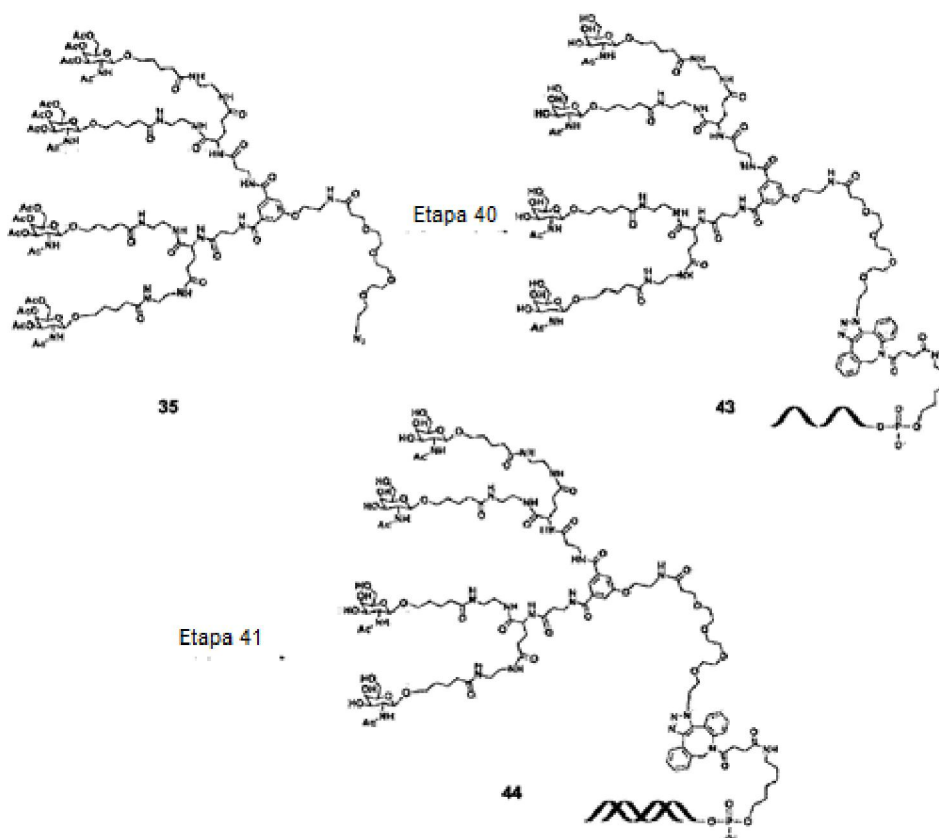
El conjugado de ácidos nucleicos de cadena sencilla 41_3'-AT3-ARNcs sintetizado en la etapa 38 se ajustó a la concentración (50 µmol/L) con una solución tampón mixta (100 mmol/L de acetato de potasio, 30 mmol/L de ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfónico, HEPES)-KOH (pH 7,4), 2 mmol/L de acetato de magnesio). La cadena sentido arriba mencionada y una cadena antisentido (50 µmol/L) se mezclaron en cantidades iguales y se dejaron reposar a 80°C durante 10 minutos. La secuencia de la cadena antisentido es como se describe en la Tabla 2. La temperatura se disminuyó gradualmente y lo resultante se dejó reposar a 37°C durante 1 hora para obtener el conjugado 42 de ácidos nucleicos de doble cadena.

La secuencia del conjugado de ácidos nucleicos sintetizado en este Ejemplo se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Compuesto	Nombre de cadena sencilla	Secuencia (5' a 3')
42_3'-AT3-siRNA	41_3'-AT3-ssRNA	G(F) ^a G(M) ^a U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F)A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>41</u>
	A T3-asRNA	U(M) ^a U(F) ^a G(M)A(F)A(M)G(F)U(M)A(F)A(M)A(F)U(M)G(M)G(M)U(F)G(M)U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)C(M) ^a A(M) ^a G(M)

Ejemplo 10 Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos - 2



Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos 43

Etapa 40

Se obtuvo el conjugado 43 de ácidos nucleicos de cadena sencilla utilizando las mismas condiciones de reacción y procedimientos que en la etapa 38 del Ejemplo 9 utilizando el compuesto 35 sintetizado en la etapa 32 y un oligonucleótido sintetizado por el método descrito en ACS Nano, Vol. 9, págs. 9652-9664, 2015.

La secuencia y los resultados de la espectrometría de masas del conjugado de ácidos nucleicos sintetizado en este Ejemplo se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Compuesto	Secuencia (5' a 3')	Peso molecular teórico	Encontrado
43_5'-B2M-ssRNA	43 A{F}G{M}G{F}A{M}C{F}U{M}G{F}G{M}U{F}C{M}U{F}U{F}U{M}C{F}U{M}A{F}U{M}C{F}U{M}^C{F}^U{M}	9529	9528

Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos 44

Etapa 41

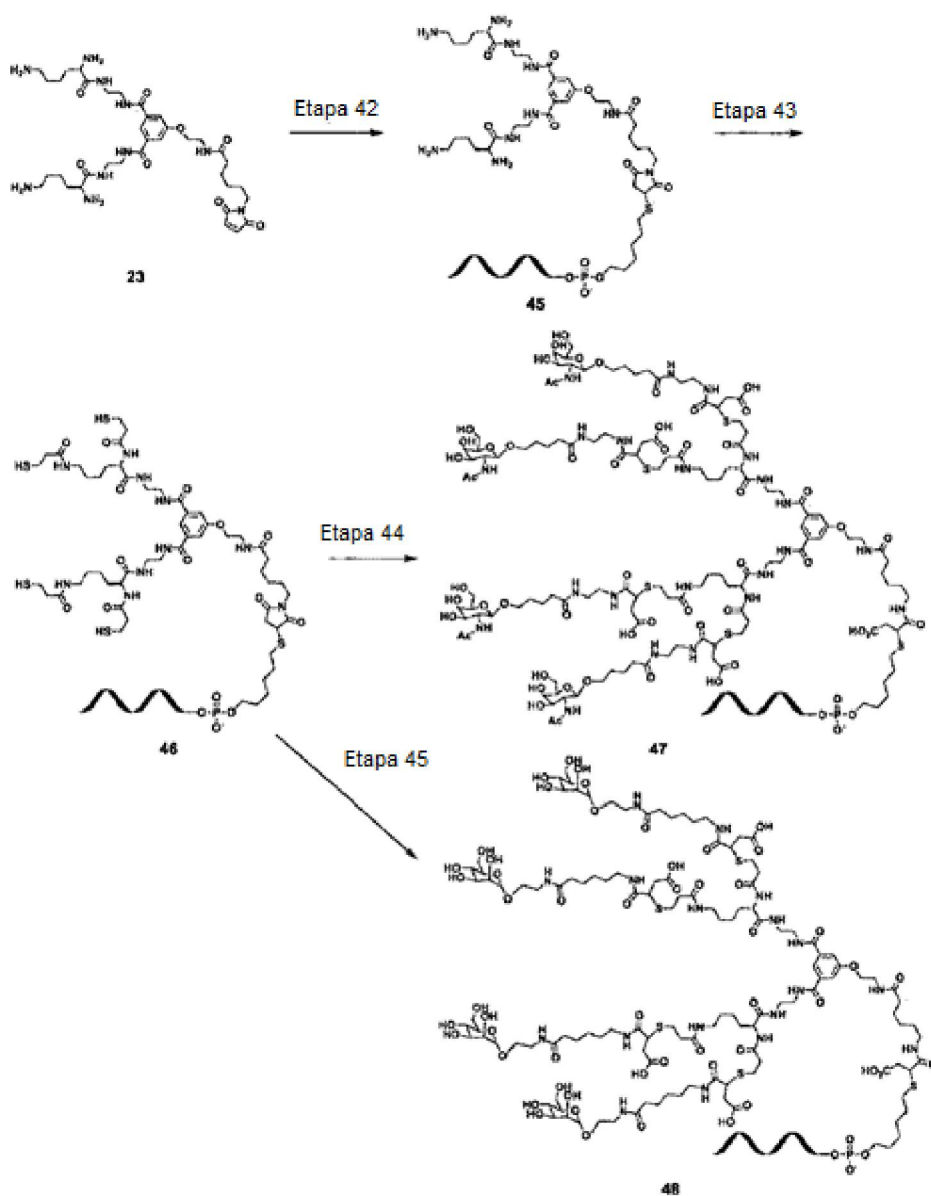
Se obtuvo el conjugado 44 de ácidos nucleicos de doble cadena de la misma manera que en la etapa 39 del Ejemplo 9.

La secuencia del conjugado de ácidos nucleicos sintetizado en este Ejemplo se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Compuesto	Nombre de cadena sencilla	Secuencia (5' a 3')
44 3'-B2M-siRNA	43_5'-B2M-ssRNA	43 A(F)G(M)G(F)A(M)C(F)U(M)G(F)G(M)U(F)C(M) U(F)U(F)U(M)C(F)U(M)A(F)U(M)C(F)U(M)^C(F)^U(M)
	B2M-as-RNA	A(F)^G(M)^A(F)G(M)A(F)U(M)A(F)G(M)A(F)A(M)A(M) G(F)A(M)C(F)C(M)A(F)G(M)U(F)C(M)C(F)U(M)^U(F)^G(M)

Ejemplo 11 Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos - 3



5 Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos 45

Etapa 42

10 Se obtuvo conjugado de ácidos nucleicos 45 de la misma manera que en la etapa 38 del Ejemplo 9 utilizando el compuesto 23 (648 nmol) sintetizado en la etapa 20 y el oligonucleótido modificado terminalmente en el grupo mercapto (216 nmol), sintetizado por el método descrito en *Molecules*, Vol. 17, págs. 13825-13843, 2012.

Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos 46

Etapa 43

Al compuesto 45 (100 nmol), sintetizado en la etapa 42, se añadió una solución de N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (6,3 mg, 20 μ mol) en dimetilsulfóxido y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 4 horas en una solución de tampón fosfato. Se añadió ditiotretol (15,4 mg, 100 μ mol) a la solución de reacción y la mezcla se dejó en reposo durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla se sometió a un tratamiento de filtración en gel (columna Nap, fabricada por GE Healthcare Japan Corp., disolvente de elución: solución tampón de ácido acético / acetato de sodio 20 mmol/L (pH 5,0)) y ultrafiltración para obtener el conjugado de ácidos nucleicos 46.

Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos 47

Etapa 44

Se obtuvo un conjugado de ácidos nucleicos 47 de la misma manera que en la etapa 38 del Ejemplo 9 utilizando el compuesto 46 sintetizado en la etapa 43 y el compuesto 2 sintetizado en la etapa 1 del Ejemplo de Referencia 1.

Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos 48

Etapa 45

Se obtuvo el conjugado de ácidos nucleicos 48 de cadena sencilla de la misma manera que en la etapa 43 y un aducto de manosa maleimida sintetizado por el método descrito en Bioconjugate Chemistry, Vol. 9, págs. 232-238, 2003.

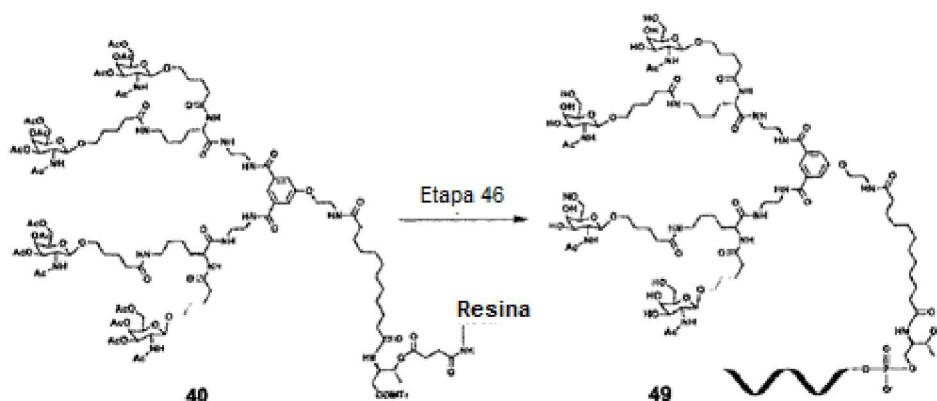
Las secuencias y los resultados de la espectrometría de masas de los conjugados de ácidos nucleicos sintetizados en este Ejemplo se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Compuesto	Secuencia (5' a 3')	Peso molecular teórico	Encontrado
45_5'-CD45-ASO	<u>45</u> C(L) [^] C(L) [^] A(L) [^] A(L) [^] a [^] t [^] g [^] c [^] a [^] a [^] g [^] A(L) [^] G(L) [^] T(L) [^] T(L)	6479	6479
46_5'-CD45-ASO	<u>46</u> C(L) [^] C(L) [^] A(L) [^] A(L) [^] a [^] t [^] g [^] c [^] a [^] a [^] g [^] A(L) [^] G(L) [^] T(L) [^] T(L)	6832	6832
47_5'-CD45-ASO	<u>47</u> C(L) [^] C(L) [^] A(L) [^] A(L) [^] a [^] t [^] g [^] c [^] a [^] a [^] g [^] A(L) [^] G(L) [^] T(L) [^] T(L)	8695	8696
48_5'-CD45-ASO	<u>48</u> C(L) [^] C(L) [^] A(L) [^] A(L) [^] a [^] t [^] g [^] c [^] a [^] a [^] g [^] A(L) [^] G(L) [^] T(L) [^] T(L)	8587	8585

Ejemplo 12 Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos - 4

Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos 49



Etapa 46

Se sintetizaron conjugados de oligonucleótidos que tienen un grupo GalNAc en el extremo 3' de una cadena antisentido (al que cada uno se alude como G-CH1179-s, G-CH0099-s y G-CH1180-s) en una escala de 0,2 μ mol utilizando un aparato de síntesis de ácidos nucleicos (Ultra Fast Parallel Synthesizer, fabricado por Sigma-Aldrich Co. LLC; al que en lo sucesivo se le alude como UFPS). El compuesto 40 sintetizado en el etapa 37 se utilizó como un soporte en fase sólida. La fosoramidita de dimetoxitritilo dT (SAFC-PROLIGO/Sigma-Aldrich Co. LLC) se ajustó a 0,06 mol/L con acetonitrilo. La reacción de condensación se realizó con cada tiempo establecido en 10 minutos utilizando 5-benciltio-1H-tetrazol (SAFC-PROLIGO/Sigma-Aldrich Co. LLC) como un activador de fosoramidita y una solución 0,06 mol/L de dT fosoramidita en acetonitrilo. Después de la reacción, lo resultante se sumergió en una solución de amoniaco al 28% y se dejó a 55°C durante 4 horas. Después de la concentración a presión reducida, la reacción se terminó mediante la adición de 1-butanol. El conjugado de ácidos nucleicos 49 de cadena sencilla se obtuvo mediante purificación utilizando cromatografía líquida

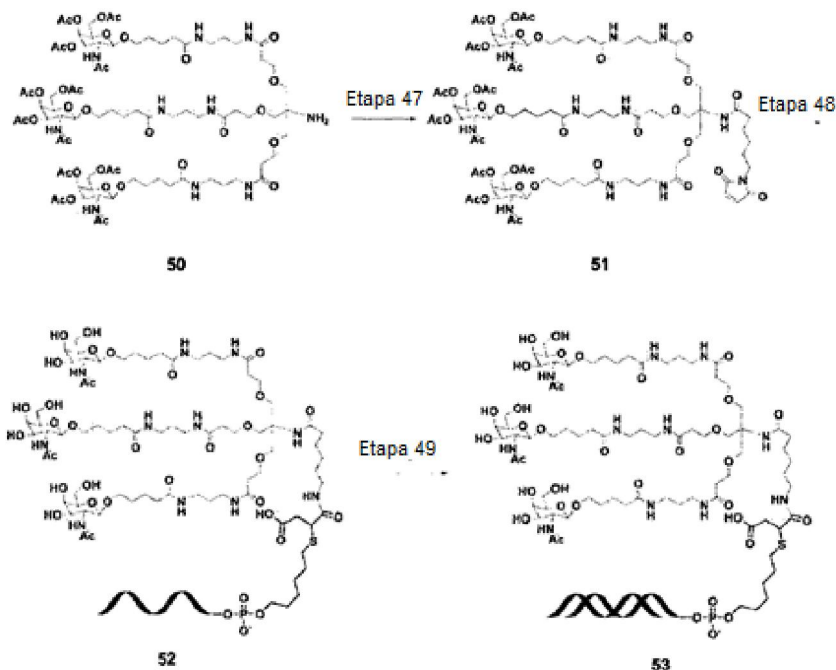
de fase inversa (Shiseido Co., Ltd., CAPSELL PAK C18, SG300, 6,0 mm x 75 mm, solución tampón acetonitrilo al 5%/acetato de trietilamonio al 0,1%, solución B: gradiente con 50% de acetonitrilo/agua).

La secuencia y los resultados de la espectrometría de masas del conjugado de ácidos nucleicos sintetizado en este Ejemplo se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

Compuesto	Secuencia (5' a 3')	Peso molecular teórico	Encontrado
49_3'-dT10	Ttttttttt <u>49</u>	5120	5120

Ejemplo Comparativo 1 Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos



Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos 52

Etapa 47

- 15 El compuesto 51 (0,014 g, rendimiento: 19%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 29 del Ejemplo 6 utilizando el compuesto 50 (0,0796 g, 0,044 mmol) sintetizado por el método descrito en Journal of American Chemical Society, Vol. 136, págs. 16958-16961, 2014.
ESI-MS m/z: 994 (M + 2H)²⁺

Etapa 48

Se obtuvieron tres tipos de conjugados de ácidos nucleicos 52 de cadena sencilla que difieren en oligonucleótidos de la misma manera que en la etapa 38 del Ejemplo 9 utilizando el compuesto 51 sintetizado en la etapa 47.

- 25 Las secuencias y los resultados de la espectrometría de masas de los conjugados de ácidos nucleicos sintetizados en este Ejemplo se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

Compuesto	Secuencia (5' a 3')	Peso molecular teórico	Encontrado
52_3' ApoBASO	G(L) ⁵ (L) ^a t ^t t ^a g ^a t ^a t ^T (L) ⁵ (L) ^A (L) 52	6148	6147
52_5' ApoBASO	<u>52</u> G(L) ⁵ (L) ^a t ^t t ^a g ^a t ^a t ^T (L) ⁵ (L) ^A (L)	6148	6148
52_3' ARNcs	G(F) ^A G(M) ^U F(U)(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F)A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>52</u>	8564	8564

Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos 53

Etapa 49

- 5 Se obtuvo un conjugado de ácidos nucleicos 53 de doble cadena de la misma manera que en la etapa 39 del Ejemplo 9 utilizando el compuesto 52_3'-AT3-ARNcs sintetizado en la etapa 48.

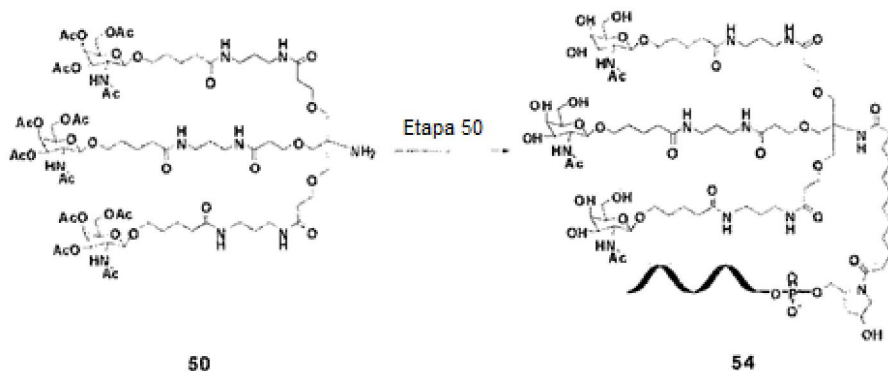
La secuencia del conjugado de ácidos nucleicos sintetizado en este Ejemplo se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

Compuesto	Nombre de cadena sencilla	Secuencia (5' a 3')
53_3'-AT3-siRNA	52_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>52</u>
	AT3-asRNA	U(M)^U(F)^G(M)A(F)A(M)G(F)U(M)A(F)A(M)A(F) U(M)G(M)G(M)U(F)G(M)U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)C(M)^A(M)^G(M)

Ejemplo Comparativo 2 Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos

Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos 54



El conjugado de ácidos nucleicos 54 de cadena sencilla que tiene ApoBASO (véase la Tabla 1) se obtuvo mediante el método descrito en Journal of American Chemical Society, Vol. 136, págs.16958-16961, 2014.

Ejemplo de Ensayo 1 Actividad *In vitro* del conjugado de ácidos nucleicos contra la célula primaria del hígado de ratón

- Entre los conjugados de ácidos nucleicos sintetizados en el Ejemplo 9, Ejemplo Comparativo 1 y Ejemplo Comparativo 2, ApoBASO (sustancia de ensayo 1), conjugado de ácidos nucleicos 54 (sustancia de ensayo 2), 52_3'-ApoBASO (sustancia de ensayo 3), 52_5'-ApoBASO (sustancia de ensayo 4), 41_3'-ApoBASO (sustancia de ensayo 5) y 41_5'-ApoBASO (sustancia de ensayo 6) se transfirieron cada una a células primarias del hígado de ratón derivadas de CD-1 (fabricadas por Life Technologies Corp., N° de Catálogo MSCP10) por el siguiente método.

- Cada uno de los conjugados de ácidos nucleicos diluido con Opti-MEM (Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc., 31985) de manera que la concentración final fuera de 30, 10 o 3 nmol/L se dispensó a razón de 20 µL/pocillo a una placa de cultivo de 96 pocillos. A continuación, se inocularon células primarias del hígado de ratón suspendidas en Medio E de William (fabricado por Life Technologies Corp., N° de catálogo A12176-01) que contenía Complementos de Descongelación y Recubrimiento de Hepatocitos Primarios (fabricado por Life Technologies Corp., N° de Catálogo CM3000) a 12500 células/80µL/pocillo a la misma y se cultivaron a 37°C durante 6 horas bajo condiciones de 5% de CO₂. A continuación, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante del cultivo y se añadió a ello medio E de William que contenía Complementos de Descongelación y Recubrimiento de Hepatocitos Primarios (fabricado por Life Technologies Corp., N° de Catálogo CM4000). Las células no tratadas se inocularon como un grupo de control negativo.

- Las células que albergan cada una de las preparaciones se cultivaron a 37°C durante 18 horas en una incubadora a 5% de CO₂ y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato enfriada con hielo. La recuperación de ARN total y la preparación de ADNc a través de la reacción de transcripción inversa utilizando el ARN total obtenido como molde se

realizaron utilizando el kit SuperPrep Cell Lysis & RT para qPCR (fabricado por Toyobo Co., Ltd., número de catálogo SCQ-201) de acuerdo con el método descrito en las instrucciones adjuntas al producto.

El ADNc obtenido se utilizó como molde en la reacción de PCR utilizando la Sonda de Ensayo de Expresión Génica TaqMan(R) (fabricada por Applied Biosystems, Inc.) como una sonda y el Sistema de PCR en Tiempo Real QuantStudio 12K Flex (fabricado por Applied Biosystems, Inc.) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones adjunto para amplificar el gen de la apolipoproteína B (también denominada apolipoproteína-B100/apolipoproteína-B48; a la que se alude en adelante como apob) y un gen expresado constitutivamente D-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (al que se alude en adelante como gapdh). Se midieron sus respectivos niveles de amplificación de ARNm, y se calculó el valor semicuantitativo de ARNm de apob con el nivel de amplificación de ARNm de gapdh como control interno. La tasa de expresión de ARNm de apob se determinó a partir del valor semi-cuantitativo de ARNm de apob cuando el valor semicuantitativo de ARNm de apob en el control negativo medido de la misma manera que antes se definió como 1. Los resultados obtenidos sobre la tasa de expresión de ARNm de apob se muestran en las Tablas 9 y 10 como una tasa de inhibición frente a la tasa de expresión de ARNm de apob del control negativo. Cada una de las tablas muestra los resultados de cada ensayo individual

Tabla 9

Sustancia de ensayo	Sustancia de ensayo 1			Sustancia de ensayo 2		
Dosis [nmol/L]	30	10	3	30	10	3
Nivel de ARNm de apob [% tasa de inhibición]	20,89	1,46	7,22	98,65	85,96	47,78
Sustancia de ensayo	Sustancia de ensayo 3			Sustancia de ensayo 4		
Dosis [nmol/L]	30	10	3	30	10	3
Nivel de ARNm de apob [% tasa de inhibición]	98,46	71,13	37,32	99,99	97,23	73,02

Tabla 10

Sustancia de ensayo	Sustancia de ensayo 1			Sustancia de ensayo 2		
Dosis [nmol/L]	30	10	3	30	10	3
Nivel de ARNm de apob [% tasa de inhibición]	34,28	12,17	4,67	96,85	89,07	65,24
Sustancia de ensayo	Sustancia de ensayo 5			Sustancia de ensayo 6		
Dosis [nmol/L]	30	10	3	30	10	
Nivel de ARNm de apob [% tasa de inhibición]	98,55	94,13	74,47	99,16	98,22	

Como es evidente a partir de las Tablas 9 y 10, el conjugado de ácidos nucleicos de la presente invención inhibió la expresión de ARNm del gen apob después de la transferencia a células del hígado primarias de ratón.

Ejemplo de Ensayo 2 Actividad *In vitro* del conjugado de ácidos nucleicos contra ratón

Entre los conjugados de ácidos nucleicos sintetizados en el Ejemplo 9, Ejemplo Comparativo 1 y Ejemplo Comparativo 2, ApoBASO (sustancia de ensayo 1), conjugado de ácidos nucleicos 54 (sustancia de ensayo 2), 52_3'-ApoBASO (sustancia de ensayo 3), 52_5'-ApoBASO (sustancia de ensayo 4), 41_3'-ApoBASO (sustancia de ensayo 5) y 41_5'-ApoBASO (sustancia de ensayo 6) se sometieron cada una a un ensayo de evaluación *in vivo* por el siguiente método. Cada uno de los conjugados de ácidos nucleicos utilizados se diluyó con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) (fabricada por Nacalai Tesque, Inc.) de acuerdo con el ensayo. Después de la aclimatación de los ratones (BALB/cA, obtenidos de CLEA Japan Inc.), se administró cada uno de los conjugados de ácidos nucleicos a 0,75 mg/kg o 0,25 mg/kg a los ratones mediante inyección subcutánea. Para un grupo de control, se administró DPBS solo a los ratones mediante inyección subcutánea. Tres días después de la administración, se recogió suero de las venas temporales superficiales. Luego, los animales fueron sacrificados y los hígados fueron recolectados y crioconservados en nitrógeno líquido. A partir de las muestras de hígado crioconservadas, se recuperó el ARN total utilizando Reactivos de Aislamiento de ARN TRIzol(R) (fabricados por Life Technologies Corp., N° de Catálogo 15596026) y RNeasy Mini Kit (fabricado por Qiagen N.V., N° de Catálogo 74106) de acuerdo con los métodos descritos en las instrucciones adjuntas a los productos. ADNc se preparó adicionalmente mediante una reacción de transcripción inversa con el ARN total obtenido como molde utilizando el kit de síntesis de ADNc Transcriptor First Strand (fabricado por F. Hoffmann-La Roche, Ltd., N° de Catálogo 04897030001) de acuerdo con el método descrito en las instrucciones adjuntas al producto.

El ADNc obtenido se utilizó como molde en la reacción de PCR utilizando la Sonda de Ensayo de Expresión Génica TaqMan(R) (fabricada por Applied Biosystems, Inc.) como una sonda y el Sistema de PCR en Tiempo Real QuantStudio 12K Flex (fabricado por Applied Biosystems, Inc.) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones adjunto para amplificar el gen apob y el gen gapdh. Se midieron sus respectivos niveles de amplificación de ARNm, y se calculó

el valor semicuantitativo de ARNm de apob con el nivel de amplificación de ARNm de gapdh como control interno. La tasa de expresión de ARNm de apob se determinó a partir del valor semi-cuantitativo de ARNm de apob cuando el valor semicuantitativo de ARNm de apob en el grupo de control medido de la misma manera que antes se definió como 1. También, una concentración de colesterol total en el suero se midió utilizando LabAssay Cholesterol (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., N° de Catálogo 294-65801) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. La tasa de inhibición obtenida de la expresión de ARNm de apob y la concentración de colesterol total en el suero se muestran en las Tablas 11 y 12.

Tabla 11

Sustancia de ensayo	Sustancia de ensayo 1	Sustancia de ensayo 2	Sustancia de ensayo 3	Sustancia de ensayo 4	Control
Dosis [mg/kg]	0,75	0,75	0,75	0,75	-
Nivel de ARNm de apob en hígado [% tasa de inhibición]	56,46	94,07	90,21	97,74	-
Concentración total de colesterol en suero [mg/dL]	83,36	45,37	48,98	41,70	116,06

Tabla 12

Sustancia de ensayo	Sustancia de ensayo 1		Sustancia de ensayo 2		Control
Dosis [mg/kg]	0,75	0,25	0,75	0,25	-
Nivel de ARNm de apob en hígado [% tasa de inhibición]	75,28	24,23	95,78	74,39	-
Concentración total de colesterol en suero [mg/dL]	95,68	100,35	46,45	102,85	98,53
Sustancia de ensayo	Sustancia de ensayo 5		Sustancia de ensayo 6		
Dosis [mg/kg]	0,75	0,25	0,75	0,25	
Nivel de ARNm de apob en hígado [% tasa de inhibición]	98,12	82,10	99,27	96,05	
Concentración total de colesterol en suero [mg/dL]	34,61	61,55	25,24	39,65	

Como es evidente a partir de las Tablas 11 y 12, el conjugado de ácidos nucleicos de la presente invención (sustancias de ensayo 5 y 6) redujo la expresión del gen apob y disminuyó la concentración de colesterol total en sangre *in vivo*.

Ejemplo de Ensayo 3 Actividad *In vitro* del conjugado de ácidos nucleicos contra la célula primaria del hígado de ratón

Entre los conjugados de ácidos nucleicos obtenidos en el Ejemplo 9 y el Ejemplo Comparativo 1, 53_3'-AT3-ARNip (sustancia de ensayo 7) y 42_3'-AT3-ARNip (sustancia de ensayo 8) se transfirieron cada uno a células de hígado primarias de ratón derivadas de CD-1 (fabricadas por Life Technologies Corp., N° Catálogo MSCP10) mediante el siguiente método.

Cada uno de los conjugados de ácidos nucleicos diluido con Opti-MEM (Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc., 31985) de manera que la concentración final fuera de 300, 100 o 30 nmol/L se dispensó a razón de 20 µL/pocillo a una placa de cultivo de 96 pocillos. A continuación, se inocularon células primarias del hígado de ratón suspendidas en Medio E de William (fabricado por Life Technologies Corp., N° de catálogo A12176-01) que contenía Complementos de Descongelación y Recubrimiento de Hepatocitos Primarios (fabricado por Life Technologies Corp., N° de Catálogo CM3000) a 12500 células/80µL/pocillo a la misma y se cultivaron a 37°C durante 6 horas bajo condiciones de 5% de CO₂. A continuación, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante del cultivo y se añadió a ello medio E de William que contenía Complementos de Descongelación y Recubrimiento de Hepatocitos Primarios (fabricado por Life Technologies Corp., N° de Catálogo CM4000). Las células no tratadas se inocularon como un grupo de control negativo.

Las células que albergan cada una de las preparaciones se cultivaron a 37°C durante 18 horas en una incubadora a 5% de CO₂ y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato enfriada con hielo. La recuperación de ARN total y la preparación de ADNc a través de la reacción de transcripción inversa utilizando el ARN total obtenido como molde se realizaron utilizando el kit SuperPrep Cell Lysis & RT para qPCR (fabricado por Toyobo Co., Ltd., número de catálogo SCQ-201) de acuerdo con el método descrito en las instrucciones adjuntas al producto.

El ADNc obtenido se utilizó como molde en la reacción PCR utilizando la Sonda de Ensayo de Expresión Génica TaqMan(R) (fabricada por Applied Biosystems, Inc.) como una sonda y el Sistema de PCR en Tiempo Real QuantStudio 12K Flex (fabricado por Applied Biosystems, Inc.) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones adjunto para amplificar el inhibidor de la peptidasa de serpina, clado C (antitrombina), gen del miembro 1 (también denominado antitrombina III; en lo sucesivo, AT3) y un gen expresado constitutivamente D-gliceraldehído-3-fosfato gen de la deshidrogenasa (en lo sucesivo, gapdh). Se midieron sus respectivos niveles de amplificación de ARNm, y se calculó el valor semi-cuantitativo de ARNm de AT3 con el nivel de amplificación de ARNm de gapdh como control interno. La tasa de expresión de ARNm de AT3 se determinó a partir del valor semi-cuantitativo de ARNm de AT3 cuando el valor semi-cuantitativo de ARNm de AT3 en el control negativo medido de la misma manera que antes se definió como 1. Los resultados obtenidos sobre la tasa de expresión de ARNm de AT3 se muestran en la Tabla 13 como una tasa de inhibición frente a la tasa de expresión de ARNm de AT3 del control negativo.

Tabla 13

Sustancia de ensayo	Sustancia de ensayo 7			Sustancia de ensayo 8		
Dosis [nmol/L]	300	100	30	300	100	30
Nivel de ARNm de AT3 [% tasa de inhibición]	11,906	3,0612	-6,657	94,428	92,451	88,378

Como es evidente a partir de la Tabla 13, el conjugado de ácidos nucleicos de la presente invención (sustancia de ensayo 8) inhibió la expresión de ARNm del gen AT3 después de la transferencia a células del hígado primarias de ratón.

Ejemplo de Ensayo 4 Actividad *In vitro* del conjugado de ácidos nucleicos contra ratón

Entre los conjugados de ácidos nucleicos obtenidos en el Ejemplo 9 y el Ejemplo Comparativo 1, 53_3'-AT3-ARNip (sustancia de ensayo 7) y 42_3'-AT3-ARNip (sustancia de ensayo 8) se sometieron cada uno a un test de evaluación *in vivo* mediante el siguiente método. Cada uno de los conjugados de ácidos nucleicos utilizados se diluyó con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) (fabricada por Nacalai Tesque, Inc.) de acuerdo con el ensayo. Después de la aclimatación de los ratones (BALB/cA, obtenidos de CLEA Japan Inc.), se administró cada uno de los conjugados de ácidos nucleicos a 1,5 mg/kg o 0,5 mg/kg a los ratones mediante inyección subcutánea. Para un grupo de control, se administró PBS solo a los ratones mediante inyección subcutánea. Tres días después de la administración, se extrajo sangre de la vena poscava bajo anestesia con isoflurano. La sangre recogida se mezcló con una solución anticoagulante que contenía citrato de sodio 3,2 M y D-glucosa 5 mmol/L en una relación de volumen de 9:1, y se recuperó un sobrenadante después de la centrifugación para obtener plasma. Después de la recogida de sangre, los animales fueron sacrificados y los hígados fueron recolectados y crioconservados en nitrógeno líquido. A partir de las muestras de hígado crioconservadas, se recuperó el ARN total utilizando Reactivos de Aislamiento de ARN TRIzol(R) (fabricados por Life Technologies Corp., N° de Catálogo 15596026) y RNeasy Mini Kit (fabricado por Qiagen N.V., N° de Catálogo 74106) de acuerdo con los métodos descritos en las instrucciones adjuntas a los productos. ADNc se preparó adicionalmente mediante una reacción de transcripción inversa con el ARN total obtenido como molde utilizando el kit de síntesis de ADNc Transcriptor First Strand (fabricado por F. Hoffmann-La Roche, Ltd., N° de Catálogo 04897030001) de acuerdo con el método descrito en las instrucciones adjuntas al producto.

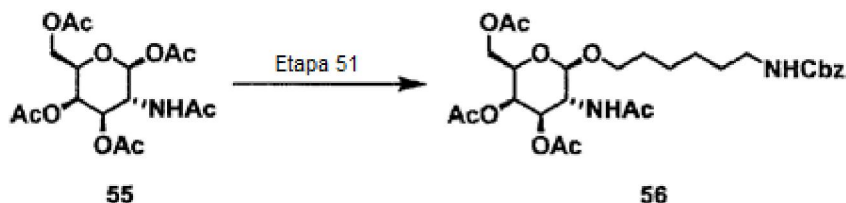
El ADNc obtenido se utilizó como molde en la reacción de PCR utilizando la Sonda de Ensayo de Expresión Génica TaqMan(R) (fabricada por Applied Biosystems, Inc.) como una sonda y el Sistema de PCR en Tiempo Real QuantStudio 12K Flex (fabricado por Applied Biosystems, Inc.) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones adjunto para amplificar el gen AT3 y el gen gapdh. Se midieron sus respectivos niveles de amplificación de ARNm, y se calculó el valor semi-cuantitativo de ARNm de AT3 con el nivel de amplificación de ARNm de AT3 como control interno. La tasa de expresión de ARNm de AT3 se determinó a partir del valor semi-cuantitativo de ARNm de AT3 cuando el valor semi-cuantitativo de ARNm de AT3 en el grupo control medido de la misma manera que antes se definió como 1. Además, una concentración de proteína AT3 en el plasma se midió utilizando el kit ELISA de Ratón Antitrombina III (fabricado por Abcam Inc., N° de Catálogo ab108800) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. La tasa de inhibición obtenida de la expresión de ARNm de AT3 y la concentración de proteína AT3 en el plasma se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14

Sustancia de ensayo	Control	Sustancia de ensayo 7		Sustancia de ensayo 8	
Dosis [mg/kg]	-	1,5	0,5	1,5	0,5
Nivel de ARNm de AT3 en hígado [% tasa de inhibición]	-	-13,90	2,63	47,76	31,37
Concentración de proteína AT3 en plasma [µg/mL]	287,32	263,03	287,42	147,54	235,68

Como es evidente a partir de la Tabla 14, el conjugado de ácidos nucleicos de la presente invención (sustancia de ensayo 8) redujo la expresión del gen AT3 y disminuyó la concentración de proteína AT3 en sangre *in vivo*.

Ejemplo de Referencia 3 Síntesis de unidad de ligando de azúcar Síntesis de compuesto 56

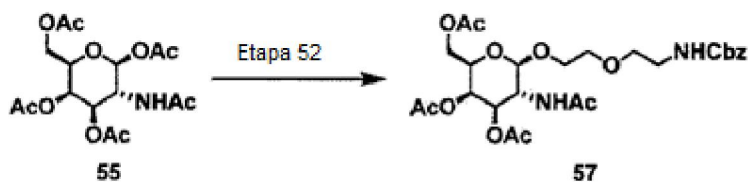


Etapa 51

El compuesto 56 (1,050 g, rendimiento: 50%) se sintetizó a partir del compuesto 55 (1,200 g, 3,640 mmol) mediante el método descrito en Journal of Medicinal Chemistry, vol. 59, págs. 2718-2733, 2016.

ESI-MS m/z: 582 (M + H)⁺

Síntesis de compuesto 57

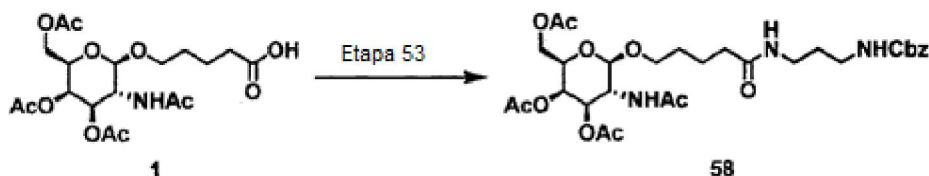


Etapa 52

El compuesto 55 (4,000 g, 10,27 mmol) se disolvió en diclorometano (60 mL). A la solución se añadieron carbamato de bencil-2-(2-hidroxietoxi)etilo (2,700 g, 11,30 mmol) y ácido trifluorometanosulfónico (0,1360 mL, 1,541 mmol) y la mezcla se agitó durante la noche bajo condiciones de reflujo. A la solución de reacción se añadió una solución acuosa de carbonato de potasio al 10% en peso y la mezcla se separó en capas acuosa y orgánica con diclorometano. Luego, la capa orgánica se lavó con agua y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se reemplazó por disolvente con 2-metiltetrahydrofurano y se concentró. El residuo se añadió gota a gota a heptano y los cristales obtenidos se filtraron para obtener el compuesto 57 (5,130 g, rendimiento: 88%).

ESI-MS m/z: 570 (M + H)⁺

Síntesis de compuesto 58

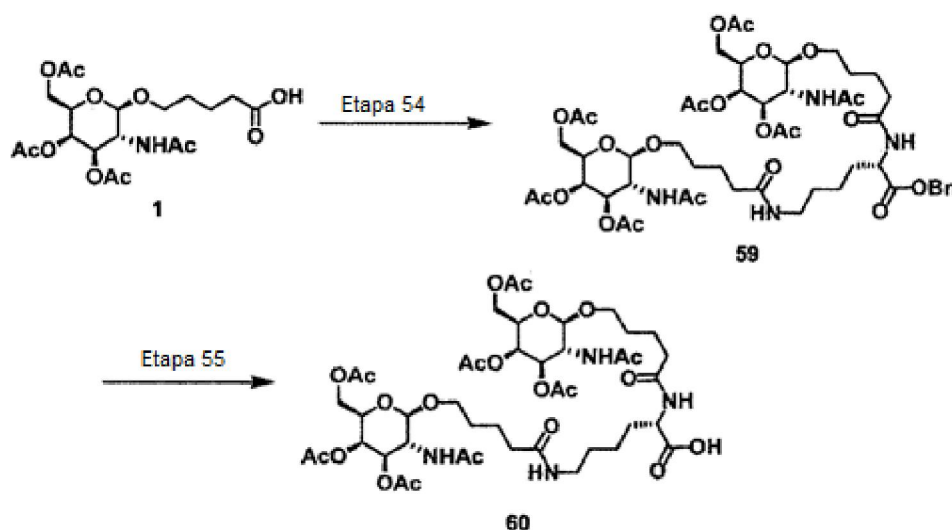


Etapa 53

El compuesto 1 (898,0 mg, 2,007 mmol) descrito en la etapa 1 se disolvió en diclorometano (15 mL). A la solución se añadieron 1-hidroxibenzotriazol monohidrato (338,0 mg, 2,208 mmol), hidrócloruro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (343 mg, 2,208 mmol) e hidrócloruro de N-1-Z-1,3-diaminopropano (0,4910 mL, 2,208 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se añadió agua a la solución de reacción y la mezcla se separó en capas acuosa y orgánica con diclorometano. Luego, la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo/metanol = 90/10) para obtener el compuesto 58 (873,0 mg, rendimiento : 68%).

ESI-MS m/z: 639 (M + H)⁺

Síntesis de compuesto 60



Etapa 54

El compuesto 1 (3,00 g, 6,70 mmol) descrito en la etapa 1 se disolvió en diclorometano (60 mL). A la solución se añadieron di-p-toluenosulfonato de éster bencílico de L-lisina (1,75 g, 3,02 mmol), trietilamina (0,935 mL, 6,70 mmol), hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (1,29 g, 6,70 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol monohidrato (103 mg, 0,670 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 2,5 horas. La solución de reacción se lavó con agua y una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo/metanol = 90/10) para obtener cuantitativamente el compuesto 59.

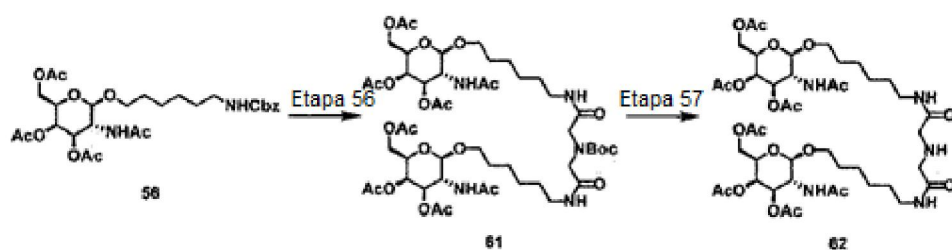
ESI-MS m/z : 1096 ($M + H$)⁺

Etapa 55

El compuesto 59 (2,30 g, 2,10 mmol) sintetizado en la etapa 54 se disolvió en tetrahidrofurano (46 mL). A la solución se añadió un polvo de paladio al 10%-carbono (producto que contiene agua, 54,29%; 424 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante la noche en una atmósfera de hidrógeno. La solución de reacción se filtró y el disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener cuantitativamente el compuesto 60.

ESI-MS m/z : 1006 ($M + H$)⁺

Síntesis de compuesto 62



Etapa 56

Ácido iminodiacético (fabricado por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 1,5 g, 6,43 mmol) se disolvió en cloruro de metileno (30 mL). A la solución se añadieron ácido pentafluorotrifluoroacético (fabricado por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 2,75 mL, 16,08 mmol) y trietilamina (4,48 mL, 32,2 mmol) y la mezcla se agitó durante 4 horas. A la solución de reacción se añadió una solución acuosa de ácido cítrico al 10%, seguido de extracción con cloroformo. Luego, la capa orgánica se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Al residuo se añadió una solución del compuesto 56 (2 g, 3,45 mmol) sintetizado en la etapa 51, disuelto en una solución mixta de acetato de etilo (10 mL) y acetonitrilo (10 mL), seguido de reducción catalítica con hidrógeno utilizando paladio/carbono. El disolvente en la solución obtenida se separó por destilación a presión reducida para obtener un producto bruto del compuesto 61.

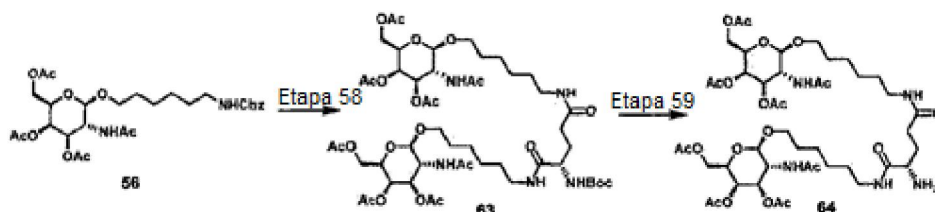
ESI-MS m/z : 1091 ($M + H$)⁺

Etapa 57

El compuesto 62 se obtuvo cuantitativamente de la misma manera que en la etapa 3 del Ejemplo de Referencia 1 utilizando el compuesto 61 (1,5 g, 1,37 mmol) sintetizado en la etapa 56.

ESI-MS m/z: 990 (M + H)⁺

Síntesis de compuesto 64



Etapa 58

Se obtuvo un producto bruto del compuesto 63 de la misma manera que en la etapa 56 del Ejemplo de Referencia 3 utilizando ácido N-(t-butoxicarbonil)-L-glutámico (fabricado por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) y compuesto 56 (1,855 g, 3,19 mmol) sintetizado en la etapa 51.

ESI-MS m/z: 1105 (M + H)⁺

Etapa 59

El compuesto 64 se obtuvo cuantitativamente de la misma manera que en la etapa 3 del Ejemplo de Referencia 1 utilizando el compuesto 63 (1,421 g, 1,2866 mmol) sintetizado en la etapa 58. EST-MS m/z: 1004 (M + H)⁺

Ejemplo de Referencia 4 Síntesis de unidad de ramificador

Síntesis de compuesto 66



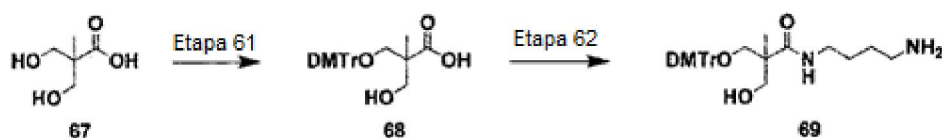
Etapa 60

El compuesto 65 (90 mg, 0,173 mmol), sintetizado mediante el método descrito en Journal of Organic Chemistry, Vol. 74, págs. 6837-6842, 2009 se disolvió en tetrahidrofurano (1 mL). A la solución se añadió trifenilfosfina soportada en polímero (fabricada por Sigma-Aldrich Co. LLC, 63 mg, 0,189 mmol) y la mezcla se agitó durante 3 horas bajo calentamiento a reflujo. La solución de reacción se filtró y el disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener compuesto 66 (70 mg, rendimiento: 82%).

ESI-MS m/z: 516 (M+Na)⁺

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 0,89 (3H, s), 1,42-1,48 (2H, m), 1,52-1,61 (2H, m), 1,85 (1H, s a), 2,68 (2H, t, J = 7,2 Hz), 3,06-3,07 (2H, m), 3,39-3,44 (3H, m), 3,51-3,55 (3H, m), 3,78 (6H, s), 6,80-6,85 (4H, m), 7,17-7,23 (1H, m), 7,27-7,33 (6H, m), 7,41-7,43 (2H, m).

Síntesis de compuesto 69



Etapa 61

Se obtuvo un producto bruto del compuesto 68 (1,5 g) de la misma manera que en la etapa 4 del Ejemplo de Referencia 2 utilizando el compuesto 67 (fabricado por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 0,500 g, 3,73 mmol).

ESI-MS m/z: 435 (M - H)⁻

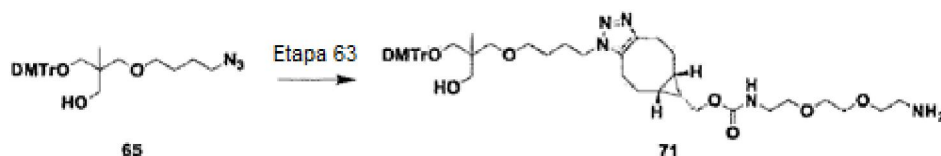
Etapa 62

El compuesto 69 (0,18 g, rendimiento en 2 etapas: 10%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 8 del Ejemplo 1 utilizando un producto bruto del compuesto 68 (1,5 g) sintetizado en la etapa 61 y 1,4-diaminobutano (fabricado por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 3,29 g, 37,3 mmol).

ESI-MS m/z: 551 (M+HCOO)⁻

^1H -RMN (400 MHz, MeOD) : δ 1,09 (3H, s), 1,45-1,52 (4H, m), 2,80 (2H, t, $J = 7,2$ Hz), 2,91 (2H, s), 3,05 (1H, d, $J = 8,8$ Hz), 3,12-3,16 (4H, m), 3,24 (1H, s), 3,43 (1H, d, $J = 10,8$ Hz), 3,62-3,66 (7H, m), 6,71-6,76 (4H, m), 7,05-7,11 (1H, m), 7,12-7,20 (6H, m), 7,28-7,32 (2H, m).

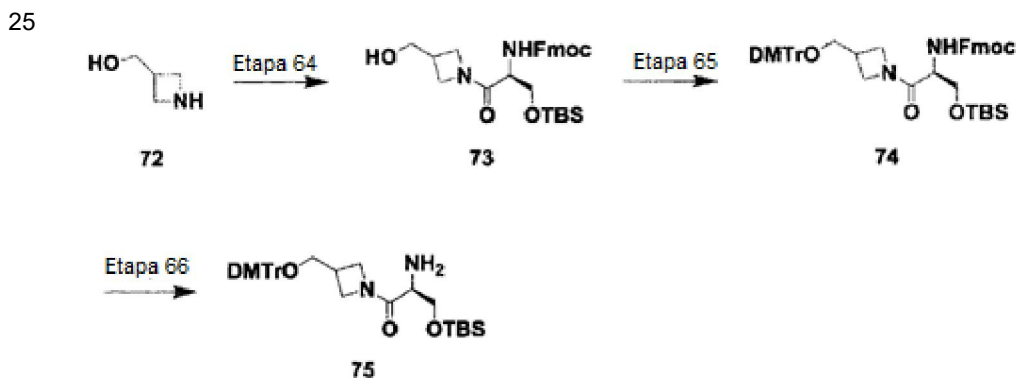
5 Síntesis de compuesto 71



Etapa 63

- El compuesto 65 (110 mg, 0,212 mmol), sintetizado mediante el método descrito en Journal of Organic Chemistry, Vol. 74, págs. 6837-6842, 2009 se disolvió en tetrahidrofurano (2 mL). A la solución se añadió N-(1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetiloxicarbonil-1,8-diamino-3,6-dioxaoctano (fabricado por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 72 mg, 0,222 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió agua a la solución de reacción, seguido de extracción con cloroformo. Luego, la capa orgánica se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo/metanol = 90/10) para obtener el compuesto 71 (160 mg, rendimiento: 90%). ESI-MS m/z : 845 ($M+H$)⁺
- ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) : δ 0,88 (3H, s), 0,91-1,09 (3H, m), 1,20-1,25 (1H, m), 1,52-1,59 (4H, m), 1,80-1,85 (2H, m), 2,19-2,25 (4H, m), 2,59-2,68 (1H, m), 2,84-2,90 (4H, m), 3,02-3,11 (3H, m), 3,35-3,44 (5H, m), 3,49-3,53 (5H, m), 3,54-3,58 (2H, m), 3,62 (5H, s), 3,78 (6H, s), 4,13 (2H, d, $J = 6,4$ Hz), 4,21 (2H, t, $J = 7,2$ Hz), 6,79-6,84 (4H, m), 7,18-7,21 (1H, m), 7,24-7,27 (2H, m), 7,28-7,32 (4H, m), 7,39-7,44 (2H, m).

Síntesis de compuesto 75



Etapa 64

- El compuesto 73 (410 mg, rendimiento: 70%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 8 del Ejemplo 1 utilizando el compuesto 72 (fabricado por AstaTech Inc., 100 mg, 1,148 mmol) y Fmoc-Ser(tBuMe2Si)-OH (fabricado por Watanabe Chemical Industries, Ltd., 532 mg, 1,205 mmol). ESI-MS m/z : 511 ($M+H$)⁺
- ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) : δ 0,06 (6H, s), 0,90 (9H, s), 2,76-2,85 (1H, m), 3,65-3,86 (5H, m), 4,02-4,23 (3H, m), 4,32-4,40 (4H, m), 5,55 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 7,31 (2H, t, $J = 7,6$ Hz), 7,40 (2H, t, $J = 7,6$ Hz), 7,59 (2H, d, $J = 7,6$ Hz), 7,76 (2H, d, $J = 7,6$ Hz).

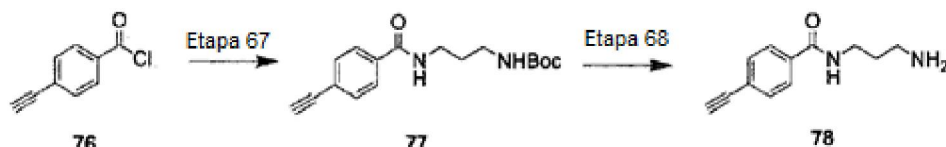
Etapa 65

- Un producto bruto del compuesto 74 (680 mg) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 4 del Ejemplo de Referencia 2 utilizando el compuesto 73 (410 mg, 0,803 mmol) sintetizado en la etapa 64. ESI-MS m/z : 814 ($M + H$)⁺

Etapa 66

- El compuesto 75 (330 mg, rendimiento en 2 etapas: 70%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 5 del Ejemplo de Referencia 2 utilizando un producto bruto del compuesto 74 (680 mg) sintetizado en la etapa 65. ESI-MS m/z : 519 ($M+H$)⁺
- ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) : δ 0,02-0,09 (6H, m), 0,89 (9H, d, $J = 28,8$ Hz), 2,84-2,94 (1H, m), 3,24-3,30 (2H, m), 3,46 (1H, t, $J = 7,2$ Hz), 3,52-3,68 (2H, m), 3,75-3,80 (1H, m), 3,82 (6H, d, $J = 2,4$ Hz), 3,89-3,96 (1H, m), 4,05-4,17 (1H, m), 4,27-4,37 (1H, m), 6,82-6,89 (4H, m), 7,22-7,27 (1H, m), 7,29-7,34 (6H, m), 7,41-7,45 (2H, m)

Síntesis de compuesto 78



Etapa 67

N-(terc.-butoxicarbonil)-1,3-diaminopropano (fabricado por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 1,788 g, 10,26 mmol) se disolvió en diclorometano (22,8 mL). A la solución se añadió trietilamina (1,907 mL, 13,68 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Una solución del compuesto 76 (1,126 g, 6,84 mmol) sintetizada por el método descrito en Organic Letter, Vol. 16, págs. 6318-6321, 2014 en diclorometano (5 mL) se añadió gota a gota a la solución de reacción y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió agua a la solución de reacción, seguido de extracción con cloroformo. Luego, la capa orgánica se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/acetato de etilo = 35/65) para obtener el compuesto 77 (1,65 g, rendimiento: 80%).

ESI-MS m/z: 303 (M + H)⁺

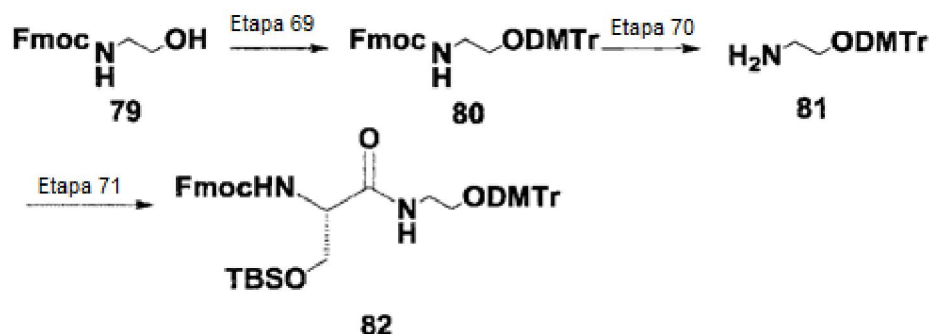
Etapa 68

El compuesto 78 (1,10 g, rendimiento: 100%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 3 del Ejemplo de Referencia 1 utilizando el compuesto 77 (1,65 g, 5,46 mmol) sintetizado en la etapa 67.

ESI-MS m/z: 203 (M+H)⁺

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) : δ 1,74 (2H, dt, J = 12,0, 6,0 Hz), 2,95 (2H, t, J = 6,0 Hz), 3,18 (1H, s), 3,60 (2H, td, J = 6,0, 5,2 Hz), 7,54 (2H, dt, J = 8,4, 1,8 Hz), 7,76 (2H, dt, J = 8,4, 1,8 Hz), 7,97 (1H, s a).

Síntesis de compuesto 82



Etapa 69

Se obtuvo un producto bruto del compuesto 79 de la misma manera que en la etapa 4 del Ejemplo de Referencia 2 utilizando el compuesto 79 (fabricado por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 1,2 g, 4,24 mmol).

ESI-MS m/z: 608 (M + Na)⁺

Etapa 70

El compuesto 81 (1,34 g, rendimiento en 2 etapas: 52%) se obtuvo mediante el método descrito en la etapa 5 del Ejemplo de Referencia 2 o en la etapa 11 del Ejemplo 1 utilizando un producto bruto del compuesto 80 sintetizado en la etapa 69.

ESI-MS m/z: 386(M+Na)⁺

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) : δ 3,34 (2H, t, J = 6,4 Hz), 3,47 (2H, t, J = 6,4 Hz), 3,79 (6H, s), 6,78-6,84 (4H, m), 7,17-7,21 (1H, m), 7,27-7,35 (6H, m), 7,42-7,46 (2H, m).

Etapa 71

El compuesto 82 (560 mg, rendimiento: 31%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 8 del Ejemplo 1 utilizando el compuesto 81 (1,15 g, 3,16 mmol) sintetizado en el etapa 70 y Fmoc-Ser(tBuMe₂Si)-OH (fabricado por Watanabe Chemical Industries, Ltd., 1,677 g, 3,8 mmol).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 0,00-0,07 (6H, m), 0,83-0,89 (9H, m), 3,18-3,26 (2H, m), 3,39-3,46 (2H, m), 3,61-3,68 (1H, m), 3,76 (6H, s), 3,89 (1H, dd, J = 10,0, 4,0 Hz), 4,03 (1H, dd, J = 10,0, 4,0 Hz), 4,15-4,20 (1H, m), 4,22-4,28 (1H, m),

4,32-4,40 (2H, m), 5,65-5,88 (1H, m), 6,76-6,85 (4H, m), 7,16-7,23 (1H, m), 7,25-7,34 (8H, m), 7,36-7,44 (4H, m), 7,50-7,64 (2H, m), 7,72-7,79 (2H, m).

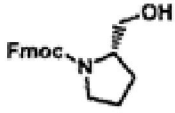
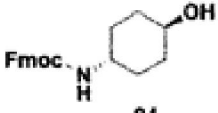
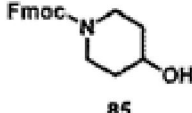
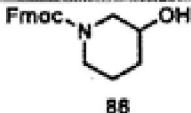
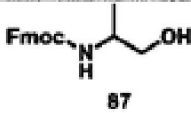
Síntesis de compuestos 88 a 94

5

Los compuestos descritos en la Tabla 16 se obtuvieron de la misma manera que en los etapas 69 a 71 utilizando los compuestos descritos en la Tabla 15 y Fmoc-Ser(tBuMe₂Si)-OH y Fmoc-Thr(tBuMe₂Si)-OH.

Los datos del análisis de RMN sobre los compuestos sintetizados en este Ejemplo se muestran en la Tabla 17.

Tabla 15

		
83	84	85
		
86	87	

10

Tabla 16

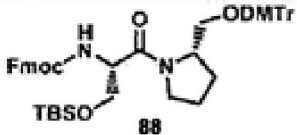
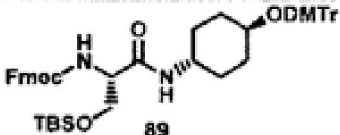
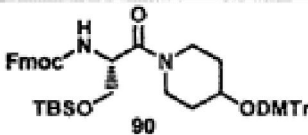
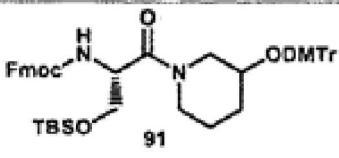
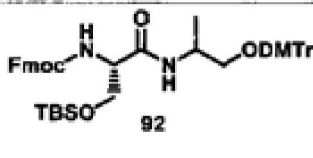
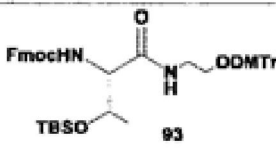
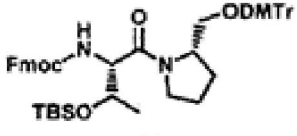
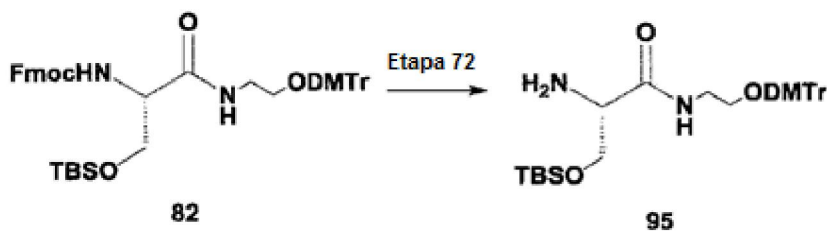
		
88	89	90
		
91	92	93
		
94		

Tabla 17

Compuesto	RMN
88	¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃): δ 0,07-0,03 (6H, m), 0,89-0,87 (9H, m), 2,04-1,65 (4H, m), 3,86-3,58 (11H, m), 4,37-4,18 (4H, m), 4,69-4,68 (1H, m), 5,67-5,65 (1H, m), 6,84-6,80 (4H, m), 7,18-7,16 (3H, m), 7,33-7,25 (7H, m), 7,42-7,38 (3H, m), 7,60-7,58 (2H, m), 7,78-7,75 (2H, m).
89	¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃): δ 0,11-0,05 (6H, m), 0,91-0,87 (9H, m), 1,43-1,19 (4H, m), 2,00-1,80 (3H, m), 3,74-3,36 (2H, m), 3,81-3,75 (6H, m), 4,41-3,96 (5H, m), 5,71-5,64 (1H, m), 6,37-6,36 (1H, m), 6,84-6,80 (4H, m), 7,20-7,16 (2H, m), 7,42-7,25 (1H, m), 7,59-7,48 (3H, m), 7,78-7,75 (2H, m).
90	¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃): δ 0,08-0,03 (6H, m), 0,98-0,81 (9H, m), 1,20-1,07 (2H, m), 1,39-1,30 (2H, m), 1,42-1,40 (1H, m), 1,71-1,50 (2H, m), 3,36-3,14 (1H, m), 3,73-3,60 (3H, m), 3,80-3,77 (6H, m), 4,33-4,18 (1H, m), 4,35-4,34 (2H, m), 4,78-4,77 (1H, m), 5,75-5,74 (1H, m), 6,83-6,81 (4H, m), 7,35-7,26 (5H, m), 7,39-7,37 (6H, m), 7,50-7,48 (2H, m), 7,61-7,57 (2H, m), 7,77-7,74 (2H, m).
91	¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃): δ 0,04-0,00 (6H, m), 0,87-0,80 (9H, m), 1,47-1,11 (3H, m), 1,92-1,61 (1H, m), 4,83-2,99 (16H, m), 5,88-5,72 (1H, m), 6,89-6,82 (4H, m), 7,21-7,14 (1H, m), 7,49-7,28 (12H, m), 7,62-7,59 (2H, m), 7,77-7,75 (2H, m).

Compuesto	RMN
	(Continuación)
92	¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃): δ 0,01-0,05 (6H, m), 0,66-0,92 (9H, m), 1,11-1,12 (3H, m), 3,02-3,06 (1H, m), 3,55-3,62 (1H, m), 3,69-3,75 (6H, m), 3,91-4,35 (6H, m), 5,62 (1H, s), 6,74-6,78 (4H, m), 7,10-7,12 (2H, m), 7,14-7,27 (7H, m), 7,30-7,36 (4H, m), 7,43-7,53 (2H, m), 7,68-7,71 (2H, m).
93	¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃): δ 0,14-0,08 (6H, m), 1,10-0,87 (9H, m), 1,56-1,55 (3H, m), 3,48-3,41 (2H, m), 3,81-3,73 (7H, m), 4,25-4,14 (2H, m), 4,45-4,39 (3H, m), 5,77-5,76 (1H, m), 6,84-6,79 (4H, m), 7,18-7,16 (3H, m), 7,42-7,26 (10H, m), 7,61-7,56 (2H, m), 7,78-7,74 (2H, m).
94	¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃): δ 0,10-0,00 (6H, m), 0,81-0,72 (9H, m), 1,12-1,11 (3H, m), 1,47-1,54 (1H, m), 1,83-1,77 (3H, m), 3,71-3,47 (9H, m), 4,39-4,00 (6H, m), 5,55-5,53 (1H, m), 6,74-6,71 (4H, m), 7,08-7,06 (3H, m), 7,32-7,16 (10H, m), 7,52-7,48 (2H, m), 7,67-7,65 (2H, m).

Síntesis de compuesto 95



Etapa 72

El compuesto 95 (1,2 g, rendimiento: 67%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 5 del Ejemplo de Referencia 2 utilizando el compuesto 82 (2,487 g, 3,16 mmol) sintetizado en la etapa 71.

ESI-MS m/z: 587(M+Na)⁺

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ -0,01-0,07 (6H, m), 0,86-0,90 (9H, m), 3,15-3,21 (2H, m), 3,41-3,48 (3H, m), 3,72 (1H, dd, J = 10,0, 6,4 Hz), 3,79 (6H, s), 3,84 (1H, dd, J = 10,0, 4,8 Hz), 6,79-6,84 (4H, m), 7,18-7,23 (1H, m), 7,27-7,33 (6H, m), 7,40-7,44 (2H, m), 7,72-7,75 (1H, m a).

Síntesis de compuestos 96 a 102

Los compuestos descritos en la Tabla 18 se obtuvieron de la misma manera que en la etapa 72 utilizando los compuestos descritos en la Tabla 16.

Los resultados de la espectrometría de masas sintetizados en este Ejemplo se muestran en la Tabla 19.

Tabla 18

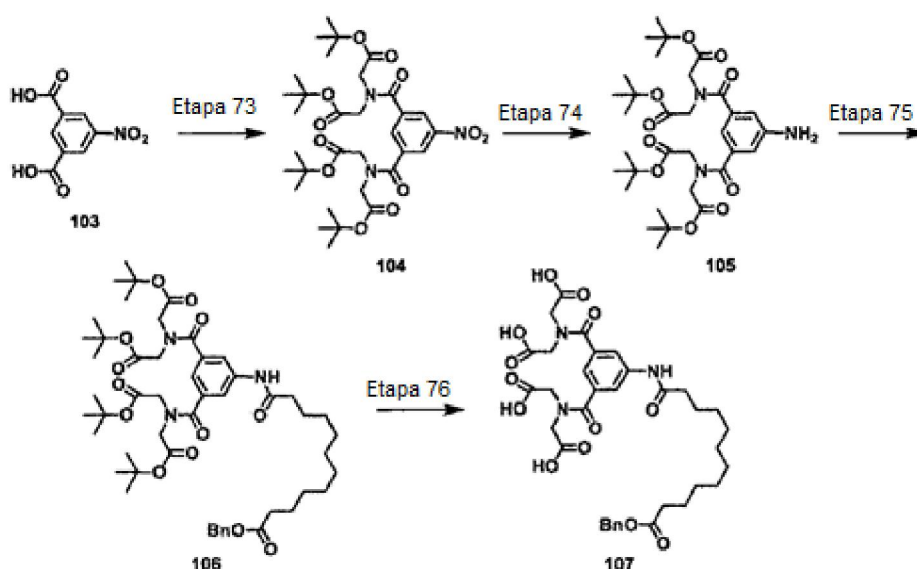
Tabla 19

Compuesto	ESI-MS m/z
96	605(M+H) ⁺
97	619(M+H) ⁺
98	303(M+H) ⁺ , producto desprotegido con DMTr detectado
99	649(M+HCOOH) ⁻
100	577(M-H) ⁻
101	623(M+HCOOH) ⁻
102	317(M+H) ⁺ , producto desprotegido con DMTr detectado

Ejemplo 13 Síntesis de unidad de enlace

Síntesis de compuesto 107

5



Etapa 73

El compuesto 103 (2,00 g, 9,47 mmol) se disolvió en N,N'-dimetilformamida (40 mL). A la solución se añadieron éster di-terc.-butílico del ácido iminodiacético (5,11 g, 20,84 mmol), hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (4,00 g, 20,84 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol monohidrato (145 mg, 0,947 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 2 horas. Se añadió agua a la solución de reacción, seguido de extracción con acetato de etilo. Luego, la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/acetato de etilo = 50/50). El producto purificado se purificó adicionalmente en suspensión con metanol para obtener el compuesto 104 (4,07 g, rendimiento: 65%).
ESI-MS m/z: 664 (M - H)⁻

Etapa 74

El compuesto 104 (2,66 g, 4,00 mmol) sintetizado en la etapa 73 se disolvió en tetrahidrofurano (53 mL). A la solución se añadió un polvo de paladio al 10%-carbono (producto que contiene agua, 54,29%; 490 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 3 horas en una atmósfera de hidrógeno. La solución de reacción se filtró y el disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener compuesto 105 (2,86 g, rendimiento: 113%).
ESI-MS m/z: 634 (M - H)⁻

Etapa 75

El compuesto 105 (871,0 mg, 1,370 mmol), sintetizado en la etapa 74, se disolvió en N,N'-dimetilformamida (17 mL). A la solución se añadieron hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (625,0 mg, 1,644 mmol), diisopropiletilamina (0,5730 ml, 3,290 mmol) y éster monobencílico del ácido dodecanodioico (527,0 mg, 1,644 mmol) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se añadió agua a la solución de reacción, seguido de extracción con acetato de etilo. Luego, la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión

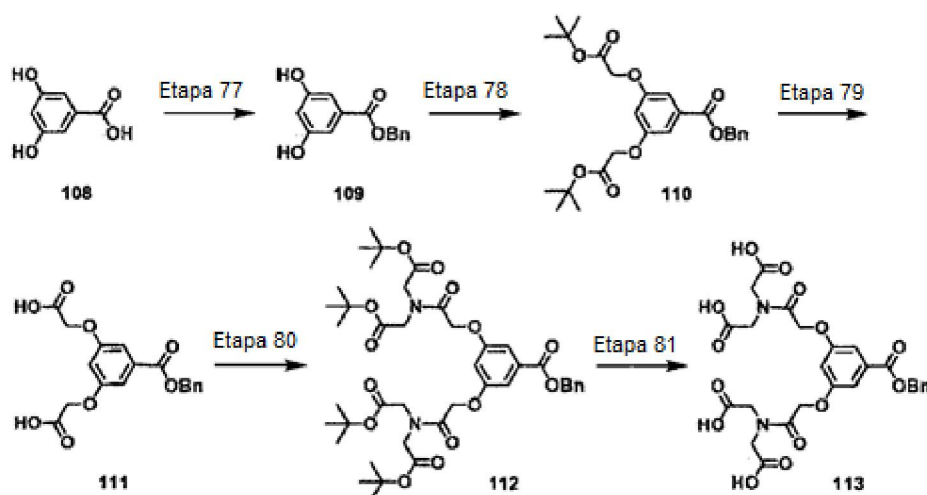
reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/acetato de etilo = 60/40) para obtener el compuesto 106 (1,030 g, rendimiento: 80%).
ESI-MS m/z : 939 ($M + H$)⁺

5 Etapa 76

El compuesto 106 (1,030 g, 1,098 mmol) sintetizado en la etapa 75 se disolvió en diclorometano (10 mL). A la solución se añadió ácido trifluoroacético (10,00 mL, 130,0 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener un producto bruto del compuesto 107.

10 ESI-MS m/z : 713 ($M - H$)⁻

Síntesis de compuesto 113



15 Etapa 77

El compuesto 108 (2,000 g, 12,98 mmol) se disolvió en N,N'-dimetilformamida (30 mL). A la solución se añadieron bicarbonato de potasio (1,559 g, 15,57 mmol) y cloruro de bencilo (2,328 mL, 19,47 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Se añadió cloruro de amonio saturado a la solución de reacción, seguido de extracción con cloroformo. Luego, la capa orgánica se lavó con agua y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/acetato de etilo = 50/50) para obtener el compuesto 109 (2,850 g, rendimiento: 90%).
ESI-MS m/z : 243 ($M - H$)⁻

25 Etapa 78

El compuesto 109 (2,500 g, 10,24 mmol), sintetizado en la etapa 77, se disolvió en N,N'-dimetilformamida (30 mL). A la solución se añadieron carbonato de potasio (5,660 g, 40,90 mmol) y ácido terc.-butil bromoacético (3,300 mL, 22,52 mmol) y la mezcla se agitó a 90°C durante 4 horas. Se añadió cloruro de amonio saturado a la solución de reacción, seguido de extracción con cloroformo. Luego, la capa orgánica se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/acetato de etilo = 75/25) para obtener el compuesto 110 (4,300 g, rendimiento: 89%).
ESI-MS m/z : 472 ($M - H$)⁻

35 Etapa 79

El compuesto 110 (1,000 g, 2,116 mmol) sintetizado en la etapa 78 se disolvió en diclorometano (10 mL). A la solución se añadió ácido trifluoroacético (10,00 mL, 130,0 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. El disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener un producto bruto del compuesto 111.
ESI-MS m/z : 359 ($M - H$)⁻

Etapa 80

El compuesto 111 (350,0 mg, 0,9710 mmol), sintetizado en la etapa 79, se disolvió en N,N'-dimetilformamida (7 mL). A la solución se añadieron 1-hidroxibenzotriazol monohidrato (327,0 mg, 2,137 mmol), hidrócloruro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (410,0 mg, 2,137 mmol) y éster di-terc.-butilico del ácido iminodiacético (524,0 mg, 2,137 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Se añadió agua a la solución de reacción, seguido de extracción con acetato de etilo. Luego, la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se separó por

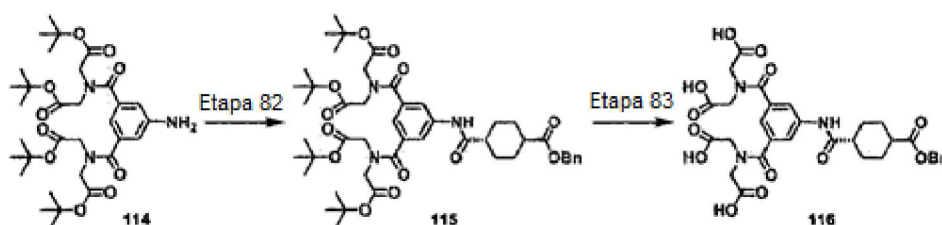
destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/acetato de etilo = 60/40) para obtener el compuesto 112 (617,0 mg, rendimiento: 78%).
ESI-MS m/z : 814 ($M - H$)⁻

5 Etapa 81

El compuesto 112 (610,0 mg, 0,7490 mmol) sintetizado en la etapa 80 se disolvió en diclorometano (6 mL). A la solución se añadió ácido trifluoroacético (6 mL, 78,00 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener un producto bruto del compuesto 113.

10 ESI-MS m/z : 590 ($M + H$)⁺

Síntesis de compuesto 116



15 Etapa 82

El compuesto 114 (474 mg, 0,744 mmol), sintetizado en la etapa 74, se disolvió en N,N'-dimetilformamida (10 mL). A la solución se añadieron éster monobencílico del ácido trans-ciclohexano-1,4-dicarboxílico (0,234 mg, 0,893 mmol), sintetizado por el método descrito en Journal of Medicinal Chemistry, Vol. 54, págs. 2433-2446, 2011, diisopropiletilamina (0,312 mL, 1,79 mmol) y hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (339 mg, 0,893 mmol) y la mezcla se agitó durante 6 horas. Se añadió agua a la solución de reacción, seguido de extracción con acetato de etilo. Luego, la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/acetato de etilo = 50/50) para obtener el compuesto 115 (448 mg, rendimiento: 68%).

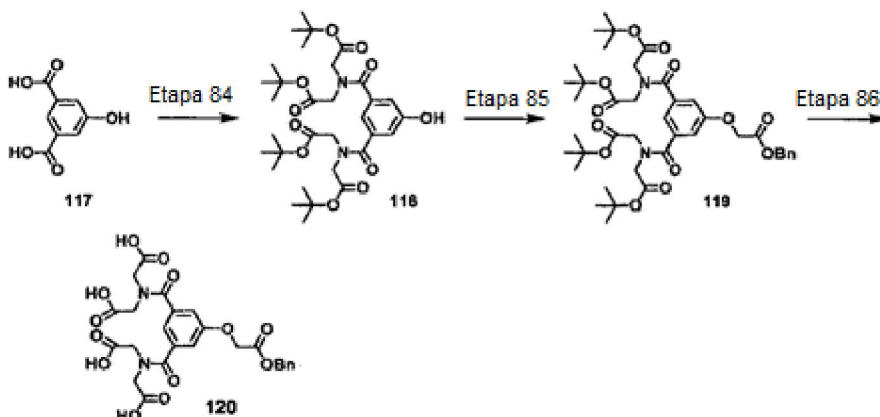
25 ESI-MS m/z : 879 ($M - H$)⁻

Etapa 83

El compuesto 115 (341 mg, 0,387 mmol) sintetizado en la etapa 82 se disolvió en diclorometano (3,4 mL). A la solución se añadió ácido trifluoroacético (3,4 mL) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante la noche. La solución de reacción se concentró a presión reducida y se sometió a azeotropía con acetato de etilo, y el residuo se purificó en suspensión con heptano para obtener el compuesto 116 (254 mg, rendimiento: 100%).

35 ESI-MS m/z : 656 ($M + H$)⁺

Síntesis de compuesto 120



40 Etapa 84

El compuesto 117 (500 mg, 2,75 mmol) se disolvió en N,N'-dimetilformamida (10 mL). A la solución se añadieron éster di-terc.-butílico del ácido iminodiacético (1,48 g, 6,04 mmol), hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (1,16 g, 6,04 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol monohidrato (42,0 mg, 0,275 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó

durante 4 horas. Se añadió agua a la solución de reacción, seguido de extracción con acetato de etilo. Luego, la capa orgánica se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/acetato de etilo = 50/50) para obtener el compuesto 118 (329 mg, rendimiento: 19%).

ESI-MS m/z : 635 ($M - H$)⁻

Etapa 85

El compuesto 118 (323 mg, 0,507 mmol), sintetizado en la etapa 84, se disolvió en N,N'-dimetilformamida (6,5 mL). A la solución se añadieron carbonato de potasio (84,0 mg, 0,609 mmol) y bromoacetato de bencilo (139 mg, 0,609 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 3 horas. Se añadió agua a la solución de reacción, seguido de extracción con acetato de etilo. Luego, la capa orgánica se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/acetato de etilo = 50/50) para obtener el compuesto 119 (313 mg, rendimiento: 79%).

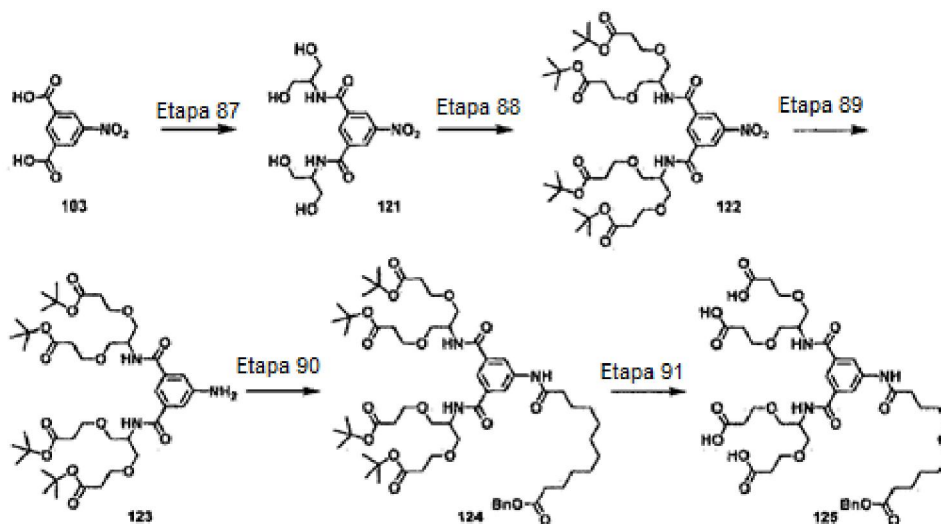
ESI-MS m/z : 783 ($M - H$)⁻

Etapa 86

El compuesto 119 (312 mg, 0,398 mmol) sintetizado en la etapa 85 se disolvió en diclorometano (3,1 mL). A la solución se añadió ácido trifluoroacético (3,1 mL) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante la noche. La solución de reacción se concentró a presión reducida y se sometió a azeotropía con acetato de etilo para obtener el compuesto 120 (252 mg, rendimiento: 113%).

ESI-MS m/z : 561 ($M + H$)⁺

Síntesis de compuesto 125



Etapa 87

El compuesto 103 (2,00 g, 9,47 mmol) se disolvió en N,N'-dimetilformamida (40 mL). A la solución se añadieron 2-amino-1,3-propanodiol (1,90 g, 20,84 mmol), hidrócloruro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (4,00 g, 20,84 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol monohidrato (145 mg, 0,947 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 2 horas. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/metanol = 70/30). El producto purificado se purificó adicionalmente en suspensión con acetato de etilo para obtener el compuesto 121 (2,68 g, rendimiento: 79%).

ESI-MS m/z : 356 ($M - H$)⁻

Etapa 88

El compuesto 121 (500 mg, 1,40 mmol) sintetizado en la etapa 87 se suspendió en acetonitrilo (10 mL). A la suspensión se añadieron éster terc.-butílico del ácido acrílico (3,59 g, 28,0 mmol) e hidróxido de benciltrimetilamonio (solución acuosa al 40%; 1,76 mL, 702 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante la noche. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y se añadió agua al residuo, seguido de extracción con acetato de etilo. Luego, la capa orgánica se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/acetato de etilo = 50/50) para obtener el compuesto 122 (300 mg, rendimiento: 24%).

ESI-MS m/z : 871 ($M + H$)⁺

Etapa 89

El compuesto 122 (340 mg, 0,391 mmol) sintetizado en la etapa 88 se disolvió en tetrahidrofurano (6,8 mL). A la solución se añadió un polvo de paladio al 10%-carbono (producto que contiene agua, 54,29%; 31,3 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 6 horas en una atmósfera de hidrógeno. La solución de reacción se filtró y el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/acetato de etilo = 30/70) para obtener el compuesto 123 (235 mg, rendimiento: 72%).
ESI-MS m/z: 841 (M + H)⁺

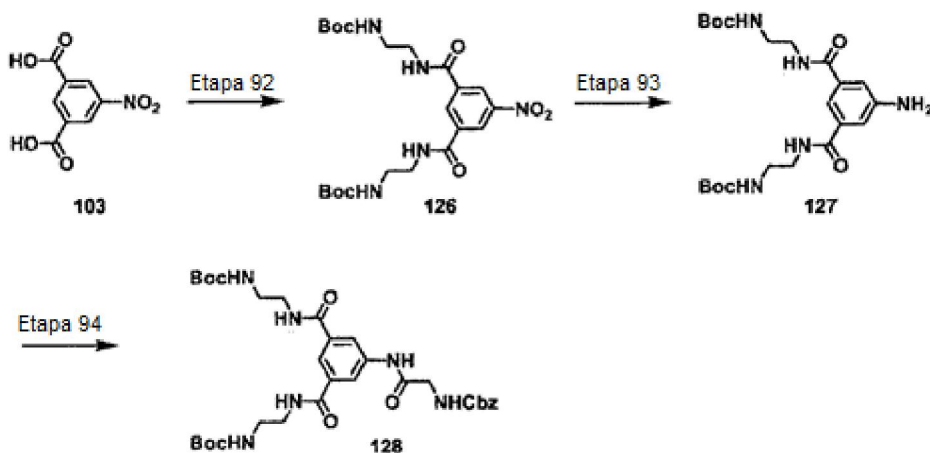
Etapa 90

El compuesto 123 (232 mg, 0,276 mmol), sintetizado en la etapa 89, se disolvió en N,N'-dimetilformamida (4,6 mL). A la solución se añadieron éster monobencílico del ácido dodecanoico (0,133 mg, 0,414 mmol), diisopropiletilamina (0,145 mL, 0,829 mmol) y hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (158 mg, 0,414 mmol) a la temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante la noche. Se añadió agua a la solución de reacción, seguido de extracción con acetato de etilo. Luego, la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/acetato de etilo = 30/70) para obtener el compuesto 124 (274 mg, rendimiento: 87%).
ESI-MS m/z: 1141 (M - H)⁻

Etapa 91

El compuesto 124 (273 mg, 0,239 mmol) sintetizado en la etapa 90 se disolvió en diclorometano (2,7 mL). A la solución se añadió ácido trifluoroacético (2,7 mL) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante la noche. La solución de reacción se concentró a presión reducida y se sometió a azeotropía con acetato de etilo para obtener el compuesto 125 (231 mg, rendimiento: 105%).
ESI-MS m/z: 919 (M + H)⁺

Síntesis de compuesto 128



Etapa 92

Ácido 4-nitroisoftálico 103 (500 mg, 2,37 mmol) y N-Boc-etilendiamina (808 mg, 5,21 mmol) se disolvieron en N,N'-dimetilformamida (10 mL). A la solución se añadieron trietilamina (0,90 mL, 7,11 mmol), 1-hidroxibenzotriazol monohidrato (703 mg, 5,21 mmol) e hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (1,36 g, 7,11 mmol) a la temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 16 horas. La solución de reacción se trató después y el producto bruto y el producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto 126 (650 mg, rendimiento: 55%).

Etapa 93

El compuesto 126 (500 mg, 1,01 mmol), sintetizado en la etapa 92 y polvo de zinc (330 mg, 5,05 mmol) se suspendieron en metanol (3,5 mL) y tetrahidrofurano (3,5 mL). A la suspensión se añadió gota a gota una solución acuosa de cloruro de amonio (378 mg, 7,07 mmol) a 0°C y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La solución de reacción se trató después y el producto bruto y el producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto 127 (160 mg, rendimiento: 34%).

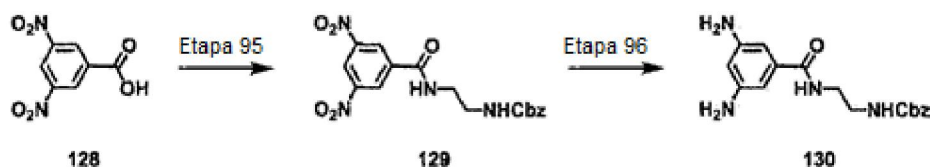
Etapa 94

El compuesto 127 (200 mg, 0,430 mmol), sintetizado en la etapa 93 y N- Cbz-glicina (90,0 mg, 0,430 mmol) se disolvieron en N,N'-dimetilformamida (2,0 mL). A la solución se añadieron diisopropiletilamina (0,220 mL, 1,29 mmol) y hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (245 mg, 0,645 mmol) a la temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 16 horas. La solución de reacción se trató después y el producto bruto y el producto

bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto 128 (180 mg, rendimiento: 64%).

ESI-MS m/z: 657 (M + H)⁺

Síntesis de compuesto 130



Etapa 95

Ácido 3,5-dinitrobenzoico 128 (500 mg, 2,36 mmol) y N-Cbz-etilendiamina (588 mg, 2,83 mmol) se disolvieron en N,N'-dimetilformamida (5,0 mL). A la solución se añadieron trietilamina (0,65 mL, 4,72 mmol), 1-hidroxibenzotriazol monohidrato (380 mg, 2,83 mmol) e hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (675 mg, 3,54 mmol) a la temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 16 horas. La solución de reacción se trató después y el producto bruto y el producto

bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el compuesto 129 (445 mg, rendimiento: 48%).

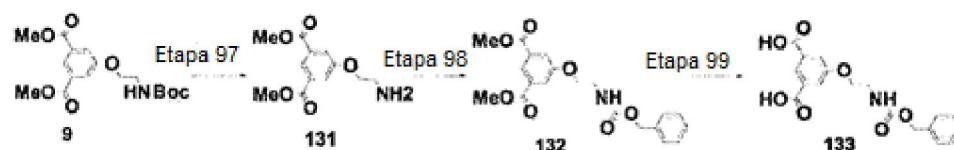
Etapa 96

El compuesto 129 (200 mg, 0,515 mmol) sintetizado en la etapa 95 se disolvió en etanol (5,0 mL). A la solución se añadieron cloruro de tionilo (584 mg, 3,09 mmol) y ácido clorhídrico concentrado (0,2 mL) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó a 80°C durante 16 horas. La solución de reacción se trató posteriormente para obtener el compuesto 130

(180 mg, rendimiento: 106%).

ESI-MS m/z: 329 (M + H)⁺

Síntesis de compuesto 133



Etapa 97

El compuesto 131 (3,7 g, rendimiento: 63%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 9 del Ejemplo 1 utilizando el compuesto 9 (8,17 g, 23,12 mmol) sintetizado en la etapa 6 del Ejemplo 1.

ESI-MS m/z: 254 (M + H)⁺

Etapa 98

El compuesto 132 (3,82 g, rendimiento: 67%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 10 del Ejemplo 1 utilizando el compuesto 131 (3,7 g, 14,63 mmol) obtenido en la etapa 97.

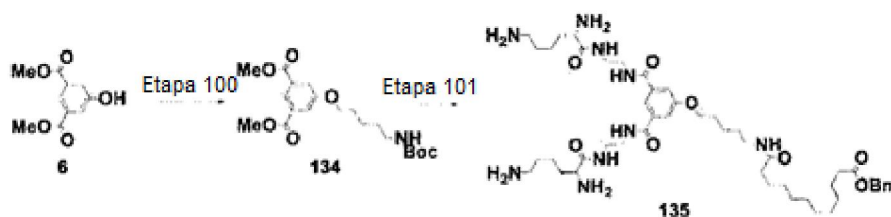
ESI-MS m/z: 432 (M + HCOO)⁻

Etapa 99

El compuesto 133 (3,08 g, rendimiento: 87%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 7 del Ejemplo 1 utilizando el compuesto 132 (3,82 g, 9,86 mmol) obtenido en la etapa 98.

ESI-MS m/z: 360 (M + H)⁺

Síntesis de compuesto 135



Etapa 100

El compuesto 134 (2,40 g, rendimiento: 63%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 6 del Ejemplo 1 utilizando el compuesto 8 (2 g, 9,53 mmol) y (terc.-butoxicarbonilamino)-1-pentanol (fabricado por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 2 g, 10 mmol).

ESI-MS m/z: 296 (M + H)⁺, detectado como una forma Boc-desprotegida

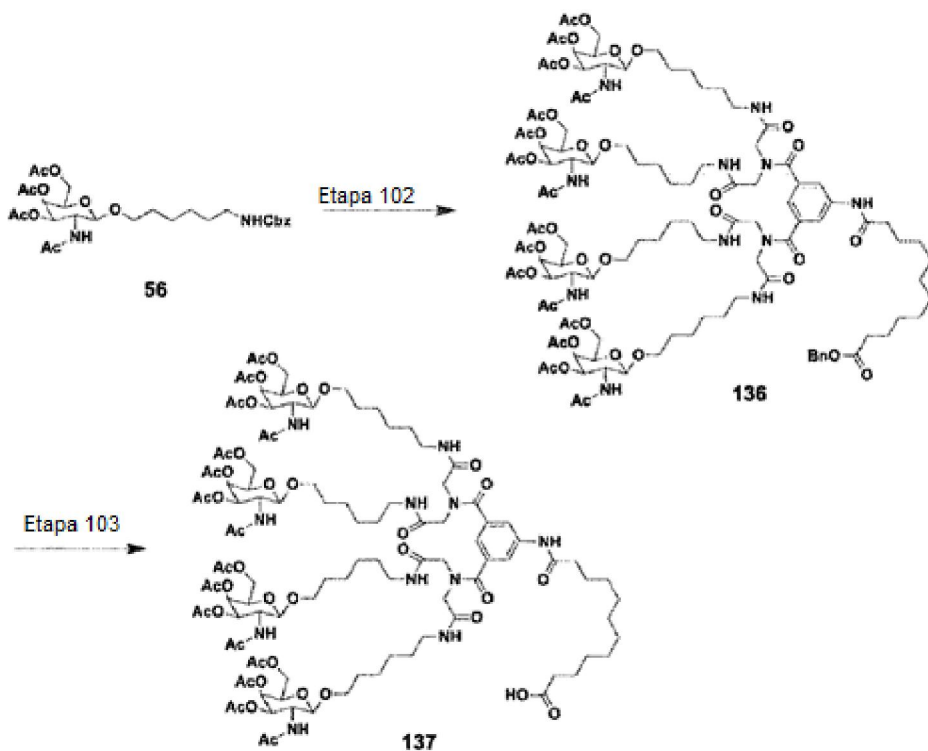
Etapa 101

El compuesto 135 (1,579 g, rendimiento: 21%) se obtuvo de la misma manera que en las etapas 7 a 9 y 14 a 17 del Ejemplo 1 utilizando el compuesto 134 sintetizado en la etapa 100.

ESI-MS m/z: 910 (M + H)⁺

Ejemplo 14 Síntesis de unidad de ligando de azúcar-enlace

Síntesis de compuesto 137



Etapa 102

El compuesto 56 (1,015 g, 1,748 mmol), sintetizado en la etapa 51, se disolvió en N,N'-dimetilformamida (12 mL). A la solución se añadió un polvo de paladio al 10%-carbono (producto que contiene agua, 54,29%; 187 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 6 horas en una atmósfera de hidrógeno. Se filtró la solución de reacción. El compuesto 107 (250,0 mg, 0,350 mmol) sintetizado en la etapa 76, 1-hidroxibenzotriazol monohidrato (26,80 mg, 0,1750 mmol) e hidrocloreto de 1- (3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (402,0 mg, 2,099 mmol) se añadieron al filtrado y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se añadió agua a la solución de reacción, seguido de extracción con acetato de etilo. Luego, la capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y solución salina saturada y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo/metanol = 87/13) para obtener el compuesto 136 (617,0 mg, rendimiento : 88%).

ESI-MS m/z: 1215 (M + 2H)²⁺

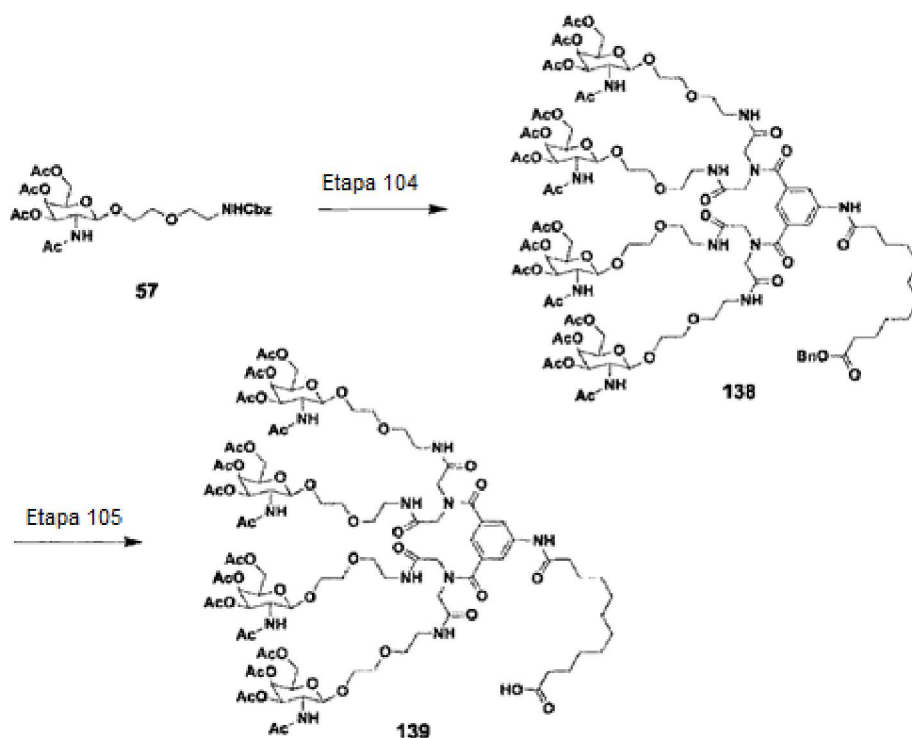
Etapa 103

El compuesto 136 (0,7380 g, 0,3040 mmol) sintetizado en la etapa 102 se disolvió en tetrahidrofurano (7 mL). A la solución se añadió un polvo de paladio al 10%-carbono (producto que contiene agua, 54,29%; 135,90 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante la noche en una atmósfera de hidrógeno. La solución de reacción se filtró y el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo/metanol = 87/13) para obtener el compuesto 137 (581 mg, rendimiento: 82%).

ESI-MS m/z : 1170 ($M + 2H$)²⁺

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ): 1,12-2,36 (106H, m), 2,91-3,19 (8H, m), 3,23-3,55 (14H, m), 3,60-3,76 (4H, m), 3,78-3,94 (8H, m), 3,95-4,10 (16H, m), 4,47 (4H, d, $J = 8,8$ Hz), 4,92-5,01 (4H, m), 5,17-5,24 (4H, m), 6,98 (1H, s), 7,64 (2H, s), 7,81-7,95 (4H, m), 8,28-8,38 (2H, m), 8,44-8,56 (2H, m), 10,13 (1H, s)

Síntesis de compuesto 139



Etapa 104

El compuesto 57 (500 mg, 0,879 mmol), sintetizado en la etapa 52, se disolvió en N,N'-dimetilformamida (6,5 mL). A la solución se añadió un polvo de paladio al 10%-carbono (producto que contiene agua, 54,29%; 94 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 4 horas en una atmósfera de hidrógeno. Se filtró la solución de reacción. El compuesto 107 (126,0 mg, 0,176 mmol) sintetizado en la etapa 76, 1-hidroxibenzotriazol monohidrato (13,47 mg, 0,088 mmol) e hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (202,0 mg, 1,055 mmol) se añadieron al filtrado y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente en la solución de reacción se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de fase inversa (agua/acetonitrilo) para obtener el compuesto 138 (249,7 mg, rendimiento: 60%).

ESI-MS m/z : 1191 ($M + 2H$)²⁺

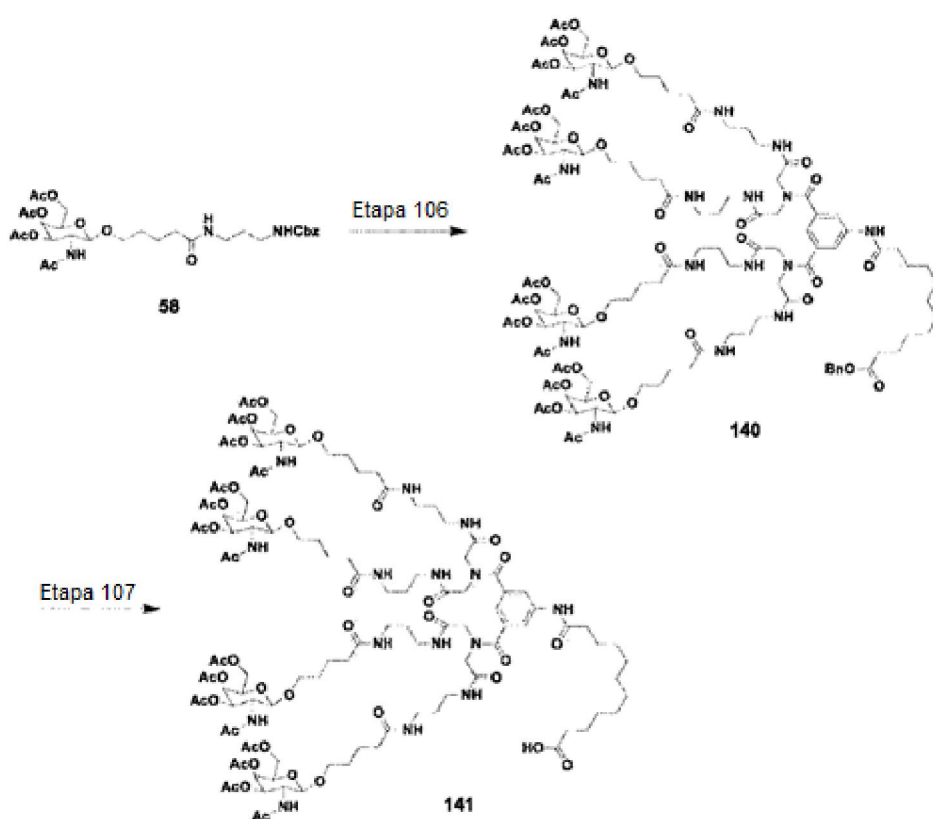
Etapa 105

El compuesto 138 (0,242 g, 0,102 mmol) sintetizado en la etapa 104 se disolvió en tetrahidrofurano (3,6 mL) y agua (1,2 mL). A la solución se añadió un polvo de paladio al 10%-carbono (producto que contiene agua, 54,29%; 45 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 4 horas en una atmósfera de hidrógeno. La solución de reacción se filtró y el disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener compuesto 139 (216 mg, rendimiento: 93%).

ESI-MS m/z : 1146 ($M + 2H$)²⁺

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ): 1,15-1,65 (20H, m), 1,68-2,15 (52H, m), 3,13-3,29 (6H, m), 3,40-3,67 (16H, m), 3,71-3,96 (11H, m), 3,98-4,14 (16H, m), 4,55 (4H, t, $J = 8,8$ Hz), 4,93-5,06 (4H, m), 5,12-5,28 (4H, m), 6,56 (1H, s), 6,98 (1H, s), 7,64 (2H, s), 7,77-7,93 (4H, m), 8,26-8,49 (3H, m), 10,10 (1H, s)

Síntesis de compuesto 141



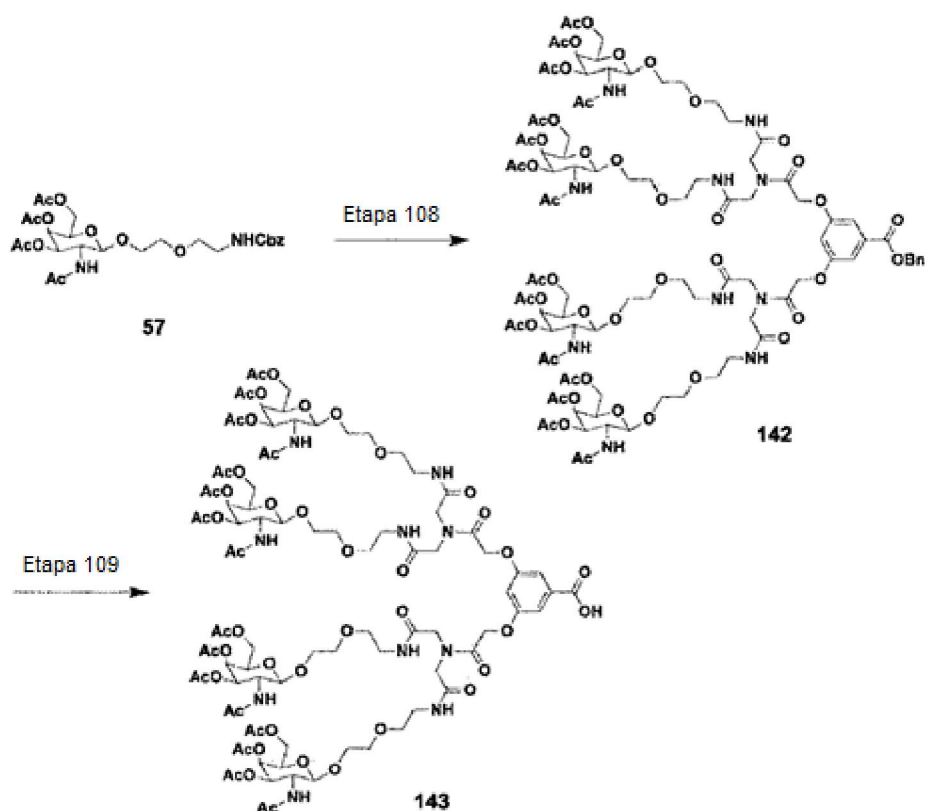
Etapa 106

El compuesto 58 (430 mg, 0,674 mmol), sintetizado en la etapa 53, se disolvió en N,N'-dimetilformamida (6 mL). A la solución se añadió un polvo de paladio al 10%-carbono (producto que contiene agua, 54,29%; 79 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 4 horas en una atmósfera de hidrógeno. Se filtró la solución de reacción. El compuesto 107 (105,0 mg, 0,148 mmol), 1-hidroxibenzotriazol monohidrato (11,31 mg, 0,074 mmol) e hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (170,0 mg, 0,887 mmol) se añadieron al filtrado y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente en la solución de reacción se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de fase inversa (agua/acetonitrilo) para obtener el compuesto 140 (218,1 mg, rendimiento: 56%).
ESI-MS m/z: 1329 (M + 2H)²⁺

Etapa 107

El compuesto 140 (0,210 g, 0,079 mmol) sintetizado en la etapa 106 se disolvió en tetrahidrofurano (3,1 mL) y agua (1,0 mL). A la solución se añadió un polvo de paladio al 10%-carbono (producto que contiene agua, 54,29%; 39 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 4 horas en una atmósfera de hidrógeno. La solución de reacción se filtró y el disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener compuesto 141 (192,7 mg, rendimiento: 95%).
ESI-MS m/z: 1284 (M + 2H)²⁺
1H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ): 1,17-1,65 (42H, m), 1,69-2,13 (61H, m), 2,95-3,17 (16H, m), 3,65-3,77 (3H, m), 3,79-3,94 (6H, m), 3,96-4,10 (16H, m), 4,48 (4H, d, J = 8,4 Hz), 4,96 (4H, dd, J = 2,4, 11,2 Hz), 5,21 (4H, d, J = 3,2 Hz), 7,01 (1H, s), 7,64-7,92 (11H, m), 8,26-8,48 (4H, m), 10,14 (1H, s)

Síntesis de compuesto 143



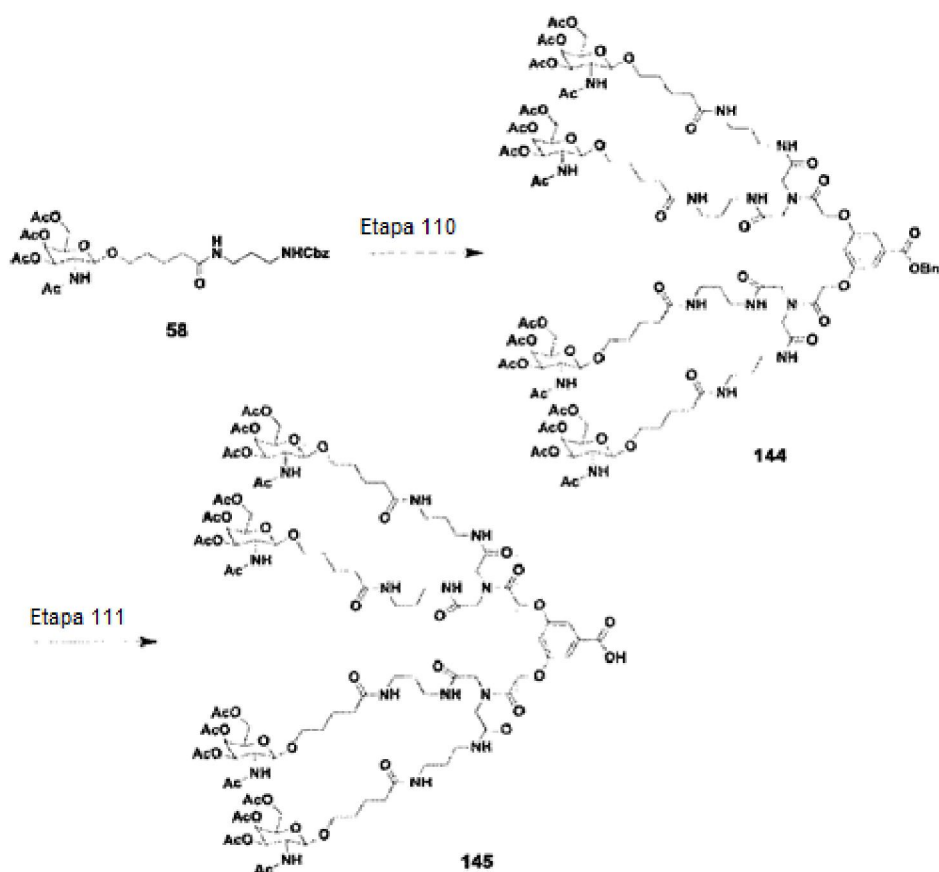
Etapa 108

El compuesto 57 (450 mg, 0,791 mmol), sintetizado en la etapa 52, se disolvió en N,N'-dimetilformamida (6 mL). A la solución se añadió un polvo de paladio al 10%-carbono (producto que contiene agua, 54,29%; 85 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 5 horas en una atmósfera de hidrógeno. Se filtró la solución de reacción. El compuesto 113 (94 mg, 0,158 mmol) sintetizado en la etapa 81, 1-hidroxibenzotriazol monohidrato (133,0 mg, 0,871 mmol) e hidrocloreto de 1- (3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (182,0 mg, 0,950 mmol) se añadieron al filtrado y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente en la solución de reacción se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de fase inversa (agua/acetonitrilo) para obtener el compuesto 142 (99 mg, rendimiento: 28%).
ESI-MS m/z: 1129 (M + 2H)²⁺

Etapa 109

El compuesto 142 (80 mg, 0,035 mmol) sintetizado en la etapa 108 se disolvió en tetrahidrofurano (1,7 mL) y agua (0,85 mL). A la solución se añadió un polvo de paladio al 10%-carbono (producto que contiene agua, 54,29%; 26 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 2 horas en una atmósfera de hidrógeno. La solución de reacción se filtró y el disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener compuesto 143 (57,5 mg, rendimiento: 75%).
ESI-MS m/z: 1084 (M + 2H)²⁺
¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ): 1,69-2,21 (46H, m), 3,14-3,65 (28H, m), 3,67-4,22 (27H, m), 4,43-4,66 (4H, m), 4,69-4,88 (4H, m), 4,89-5,08 (4H, m), 5,12-5,32 (4H, m), 6,54-6,68 (1H, a), 7,01 (2H, s), 7,78-8,09 (3H, m), 8,13-8,31 (2H, m), 8,58-8,75 (2H, m)

Síntesis de compuesto 145



Etapa 110

El compuesto 58 (418 mg, 0,655 mmol), sintetizado en la etapa 53, se disolvió en N,N'-dimetilformamida (6 mL). A la solución se añadió un polvo de paladio al 10%-carbono (producto que contiene agua, 54,29%; 77 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 5 horas en una atmósfera de hidrógeno. Se filtró la solución de reacción. El compuesto 113 (85 mg, 0,144 mmol) sintetizado en la etapa 81, 1-hidroxibenzotriazol monohidrato (121,0 mg, 0,791 mmol) e hidrócloruro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (165,0 mg, 0,863 mmol) se añadieron al filtrado y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente en la solución de reacción se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de fase inversa (agua/acetonitrilo) para obtener el compuesto 144 (99 mg, rendimiento: 28%).
ESI-MS m/z: 1268 (M + 2H)²⁺

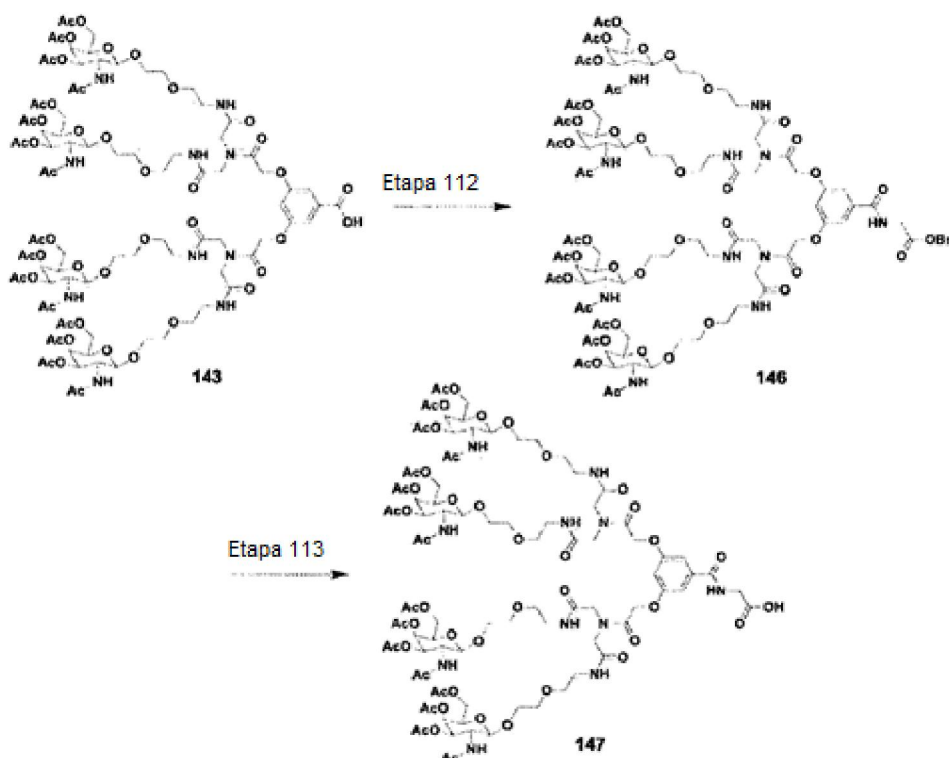
Etapa 111

El compuesto 144 (186 mg, 0,073 mmol) sintetizado en la etapa 110 se disolvió en tetrahidrofurano (2,8 mL) y agua (0,93 mL). A la solución se añadió un polvo de paladio al 10%-carbono (producto que contiene agua, 54,29%; 40 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 2 horas en una atmósfera de hidrógeno. La solución de reacción se filtró y el disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener compuesto 145 (156,7 mg, rendimiento: 87%).

ESI-MS m/z: 1222 (M + 2H)²⁺

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ): 1,36-1,62 (27H, m), 1,67-2,17 (64H, m), 2,92-3,21 (15H, m), 3,58-3,77 (2H, m), 3,80-3,95 (7H, m), 3,97-4,13 (15H, m), 4,47 (4H, d, J = 8,8 Hz), 4,88-5,02 (7H, m), 5,10-5,24 (3H, m), 6,95-7,00 (1H, m), 7,26-7,31 (2H, m), 7,72-7,88 (8H, m), 8,10-8,20 (2H, m), 8,51-8,60 (2H, m)

Síntesis de compuesto 147



Etapa 112

El compuesto 143 (171 mg, 0,079 mmol), sintetizado en la etapa 109, se disolvió en N,N'-dimetilformamida (3,4 mL). A la solución se añadieron p-toluenosulfonato de glicina bencilo (32,0 mg, 0,095 mmol), 1-hidroxibenzotriazol monohidrato (12,09 mg, 0,079 mmol) e hidrocloreuro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (18,16 mg, 0,095 mmol) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente en la solución de reacción se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de fase inversa (agua/acetonitrilo) para obtener el compuesto 146 (55,7 mg, rendimiento: 31%).

ESI-MS m/z: 1158 (M + 2H)²⁺

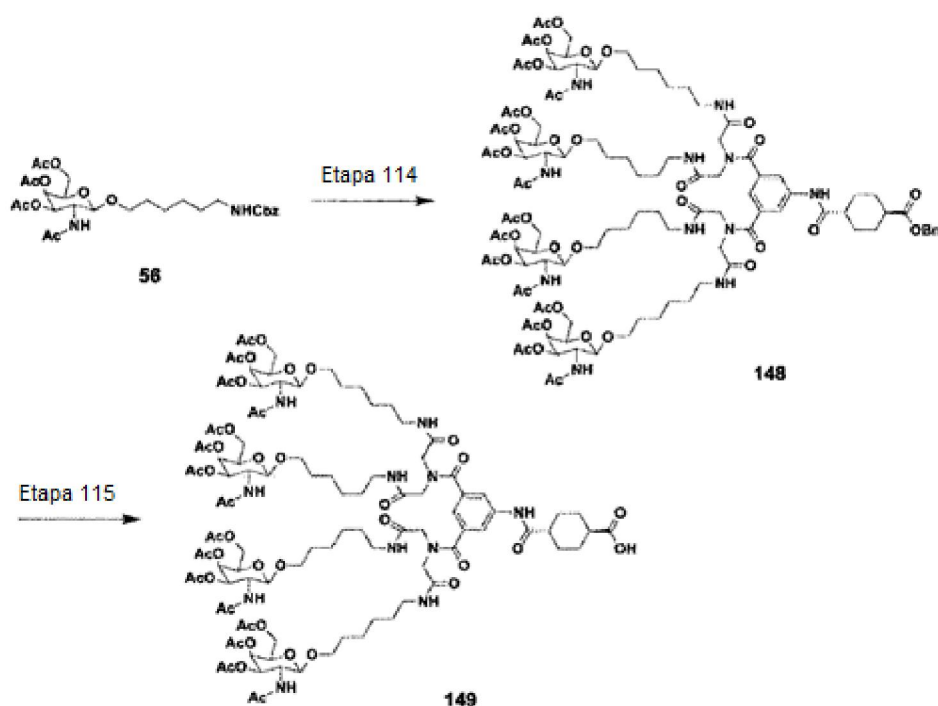
Etapa 113

El compuesto 146 (54 mg, 0,023 mmol) sintetizado en la etapa 112 se disolvió en tetrahidrofurano (0,83 mL) y agua (0,28 mL). A la solución se añadió un polvo de paladio al 10%-carbono (producto que contiene agua, 54,29%; 18 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 2 horas en una atmósfera de hidrógeno. La solución de reacción se filtró y el disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener compuesto 147 (50,1 mg, rendimiento: 97%).

ESI-MS m/z: 1112 (M + 2H)²⁺

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ): 0,96-1,06 (3H, m), 1,71-2,20 (54H, m), 3,41-3,64 (15H, m), 3,68-4,20 (32H), 4,55 (4H, d, J = 8,4 Hz), 4,81 (4H, s), 4,94-5,02 (4H, m), 5,17-5,25 (4H, m), 6,63-6,76 (2H, m), 6,93-7,02 (2H, m), 7,84-8,00 (3H, m), 8,17-8,30 (2H, m), 8,58-8,70 (2H, m)

Síntesis de compuesto 149



Etapa 114

El compuesto 56 (500 mg, 0,861 mmol) se disolvió en N,N'-dimetilformamida (10 mL). A la solución se añadió un polvo de paladio al 10%-carbono (producto que contiene agua, 54,29%; 92,1 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 2 horas en una atmósfera de hidrógeno. A ello se añadieron compuesto 116 (113 mg, 0,172 mmol), hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (198 mg, 1,03 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol monohidrato (13,2 mg, 0,086 mmol) a temperatura ambiente en un atmósfera de argón y la mezcla se agitó durante la noche. La solución de reacción se filtró a través de celite y el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo/metanol = 90/10) y se purificó adicionalmente mediante HPLC preparativa de fase inversa (acetonitrilo/agua) para obtener el compuesto 148 (195 mg, rendimiento: 48%).

ESI-MS m/z: 1186 (M + 2H)²⁺

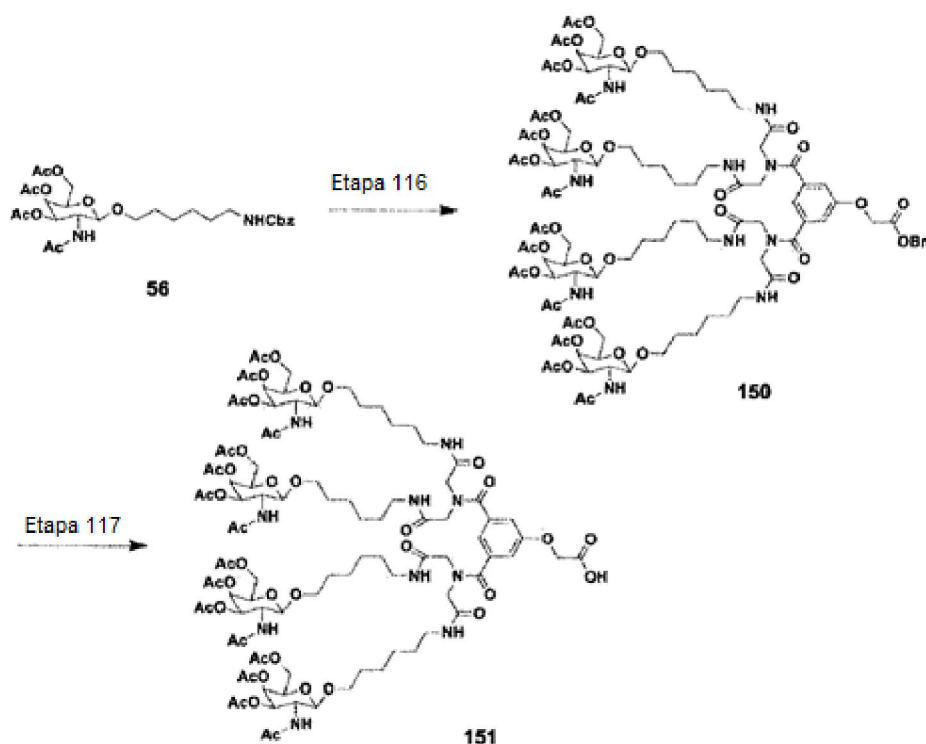
Etapa 115

El compuesto 148 (194 mg, 0,082 mmol) sintetizado en la etapa 114 se disolvió en tetrahidrofurano (2,9 mg) y agua (1,0 mL). A la solución se añadió un polvo de paladio al 10%-carbono (producto que contiene agua, 54,29%; 35,7 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 8 horas en una atmósfera de hidrógeno. La solución de reacción se filtró y el disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener compuesto 149 (183 mg, rendimiento: 98%).

ESI-MS m/z: 1141 (M + 2H)²⁺

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ): 1,21-1,45 (m, 40H), 1,76-2,18 (m, 50H), 3,00-3,09 (m, 8H), 3,40-4,20 (m, 32H), 4,47 (d, J = 8,5 Hz, 4H), 4,96 (dd, J = 3,1, 11,2 Hz, 4H), 5,21 (d, J = 3,1 Hz, 4H), 6,98 (s, 1H), 7,65 (s, 2H), 7,84 (d, J = 9,0 Hz, 4H), 8,31 (s a, 1H), 8,44 (s a, 1H), 10,11 (s, 1H).

Síntesis de compuesto 151



Etapa 116

El compuesto 56 (500 mg, 0,861 mmol) se disolvió en N,N'-dimetilformamida (10 mL). A la solución se añadió un polvo de paladio al 10%-carbono (producto que contiene agua, 54,29%; 92,1 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 2 horas en una atmósfera de hidrógeno. A ello se añadieron compuesto 120 (97,0 mg, 0,172 mmol), hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (198 mg, 1,03 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol monohidrato (13,2 mg, 0,086 mmol) a temperatura ambiente en un atmósfera de argón y la mezcla se agitó durante la noche. La solución de reacción se filtró a través de celite y el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo/metanol = 85/15) y se purificó adicionalmente mediante HPLC preparativa de fase inversa (acetonitrilo/agua) para obtener el compuesto 150 (179 mg, rendimiento: 46%).

ESI-MS m/z: 1138 (M + 2H)²⁺

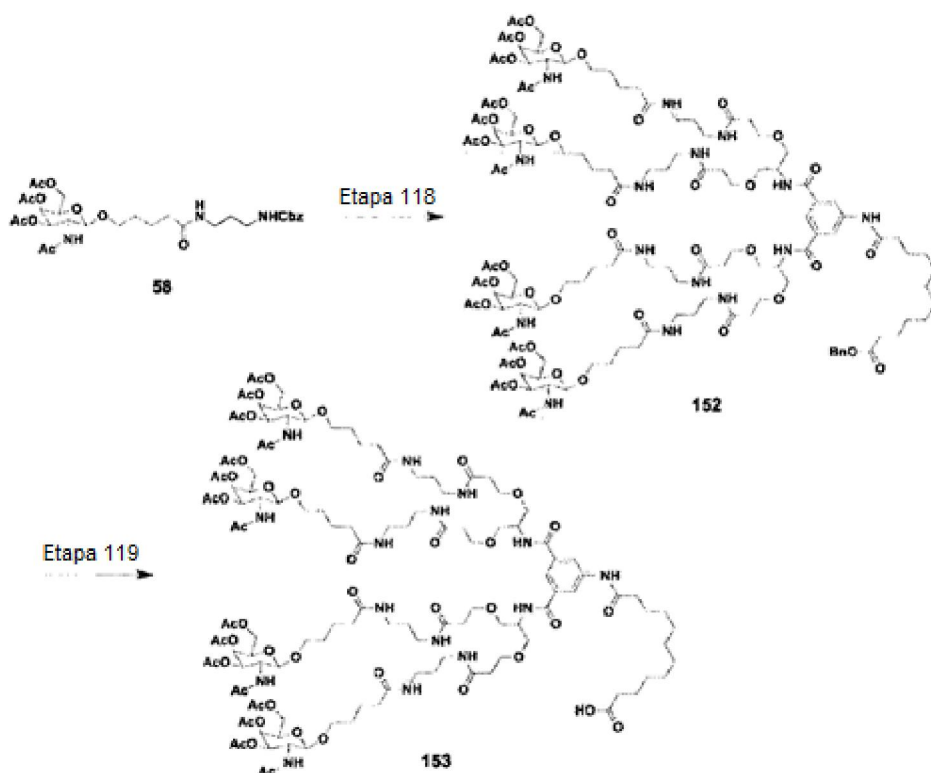
Etapa 117

El compuesto 150 (175 mg, 0,077 mmol) sintetizado en la etapa 116 se disolvió en tetrahidrofurano (2,6 mg) y agua (0,9 mL). A la solución se añadió un polvo de paladio al 10%-carbono (producto que contiene agua, 54,29%; 32,4 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 1 hora en una atmósfera de hidrógeno. La solución de reacción se filtró y el disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener compuesto 151 (160 mg, rendimiento: 95%).

ESI-MS m/z: 1093 (M + 2H)²⁺

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ): 1,23-1,45 (m, 32H), 1,77 (s, 12H), 1,89 (s, 12H), 1,99 (s, 12H), 2,10 (s, 12H), 3,01-3,11 (m, 8H), 3,69-4,02 (m, 34H), 4,47-4,50 (m, 4H), 4,94-4,98 (m, 4H), 5,21 (d, J = 3,1 Hz, 4H), 6,92 (s, 1H), 6,94 (s, 2H), 7,87 (d, J = 9,4 Hz, 2H), 7,92 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 8,33 (s a, 2H), 8,50 (s a, 2H).

Síntesis de compuesto 153



Etapa 118

El compuesto 58 (500 mg, 0,784 mmol) se disolvió en N,N'-dimetilformamida (10 mL). A la solución se añadió un polvo de paladio al 10%-carbono (producto que contiene agua, 54,29%; 92,1 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 2 horas en una atmósfera de hidrógeno. A ello se añadieron compuesto 125 (144 mg, 0,157 mmol), hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (180 mg, 0,941 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol monohidrato (12,0 mg, 0,078 mmol) a temperatura ambiente en un atmósfera de argón y la mezcla se agitó durante la noche. La solución de reacción se filtró a través de celite y el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo/metanol = 80/20) y se purificó adicionalmente mediante HPLC preparativa de fase inversa (acetonitrilo/agua) para obtener el compuesto 152 (191 mg, rendimiento: 43%).

ESI-MS m/z: 1431 (M + 2H)²⁺

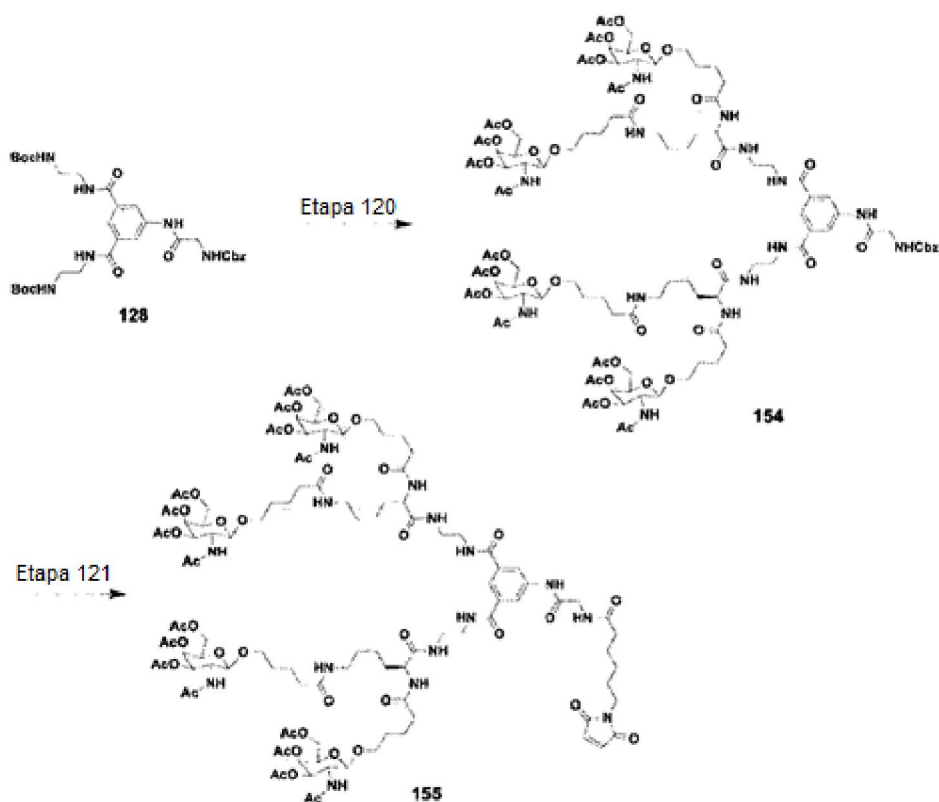
Etapa 119

El compuesto 152 (186 mg, 0,065 mmol) sintetizado en la etapa 118 se disolvió en tetrahidrofurano (2,8 mg) y agua (0,9 mL). A la solución se añadió un polvo de paladio al 10%-carbono (producto que contiene agua, 54,29%; 34,3 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 1 hora en una atmósfera de hidrógeno. La solución de reacción se filtró y el disolvente se separó por destilación a presión reducida para obtener compuesto 153 (174 mg, rendimiento: 97%).

ESI-MS m/z: 1386 (M + 2H)²⁺

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ): 1,25-4,02 (m, 164H), 4,18-4,26 (m, 2H), 4,47 (d, J = 8,1 Hz, 4H), 4,96 (dd, J = 3,1, 11,2 Hz, 4H), 5,21 (d, J = 3,6 Hz, 4H), 7,74-7,91 (m, 13H), 8,18 (s, 2H), 8,36 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 10,27 (s a, 1H).

Síntesis de compuesto 155



Etapa 120

El compuesto 128 (150 mg, 0,228 mmol) se disolvió en diclorometano (1,5 mL). A la solución se añadió ácido trifluoroacético (1,5 mL) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 4 horas. La solución de reacción se concentró a presión reducida y se sometió a azeotropía con acetato de etilo. El residuo se disolvió en N,N'-dimetilformamida (3 mL). A la solución se añadieron compuesto 7 (574 mg, 0,571 mmol), hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (109 mg, 0,571 mmol), trietilamina (0,159 mL, 1,14 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol monohidrato (3,50 mg, 0,023 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante la noche. La solución de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo/metanol = 90/10) y se purificó adicionalmente mediante HPLC preparativa de fase inversa (acetonitrilo/agua) para obtener el compuesto 154 (242 mg, rendimiento: 44%).
ESI-MS m/z: 1216 (M + 2H)²⁺

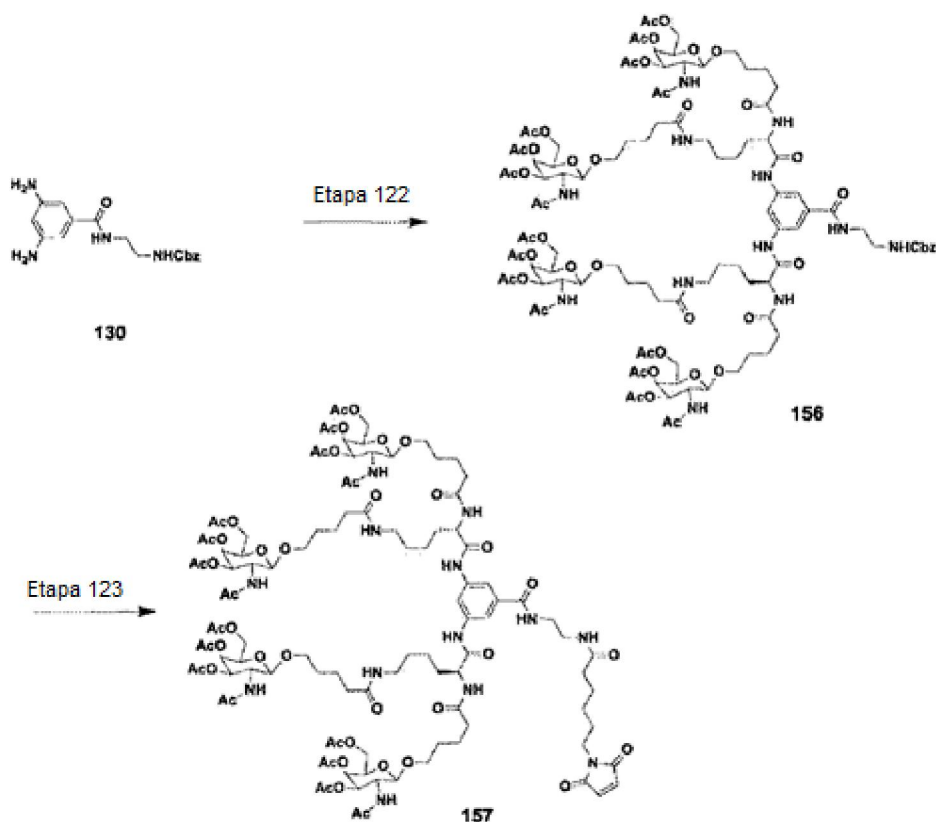
Etapa 121

El compuesto 154 (242 mg, 0,100 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano/agua (4/1; 12 mL). A la solución se añadió un polvo de paladio al 10%-carbono (producto que contiene agua, 54,29%; 44,6 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 2 horas en una atmósfera de hidrógeno. A ello se añadió ácido 6-maleimidohexanoico (23,2 mg, 0,110 mmol) y cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (55,2 mg, 0,199 mmol) a temperatura ambiente en una atmósfera de argón y la mezcla se agitó durante la noche. La solución de reacción se filtró a través de celite y el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó utilizando resina HP20 (acetona/agua) para obtener el compuesto 155 (97,4 mg, rendimiento: 39%).

ESI-MS m/z: 1245 (M + 2H)²⁺

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ): 1,14-2,16 (100H, m), 2,96-2,98 (4H, m), 3,24-3,41 (18H, m), 3,69-3,73 (4H, m), 3,83-3,91 (6H, m), 4,14-4,16 (2H, m), 4,47 (4H, d, J = 8,6 Hz), 4,96 (4H, dd, J = 3,6, 11,3 Hz), 5,21 (4H, d, J = 3,2 Hz), 7,01 (2H, s), 7,73-7,75 (2H, m), 7,83-7,94 (7H, m), 8,05-8,08 (2H, m), 8,14-8,20 (3H, m), 8,55-8,56 (2H, m), 10,24 (1H, s a).

Síntesis de compuesto 157



Etapa 122

El compuesto 130 (75,0 mg, 0,228 mmol), sintetizado en la etapa 96, se disolvió en N,N'-dimetilformamida (3,0 mL). A la solución se añadieron compuesto 60 (574 mg, 0,571 mmol) sintetizado en la etapa 55, diisopropiletilamina (0,199 mL, 1,14 mmol) y hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (217 mg, 0,571 mmol) a la temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante la noche. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo/metanol = 90/10) y se purificó adicionalmente mediante HPLC preparativa de fase inversa (acetonitrilo/agua) para obtener el compuesto 156 (202 mg, rendimiento: 38%).

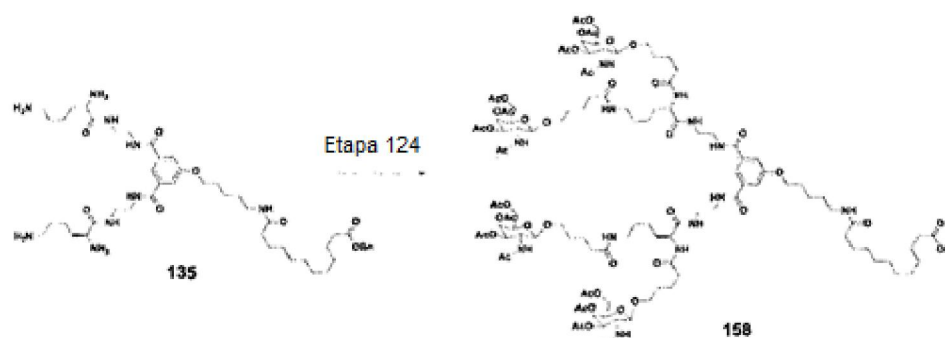
ESI-MS m/z: 1152 (M + 2H)²⁺

Etapa 123

El compuesto 156 (196 mg, 0,085 mmol) sintetizado en la etapa 122 se disolvió en tetrahidrofurano/agua (4/1; 10 mL). A la solución se añadió un polvo de paladio al 10%-carbono (producto que contiene agua, 54,29%; 36,1 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 2 horas en una atmósfera de hidrógeno. A ello se añadió ácido 6-maleimido-hexanoico (19,8 mg, 0,094 mmol) y cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (47,0 mg, 0,170 mmol) a temperatura ambiente en una atmósfera de argón y la mezcla se agitó durante la noche. La solución de reacción se filtró a través de celite y el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó utilizando resina HP20 (acetona/agua) para obtener el compuesto 157 (42,4 mg, rendimiento: 21%).

ESI-MS m/z: 1182 (M + 2H)²⁺

Síntesis de compuesto 158

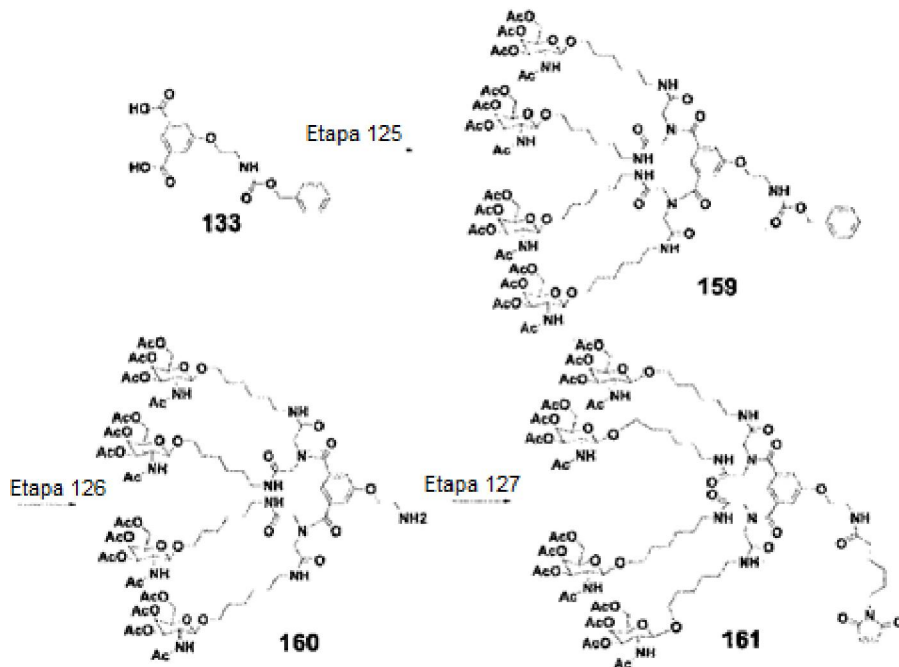


Etapa 124

El compuesto 158 (2,2 g, rendimiento: 58%) se obtuvo de la misma manera que en las etapas 33 y 34 del Ejemplo 8 utilizando el compuesto 135 sintetizado en la etapa 101.

5 ESI-MS m/z: 2437 (M + H)⁺

Síntesis de compuesto 161



10 Etapa 125

El compuesto 159 (0,25 g, rendimiento: 39%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 8 del Ejemplo 1 utilizando el compuesto 133 (0,101 g, 0,282 mmol) sintetizado en la etapa 99 del Ejemplo 13 y el compuesto 62 (0,607 g, 0,613 mmol) sintetizado en la etapa 57 del Ejemplo de Referencia 3.

15 ESI-MS m/z: 2304 (M + H)⁺

Etapa 126

20 El compuesto 160 (0,15 g, rendimiento: 63%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 18 del Ejemplo 3 utilizando el compuesto 159 (0,255 g, 0,111 mmol) sintetizado en la etapa 125.

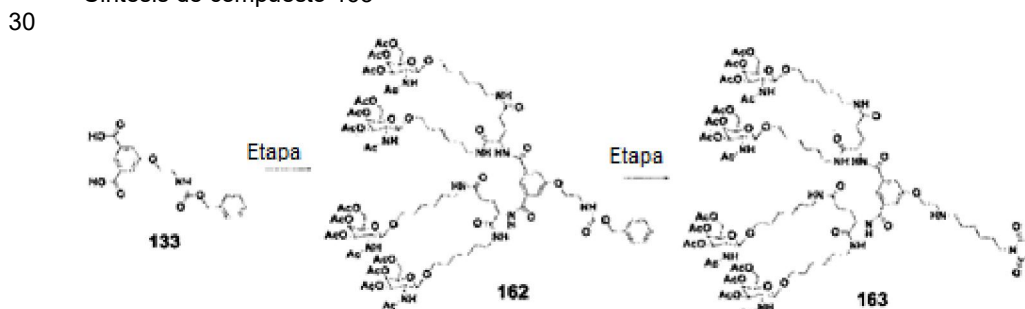
ESI-MS m/z: 2170 (M + H)⁺

Etapa 127

25 El compuesto 161 (5,5 mg, rendimiento: 24%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 19 del Ejemplo 3 utilizando el compuesto 160 (20,8 mg, 9,59 μmol) sintetizado en la etapa 126.

ESI-MS m/z: 1182 (M + 2H)²⁺

Síntesis de compuesto 163



Etapa 128

El compuesto 162 (0,343 g, rendimiento: 53%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 8 del Ejemplo 1 utilizando el compuesto 133 (0,099 g, 0,277 mmol) sintetizado en la etapa 99 del Ejemplo 13 y el compuesto 64 (0,618 g, 0,615 mmol) sintetizado en la etapa 59 del Ejemplo de Referencia 3.

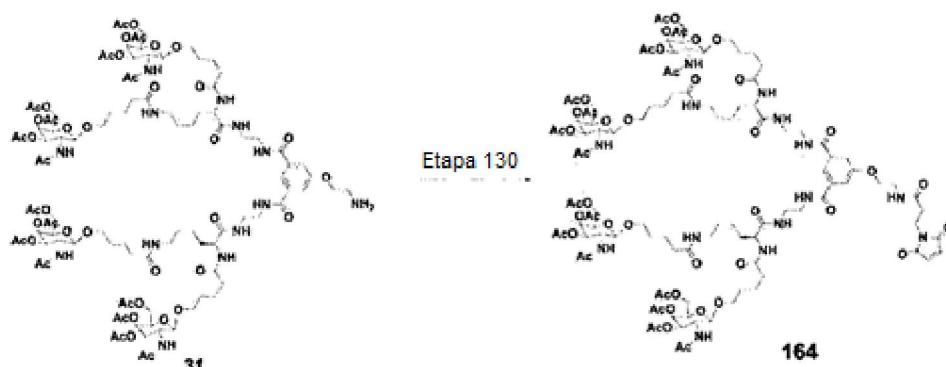
ESI-MS m/z : 2333 ($M + H$)⁺

Etapa 129

El compuesto 163 (6,9 mg, rendimiento: 28%) se obtuvo de la misma manera que en las etapas 18 y 19 del Ejemplo 3 utilizando el compuesto 162 sintetizado en la etapa 128.

ESI-MS m/z : 2392 ($M + H$)⁺

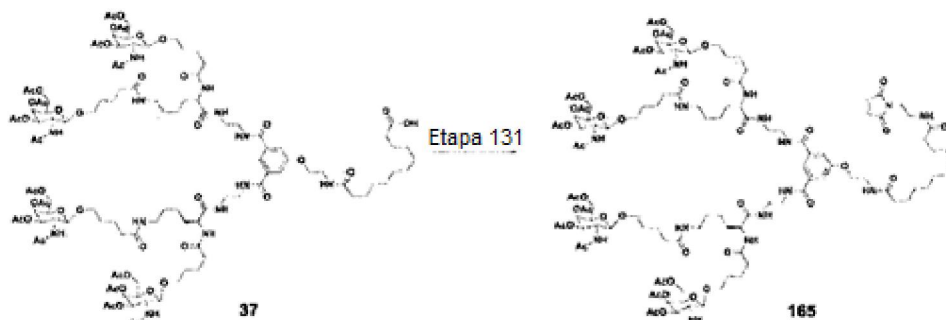
Síntesis de compuesto 164



Etapa 130

El compuesto 164 (0,040 g, rendimiento: 78%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 29 del Ejemplo 5 utilizando el compuesto 31 (0,048 g, 0,021 mmol) sintetizado en la etapa 28 del Ejemplos 5 y 3-maleimidopropionato de N-succinimidilo (fabricado por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 0,017 g, 0,064 mmol). ESI-MS m/z : 2480 ($M + HCOO$)⁻

Síntesis de compuesto 165

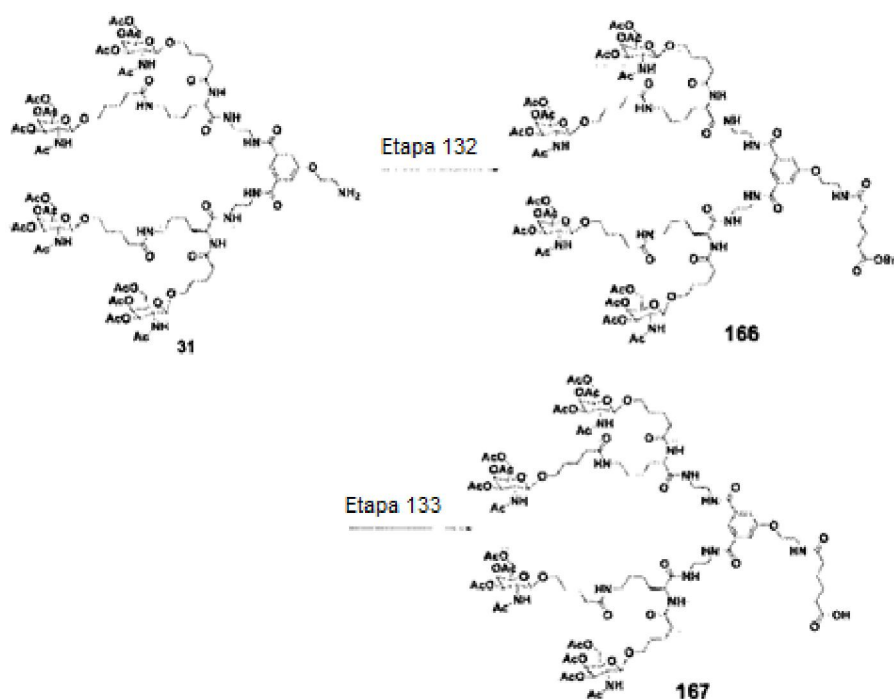


Etapa 131

El compuesto 165 (9,1 mg, rendimiento: 36%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 8 del Ejemplo 1 utilizando el compuesto 37 (23,6 mg, 9,46 μ mol) sintetizado en la etapa 34 del Ejemplo 8 y trifluoroacetato de N-(2-aminoetil)maleimida (fabricado por Sigma-Aldrich Co. LLC, 7,21 mg, 0,028 μ mol)

ESI-MS m/z : 1310 ($M + 2H$)²⁺

Síntesis de compuesto 167



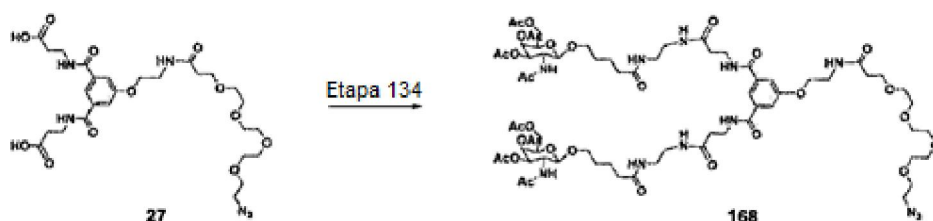
Etapa 132

- 5 El compuesto 166 (0,076 g, rendimiento: 56%) se obtuvo mediante el método descrito en la etapa 14 del Ejemplo 2 utilizando éster monobencílico del ácido hexanoico, sintetizado de la misma manera que en la etapa 14 del Ejemplo 2 utilizando el compuesto 31 (0,122 g, 0,054 mmol) sintetizado en la etapa 28 del Ejemplo 5.
ESI-MS m/z: 2503 (M + H)⁺

Etapa 133

- 10 El compuesto 167 (0,030 g, rendimiento: 40%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 18 del Ejemplo 3 utilizando el compuesto 166 (0,076 g, 0,03 mmol) sintetizado en la etapa 132.
ESI-MS m/z: 2412 (M + H)⁺

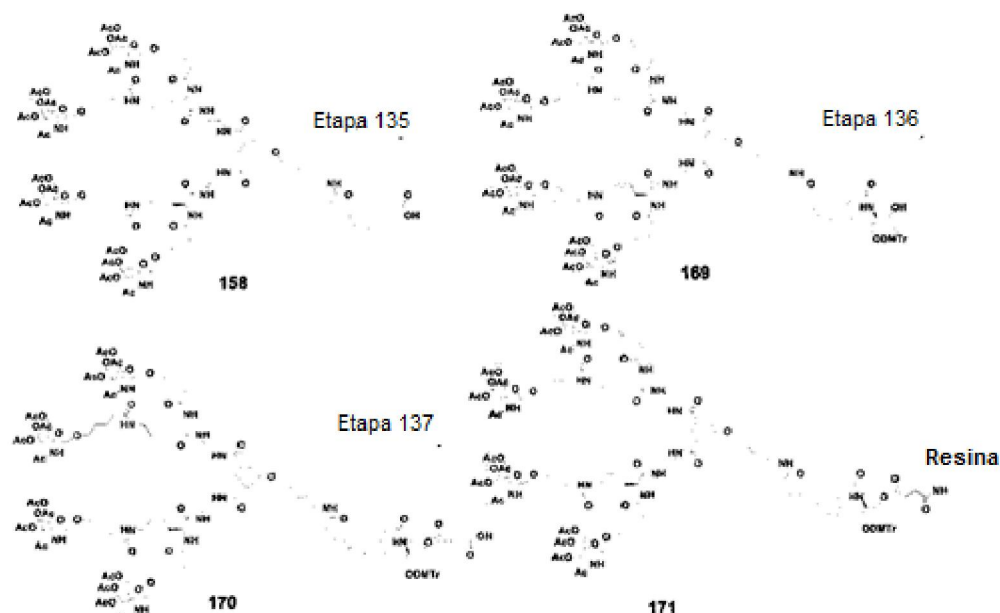
- 15 Síntesis de compuesto 168



Etapa 134

- 20 El compuesto 168 (7 mg, rendimiento: 65%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 12 del Ejemplo 1 utilizando el compuesto 27 (4,36 mg, 0,006 mmol) sintetizado en la etapa 24 del Ejemplo 4 y el compuesto 4 (10 mg, 0,02 mmol) sintetizado en la etapa 3 del Ejemplo de Referencia 1.
ESI-MS m/z: 1581 (M - H)⁻

- 25 Síntesis de compuesto 171



Etapa 135

- 5 El compuesto 169 (0,129 g, rendimiento: 55%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 35 del Ejemplo 8 utilizando el compuesto 158 (0,2011 g, 0,079 mmol) sintetizado en la etapa 124.
ESI-MS m/z: 2972 (M + HCOO)⁻

Etapa 136

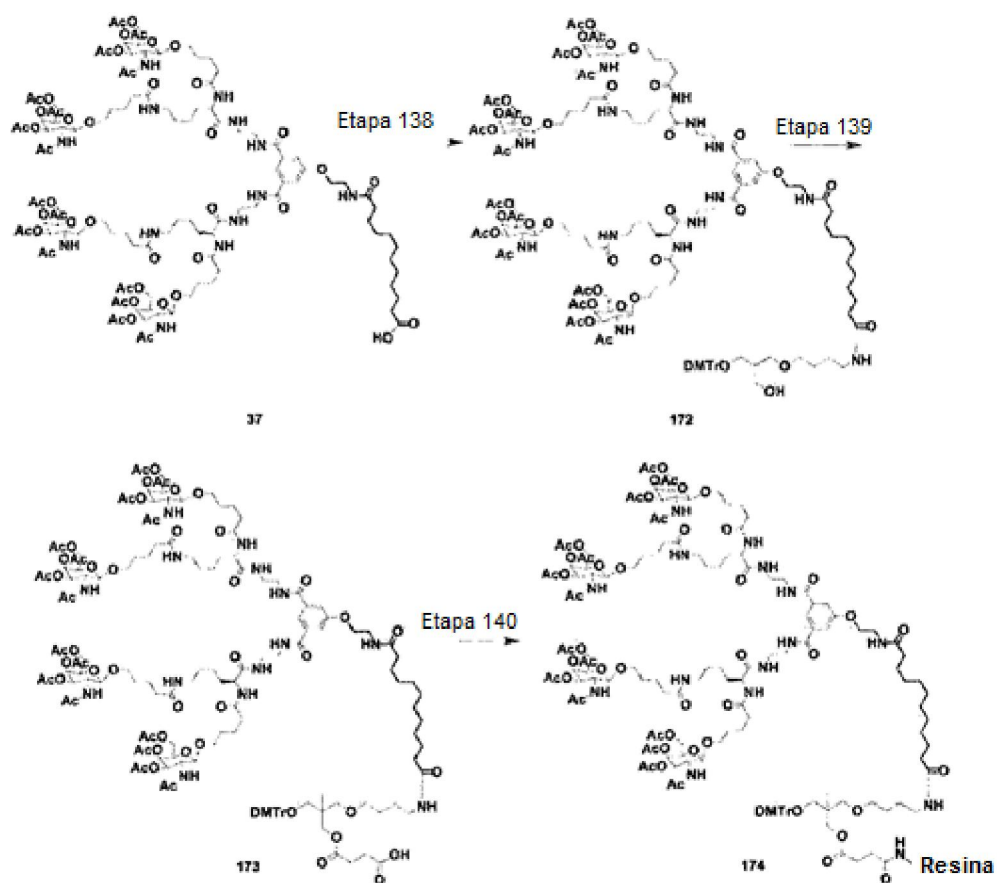
- 10 Un producto bruto del compuesto 170 se obtuvo de la misma manera que en la etapa 36 del Ejemplo 8 utilizando el compuesto 169 (0,129 g, 0,044 mmol) sintetizado en la etapa 135.
ESI-MS m/z: 1535 (M + HCOOH - 2H)²⁻

Etapa 137

- 15 El compuesto 171 (19,4 μmol/g, rendimiento: 35%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 37 del Ejemplo 8 utilizando el compuesto 170 (0,0467 g, 0,013 mmol) sintetizado en la etapa 136.

Síntesis de compuesto 174

20



Etapa 138

5 El compuesto 172 (90 mg, rendimiento: 76%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 35 del Ejemplo 8 utilizando el compuesto 37 (100 mg, 0,040 mmol) sintetizado en la etapa 35 del Ejemplo 8 y el compuesto 66 sintetizado en la etapa 60 del Ejemplo de Referencia 4.
ESI-MS m/z: 1335 (M-DMTr + 2H)²⁺

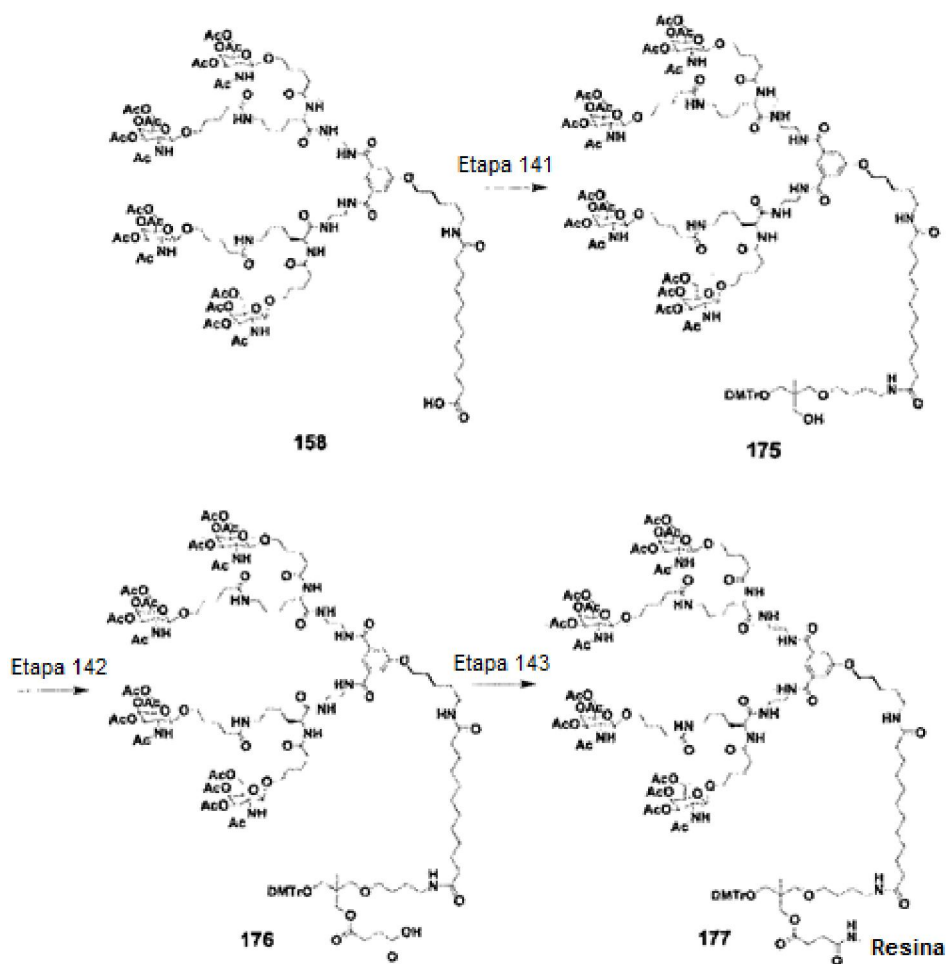
Etapa 139

10 Un producto bruto del compuesto 173 se obtuvo de la misma manera que en la etapa 36 del Ejemplo 8 utilizando el compuesto 172 (90 mg, 0,030 mmol) sintetizado en la etapa 138.
ESI-MS m/z: 1558 (M + HCOOH - 2H)²⁻

Etapa 140

15 El compuesto 174 (21,5 μ mol/g, rendimiento en 2 etapas: 32%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 37 del Ejemplo 8 utilizando un producto bruto del compuesto 173 sintetizado en la etapa 139.
Síntesis de compuesto 177

20



Etapa 141

- 5 El compuesto 175 (90 mg, rendimiento: 76%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 35 del Ejemplo 8 utilizando el compuesto 158 (100 mg, 0,039 mmol) sintetizado en la etapa 124 del Ejemplo 14 y el compuesto 66 sintetizado en la etapa 60 del Ejemplo de Referencia 4.
ESI-MS m/z: 1356 ($M + 2H$)²⁺, detectado como una forma DTMr-desprotegida

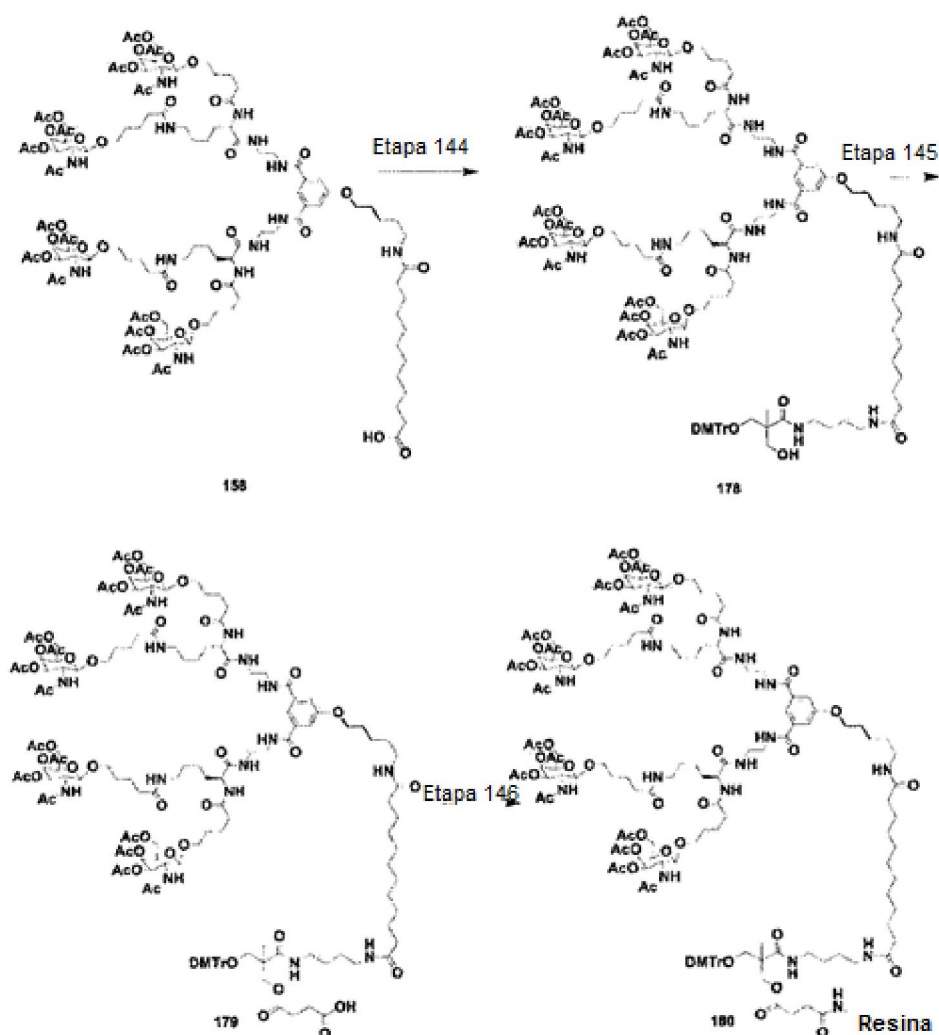
Etapa 142

- 10 Un producto bruto del compuesto 176 se obtuvo de la misma manera que en la etapa 36 del Ejemplo 8 utilizando el compuesto 175 (90 mg, 0,030 mmol) sintetizado en la etapa 141.
ESI-MS m/z: 1579 ($M + HCOOH - 2H$)²⁻

Etapa 143

- 15 El compuesto 177 (17,0 μ mol/g, rendimiento en 2 etapas: 26%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 37 del Ejemplo 8 utilizando un producto bruto del compuesto 176 sintetizado en la etapa 142.

- 20 Síntesis de compuesto 180



Etapa 144

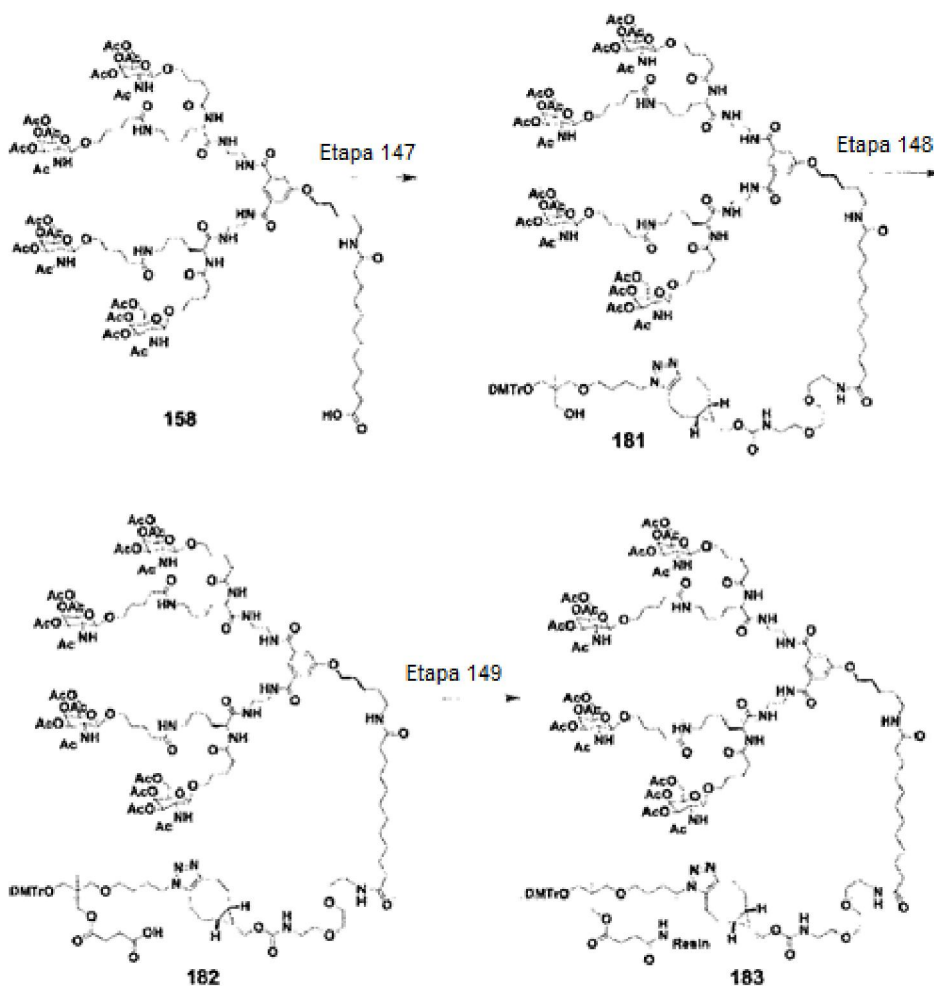
- 5 El compuesto 178 (50 mg, rendimiento: 42%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 35 del Ejemplo 8 utilizando el compuesto 158 (100 mg, 0,039 mmol) sintetizado en la etapa 124 del Ejemplo 14 y el compuesto 69 sintetizado en la etapa 62 del Ejemplo de Referencia 4.
ESI-MS m/z: 1363 ($M + 2H$)²⁺, detectado como una forma DTMr-desprotegida

Etapa 145

- 10 Un producto bruto del compuesto 179 se obtuvo de la misma manera que en la etapa 36 del Ejemplo 8 utilizando el compuesto 178 (50 mg, 0,017 mmol) sintetizado en la etapa 144.
ESI-MS m/z: 1587 ($M + HCOOH - 2H$)²⁻

Etapa 146

- 15 El compuesto 180 (0,5 $\mu\text{mol/g}$, rendimiento en 2 etapas: 1%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 37 del Ejemplo 8 utilizando un producto bruto del compuesto 179 sintetizado en la etapa 145.
- 20 Síntesis de compuesto 183



Etapa 147

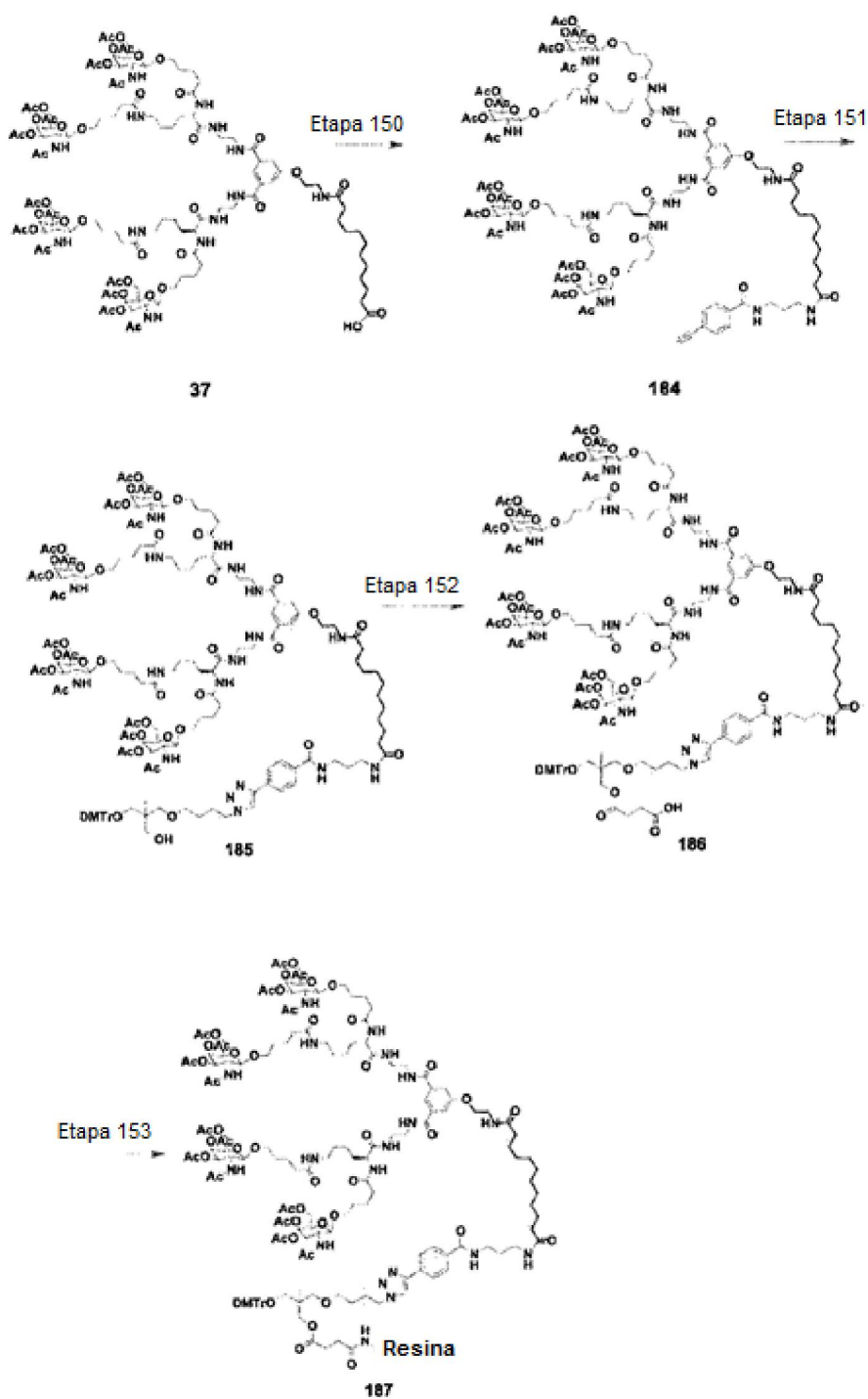
- 5 El compuesto 181 (40 mg, rendimiento: 30%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 35 del Ejemplo 8 utilizando el compuesto 158 (100 mg, 0,039 mmol) sintetizado en la etapa 124 del Ejemplo 14 y el compuesto 71 sintetizado en la etapa 63 del Ejemplo de Referencia 4.
ESI-MS m/z: 1532 (M + 2H)²⁺ detectado como una forma DTMr-desprotegida

Etapa 148

- 10 Un producto bruto del compuesto 182 se obtuvo de la misma manera que en la etapa 36 del Ejemplo 8 utilizando el compuesto 181 (40 mg, 0,012 mmol) sintetizado en la etapa 147.
ESI-MS m/z: 1582 (M + 2H)²⁺ detectado como una forma DTMr-desprotegida

Etapa 149

- 15 El compuesto 183 (0,2 μmol/g, rendimiento en 2 etapas: 1%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 37 del Ejemplo 8 utilizando un producto bruto del compuesto 182 sintetizado en la etapa 148.
- 20 Síntesis de compuesto 187



Etapa 150

5 El compuesto 184 (58 mg, rendimiento: 77%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 35 del Ejemplo 8 utilizando el compuesto 158 (70 mg, 0,028 mmol) sintetizado en la etapa 34 del Ejemplo 8 y el compuesto 78 sintetizado en la etapa 68 del Ejemplo de Referencia 4.
ESI-MS m/z: 1341 (M + 2H)²⁺

Etapa 151

10 El compuesto 184 (58 mg, 0,022 mmol) sintetizado en la etapa 150 se disolvió en metanol (0,15 mL). A la solución se añadieron el compuesto 65 (16,9 mg, 0,032 mmol) sintetizado mediante el método descrito en Journal of Organic Chemistry, Vol. 74, págs. 6837-6842, 2009, una solución acuosa de L-ascorbato de sodio de 1 mol/L (0,022 mL, 0,022 mmol), una solución acuosa de sulfato de cobre(II) de 20 mmol/L (0,011 mL, 0,22 μmol) y una solución de 10 mmol/L de tris(2-bencimidazolilmetil)amina en DMSO (0,022 mL, 0,22 μmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3

horas. La solución de reacción se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo/metanol = 80/20) para obtener el compuesto 185 (7 mg, rendimiento: 10%).

ESI-MS m/z : 1450 ($M + 2H$)²⁺ detectado como una forma DTMr-desprotegida

5 Etapa 152

Un producto bruto del compuesto 186 se obtuvo de la misma manera que en la etapa 36 del Ejemplo 8 utilizando el compuesto 185 (10 mg, 3,13 μ mol) sintetizado en la etapa 151.

ESI-MS m/z : 1500 ($M + 2H$)²⁺ detectado como una forma DTMr-desprotegida

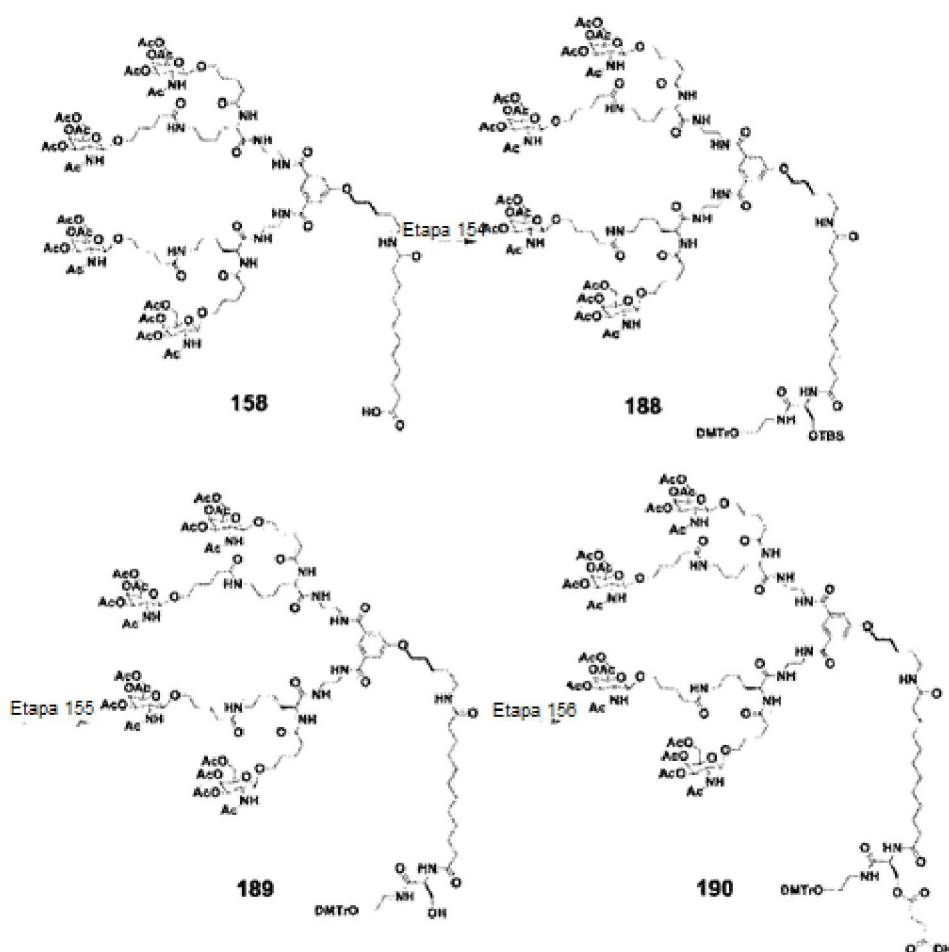
10

Etapa 153

El compuesto 187 (8,4 μ mol/g, rendimiento: 27%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 37 del Ejemplo 8 utilizando un producto bruto del compuesto 186 sintetizado en la etapa 152.

15

Síntesis de compuesto 190



Etapa 154

20

Se obtuvo un producto bruto del compuesto 188 de la misma manera que en la etapa 8 del Ejemplo 1 o mediante el método descrito en Bioconjugate Chemistry, Vol. 26, págs. 1451-1455, 2015, utilizando el compuesto 158 (74,1 mg, 0,029 mmol) sintetizado en la etapa 124 del Ejemplos 14 y el compuesto 95 (15 mg, 0,027 mmol) sintetizado en la etapa 72 del Ejemplo 4.

25

ESI-MS m/z : 1392($M + H$)⁺, detectado como una forma DTMr-desprotegida

Etapa 155

Un producto bruto del compuesto 189 se obtuvo por el método descrito en una bibliografía de patente documento WO2015105083, utilizando el compuesto 188 (0,083 g, 0,027 mmol) sintetizado en la etapa 154.

30

ESI-MS m/z : 2669 ($M + H$)⁺, detectado como una forma DTMr-desprotegida

Etapa 156

Un producto bruto del compuesto 190 se obtuvo de la misma manera que en la etapa 36 del Ejemplo 8 utilizando el compuesto 189 (0,08 g, 0,027 mmol) sintetizado en la etapa 155.

ESI-MS m/z : 1556($M+HOOH-2H$)²⁻

- 5 ¹H-RMN (400 MHz, MeOD): δ 1,45-1,86 (48H, m), 1,93 (12H, s), 1,94 (12H, s), 2,02 (12H, s), 2,13 (12H, s), 2,16-2,28 (17H, m), 2,48 (4H, s), 3,10-3,16 (6H, m), 3,36-3,56 (19H, m), 3,77 (6H, s), 3,80-3,89 (6H, m), 3,98-4,35 (30H, m), 4,53-4,59 (4H, m), 4,66-4,72 (1H, m), 5,04-5,10 (4H, m), 5,31-5,36 (4H, m), 6,81-6,88 (4H, m), 7,17-7,23 (1H, m), 7,26-7,32 (6H, m), 7,38-7,44 (2H, m), 7,54 (2H, s a), 7,90 (1H, s a).

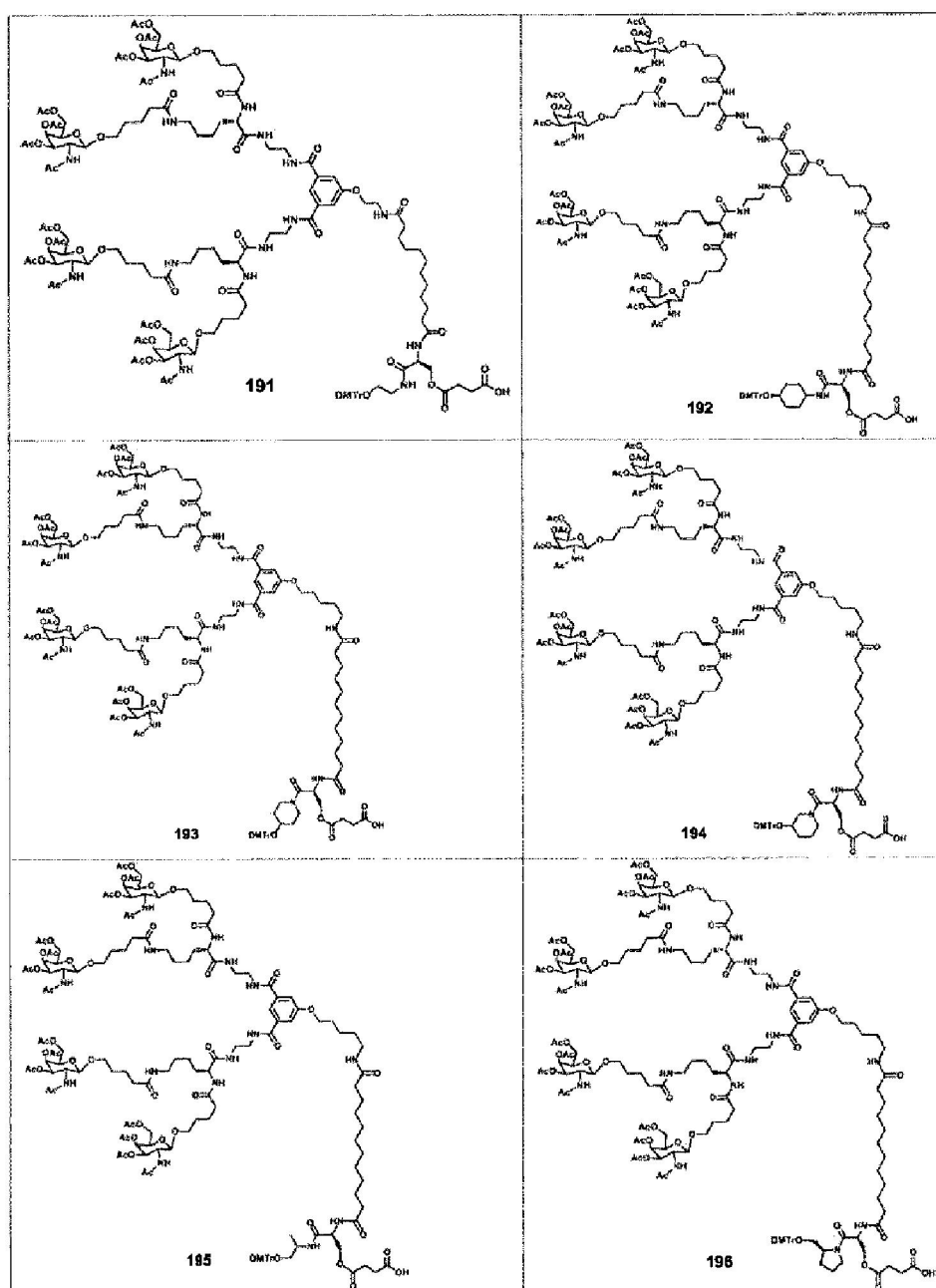
10 Síntesis de compuestos 191 a 199

Los compuestos descritos en las Tablas 20 y 21 se obtuvieron de la misma manera que en las etapas 154 y 155 utilizando el compuesto 37 sintetizado en la etapa 34 del Ejemplo 8, o el compuesto 158 sintetizado en la etapa 124 del Ejemplo 14 y las estructuras descritas en la Tabla 18, o compuesto 75 sintetizado en la etapa 66 del Ejemplo de Referencia 4.

15

Los resultados de la espectrometría de masas sintetizados en este Ejemplo se muestran en la Tabla 22.

Tabla 20



20

Tabla 21

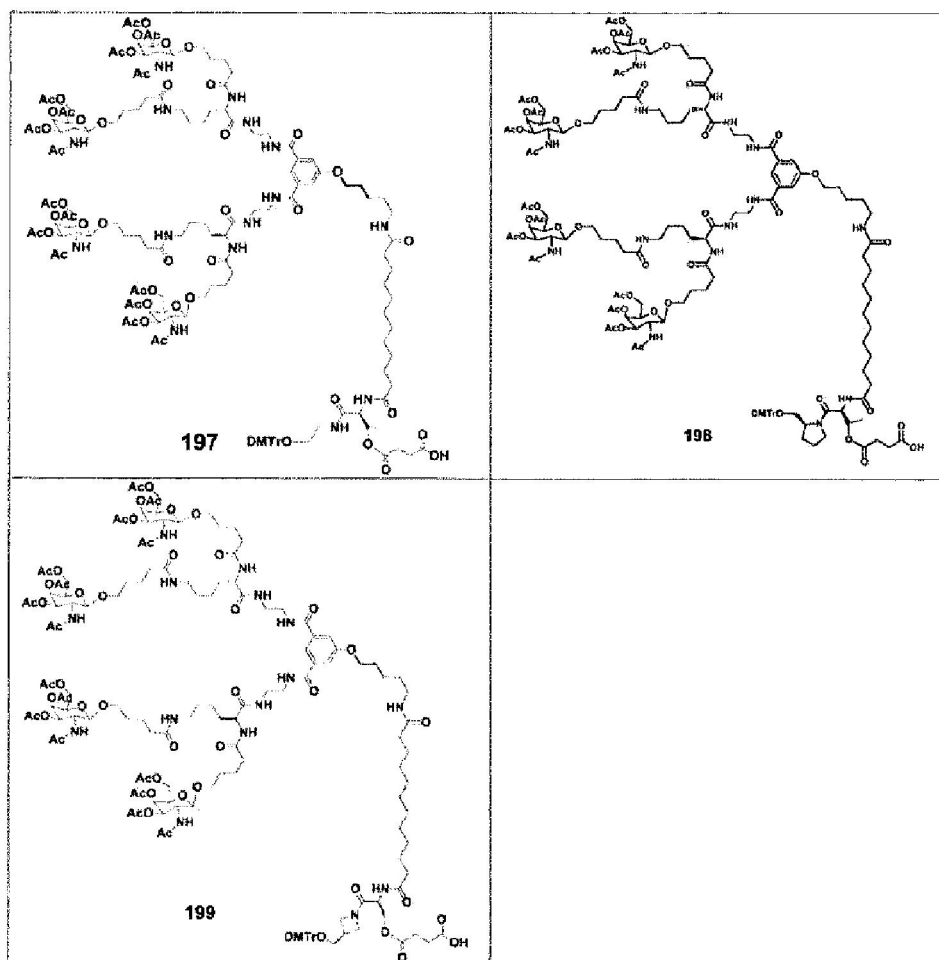
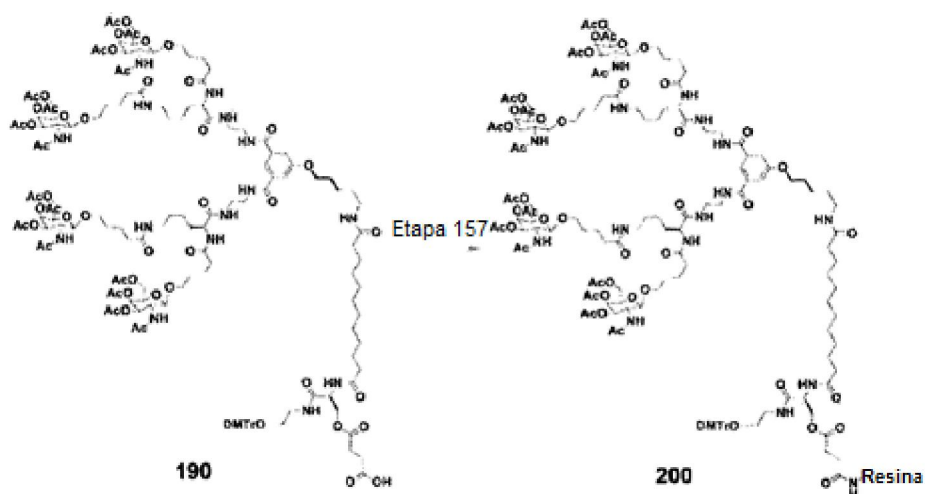


Tabla 22

Compuesto	ESI-MS m/z
191	1537(M+HCOOH) ²⁻
192	1584(M+HCOOH) ²⁻
193	1577(M+HCOOH) ²⁻
194	1577(M+HCOOH) ²⁻
195	1564(M+HCOOH) ²⁻
196	1578(M+HCOOH) ²⁻
197	1564(M+HCOOH) ²⁻
198	1584(M+HCOOH) ²⁻
199	1570(M+2HCOOH) ²⁻



Etapa 157

5 El compuesto 200 (10,0 $\mu\text{mol/g}$) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 37 del Ejemplo 8 utilizando el compuesto 190 (g, mmol) sintetizado en la etapa 156.

Síntesis de compuestos 201 a 209

10 Los compuestos descritos en las Tablas 23 y 24 se obtuvieron de la misma manera que en la etapa 157 utilizando los compuestos descritos en las Tabla 20 y 21.

Las cantidades soportadas de los compuestos sintetizados en este Ejemplo se muestran en la Tabla 25.
Tabla 23

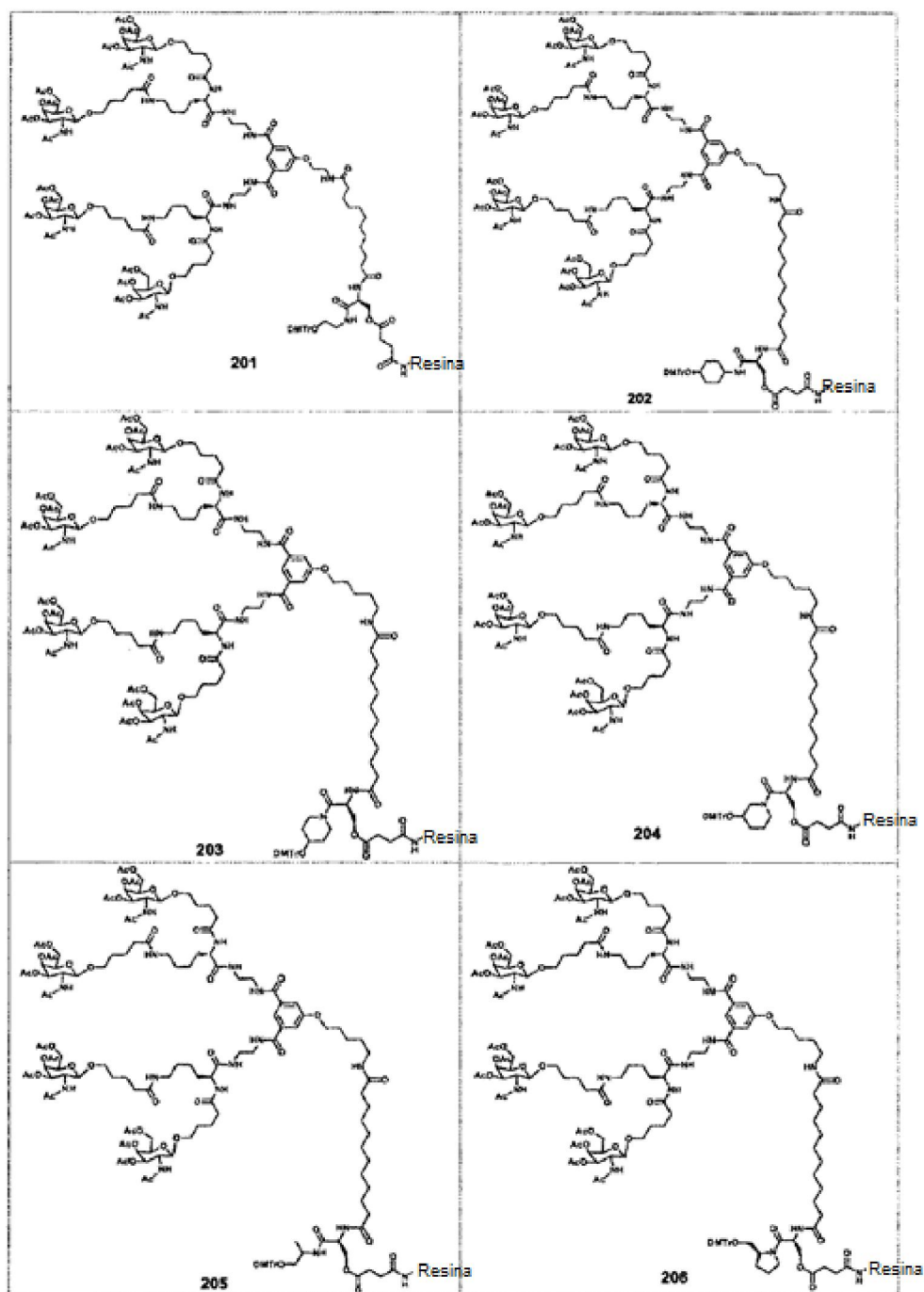


Tabla 24

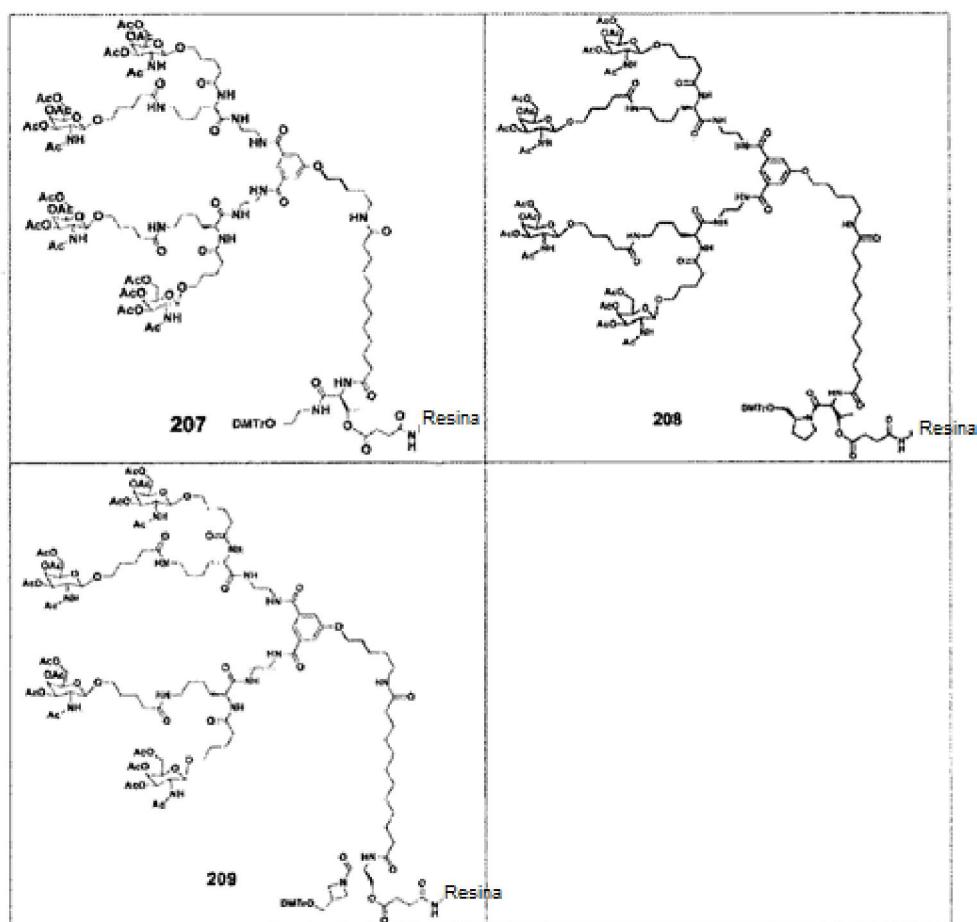


Tabla 25

Compuesto	Cantidad soportada (μ mol/g)
201	2,6
202	23,1
203	22,2
204	32,7
205	30,5
206	18,1
207	20,4
208	12,7
209	2,2

5 Ejemplo 15 Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos

Síntesis de conjugados de ácidos nucleicos 210 a 218

10 Los Los conjugados de ácidos nucleicos de cadena sencilla descritos en las Tablas 27 y 28 se obtuvieron de la misma manera que en la etapa 38 del Ejemplo 9 utilizando los compuestos descritos en la Tabla 26.

Las secuencias y los resultados de la espectrometría de masas de los conjugados de ácidos nucleicos sintetizados en este Ejemplo se muestran en la Tabla 29.

Tabla 26

15

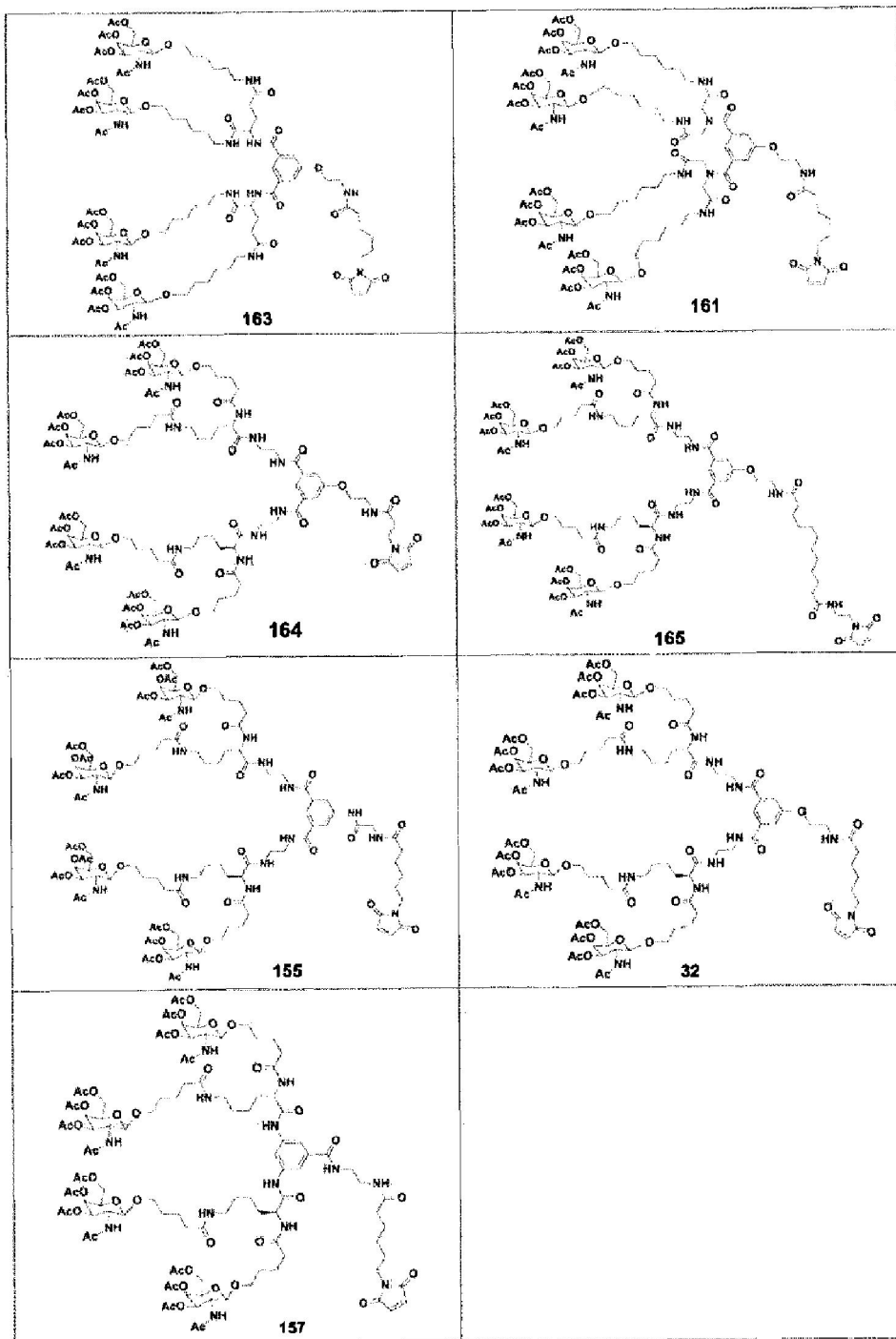


Tabla 27

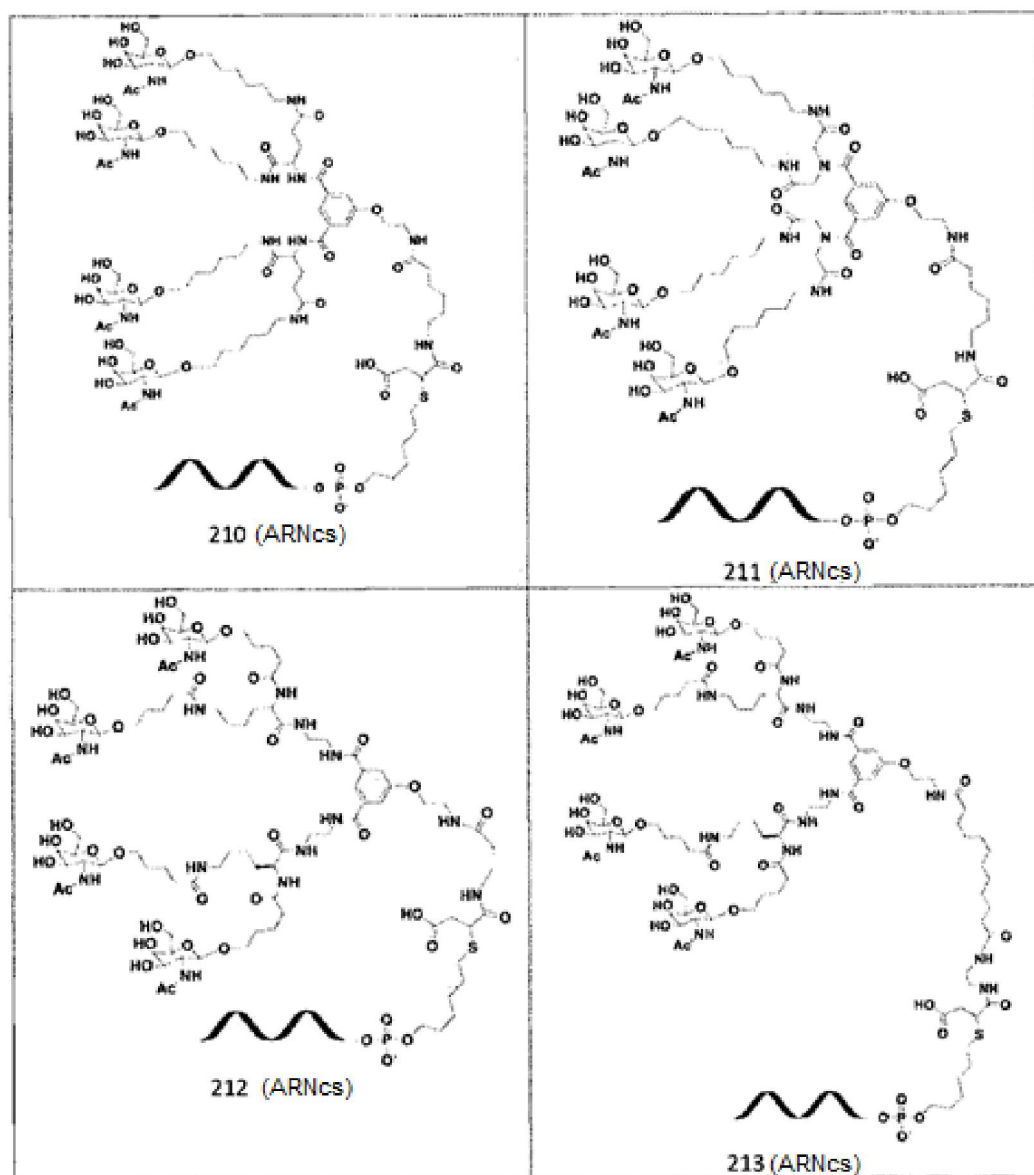


Tabla 28

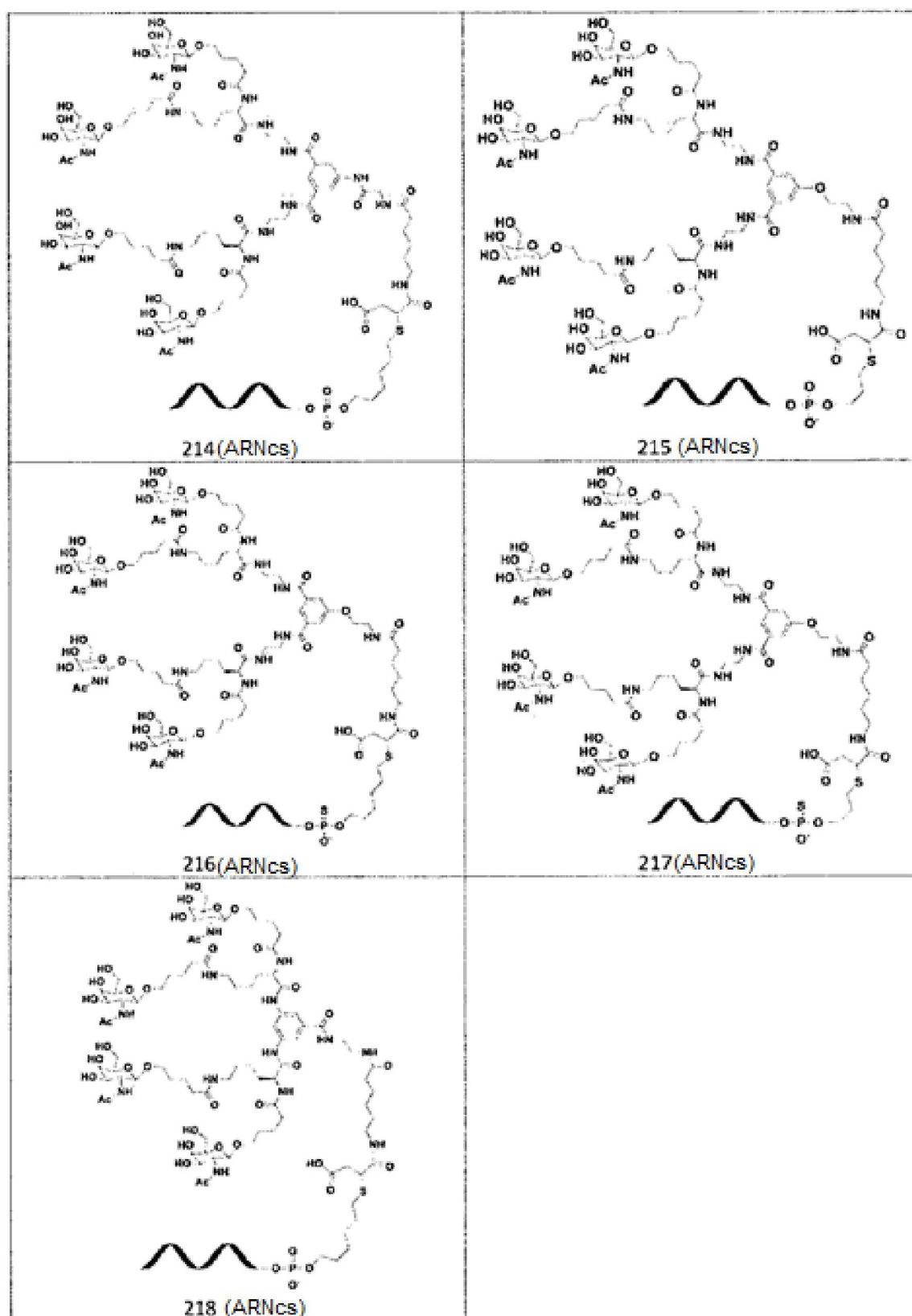
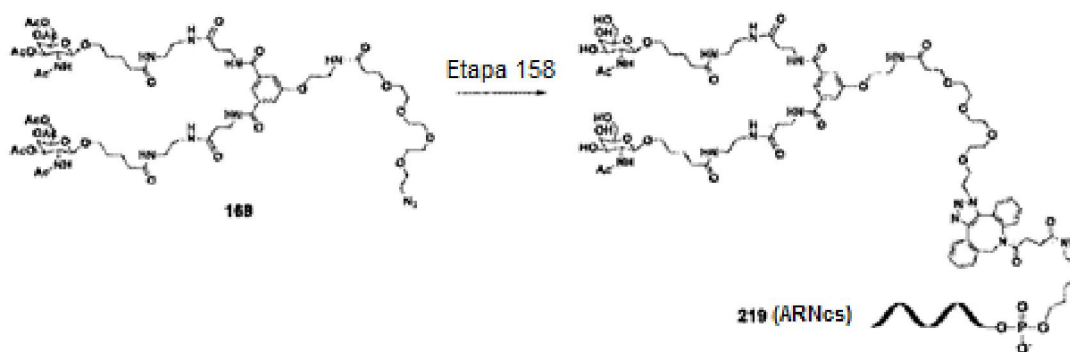


Tabla 29

Compuesto	Secuencia (5' a 3')	Peso molecular teórico	Encontrado
210_3'-AT3-ssRNA	G(F) [^] G(M) [^] U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 210	8885	8886
211_3'-AT3-ssRNA	G(F) [^] G(M) [^] U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 211	8857	8857
212_3'-AT3-ssRNA	G(F) [^] G(M) [^] U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 212	8929	8928
213_3'-AT3-ssRNA	G(F) [^] G(M) [^] U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 213	9112	9110
214_3'-AT3-ssRNA	G(F) [^] G(M) [^] U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 214	8983	8982
215_3'-AT3-ssRNA	G(F) [^] G(M) [^] U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 215	8929	8929
216_3'-AT3-ssRNA	G(F) [^] G(M) [^] U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 216	8988	8985
217_3'-AT3-ssRNA	G(F) [^] G(M) [^] U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 217	8946	8943
218_3'-AT3-ssRNA	G(F) [^] G(M) [^] U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 218	8854	8854

Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos 219



5 Etapa 158

Se obtuvo un conjugado de ácidos nucleicos 219 de cadena sencilla descrito en la Tabla 30 de la misma manera que en la etapa 40 del Ejemplo 10 utilizando el compuesto 168 sintetizado en la etapa 134.

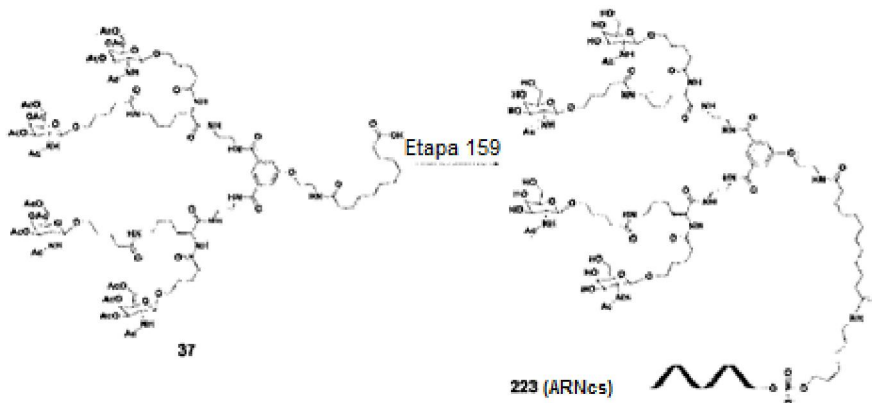
10 La secuencia y los resultados de la espectrometría de masas del conjugado de ácidos nucleicos sintetizado en este Ejemplo se muestran en la Tabla 30.

Tabla 30

Compuesto	Secuencia (5' a 3')	Peso molecular teórico	Encontrado
219_5'-B2M-ssRNA	219 A(F)G(M)G(F)A(M)C(F)U(M)G(F)G(M)U(F)C(M) U(F)U(F)U(M)C(F)U(M)A(F)U(M)C(F)U(M)^C(F)^U(M)	9529	9528

Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos 223

5



Etapa 159

10 Se añadieron el compuesto 37 sintetizado en la etapa 34 del Ejemplo 8 y un oligonucleótido modificado con un grupo amino terminal sintetizado mediante el método descrito en *Molecules*, Vol. 17, págs. 13825-13843, 2012 y se hicieron reaccionar mediante el método descrito en *Bioconjugate Chemistry*, vol. 22, págs. 1723-1728, 2011 o *Bioconjugate Chemistry*, Vol. 26, págs. 1451-1455, 2015. Se obtuvo el conjugado de ácidos nucleicos 223 de cadena sencilla mediante purificación por el método descrito en la etapa 38 del Ejemplo 9.

15 Síntesis de conjugados de ácidos nucleicos 220 a 233

Los conjugados de ácidos nucleicos de cadena sencilla descritos en las Tablas 33 a 35 se obtuvieron de la misma manera que en la etapa 159 del Ejemplo 15 utilizando los compuestos descritos en las Tablas 31 y 32.

20 Las secuencias y los resultados de la espectrometría de masas de los conjugados de ácidos nucleicos sintetizados en este Ejemplo se muestran en la Tabla 36.
Tabla 31

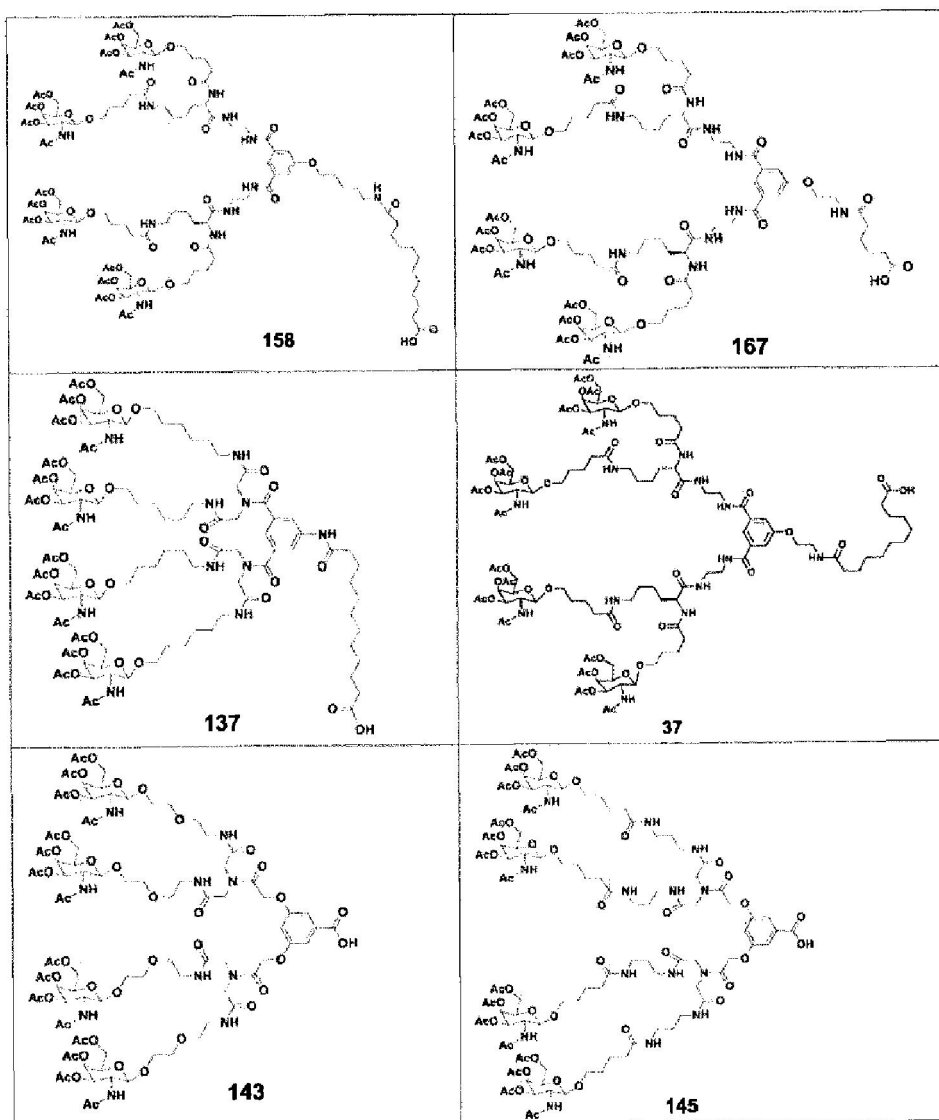


Tabla 32

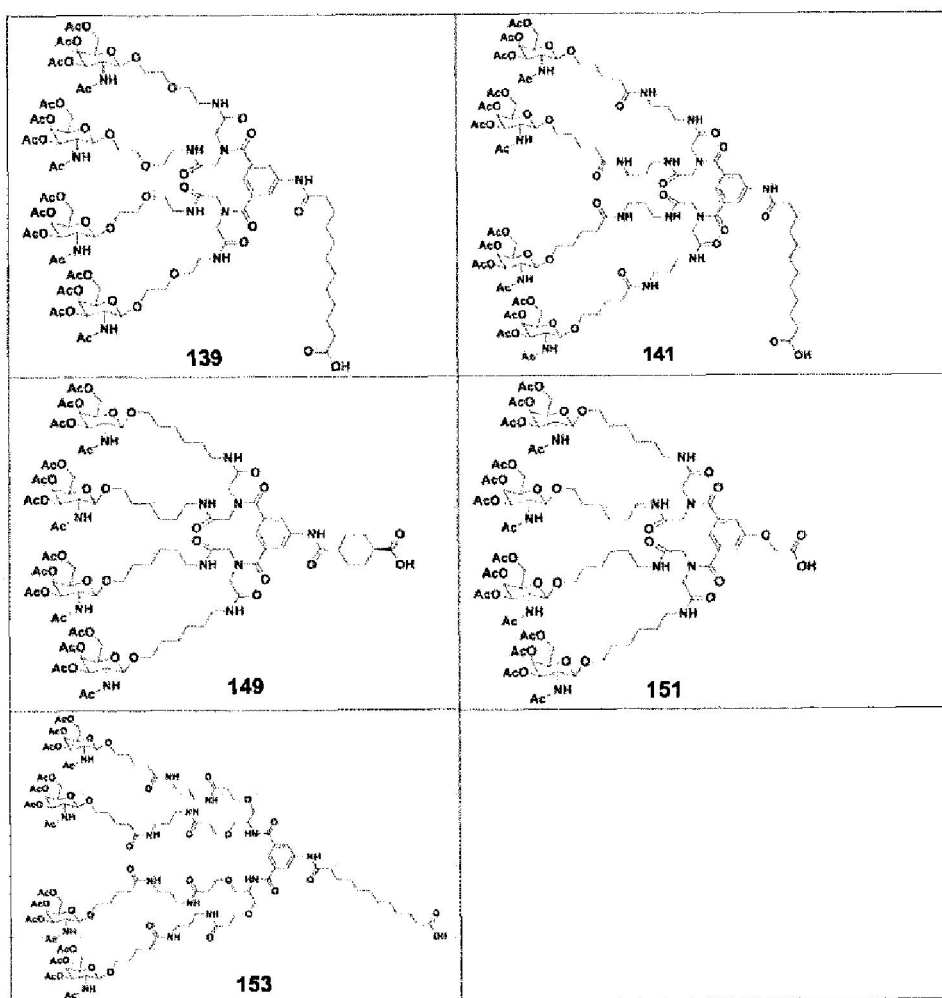


Tabla 33

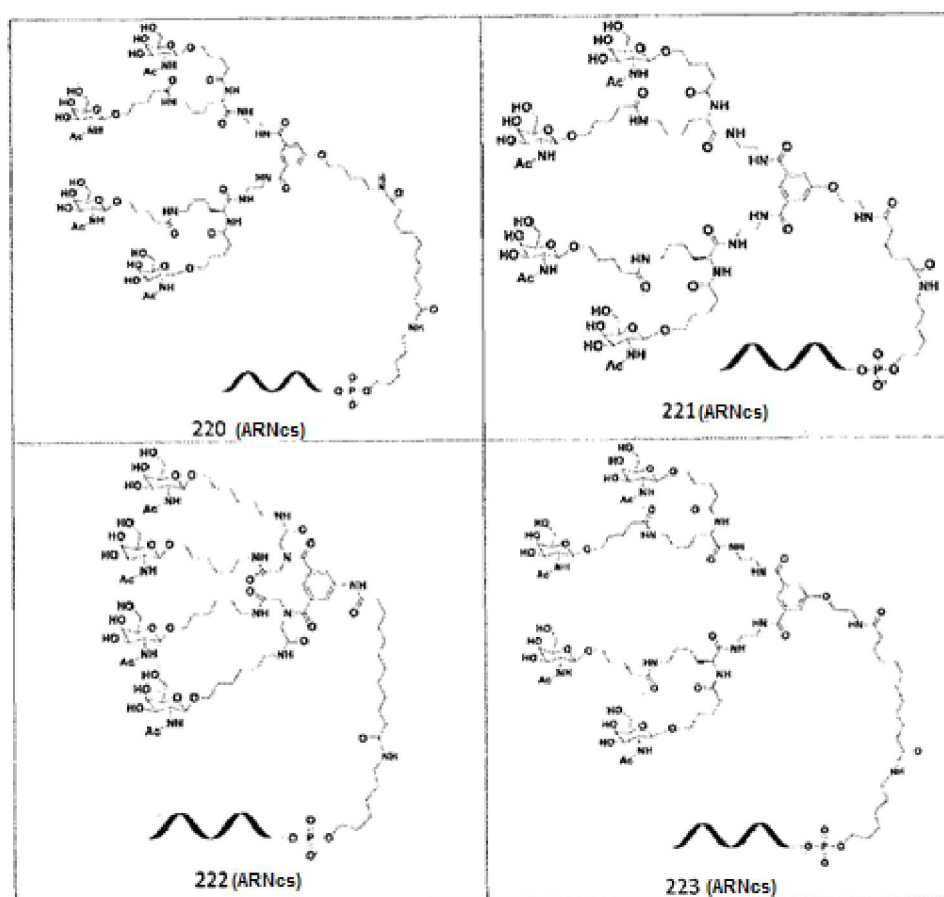


Tabla 34

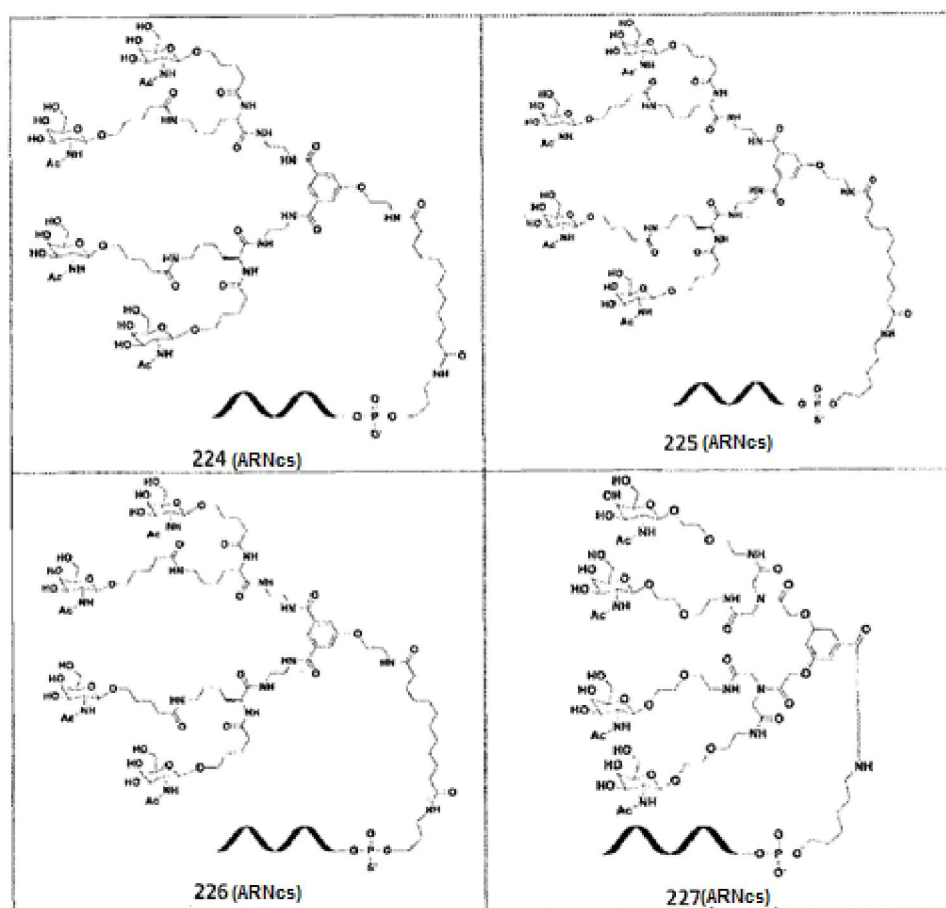


Tabla 35

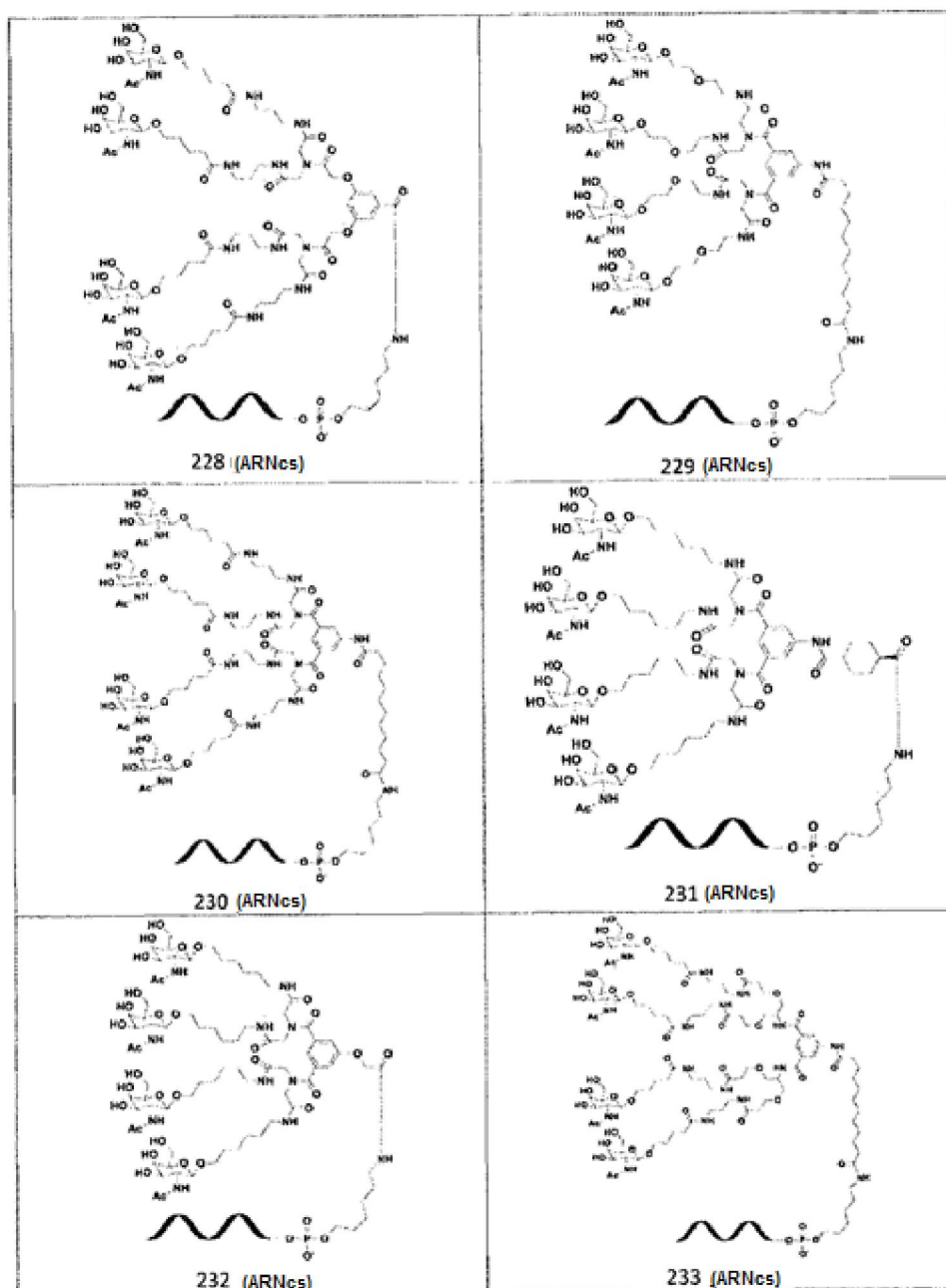
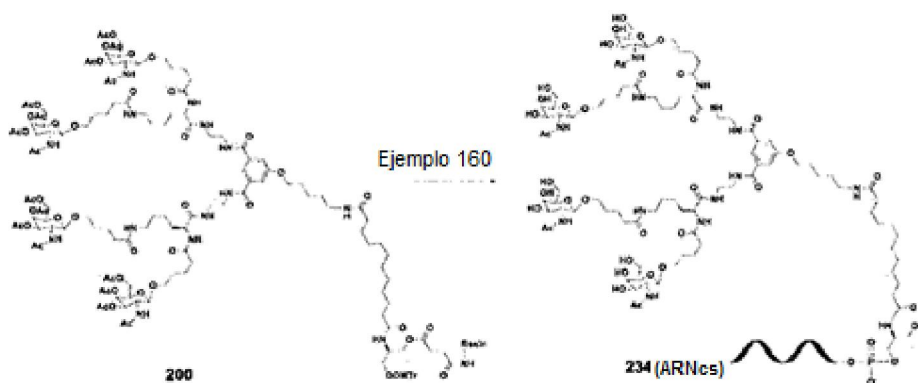


Tabla 36

Compuesto	Secuencia (5' a 3')	Peso molecular teórico	Encontrado
220_3'-AT3-ssRNA	G(F) ^A G(M) ^A U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>220</u>	8977	8977
221_3'-AT3-ssRNA	G(F) ^A G(M) ^A U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>221</u>	8851	8851
222_3'-AT3-ssRNA	G(F) ^A G(M) ^A U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>222</u>	8778	8778

Compuesto	Secuencia (5' a 3')	Peso molecular teórico	Encontrado
	(Continuación)		
223_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>223</u>	8935	8935
224_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>224</u>	8896	8893
225_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>225</u>	8954	8951
226_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>226</u>	8912	8909
227_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>227</u>	8607	8606
228_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>228</u>	8883	8882
229_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>229</u>	8730	8729
230_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>230</u>	9006	9005
231_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>231</u>	8719	8719
232_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>232</u>	8624	8624
233_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>233</u>	9209	9209

Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos 234



Etapa 160

Se obtuvo un conjugado de ácidos nucleicos 234 de cadena sencilla de la misma manera que en la etapa 46 del Ejemplo 12 utilizando el compuesto 200 sintetizado en la etapa 157 del Ejemplo 14.

Síntesis de conjugados de ácidos nucleicos 235 a 250

Los conjugados de ácidos nucleicos de cadena sencilla descritos en las Tablas 37 a 40 se obtuvieron cada uno de la misma manera que en la etapa 160, utilizando un compuesto correspondiente seleccionado de los compuestos 171, 174, 177, 180, 183, 187 y 200 y los compuestos descritos en las Tablas 23 y 24.

Las secuencias y los resultados de la espectrometría de masas de los conjugados de ácidos nucleicos sintetizados en este Ejemplo se muestran en la Tabla 41.

Tabla 37

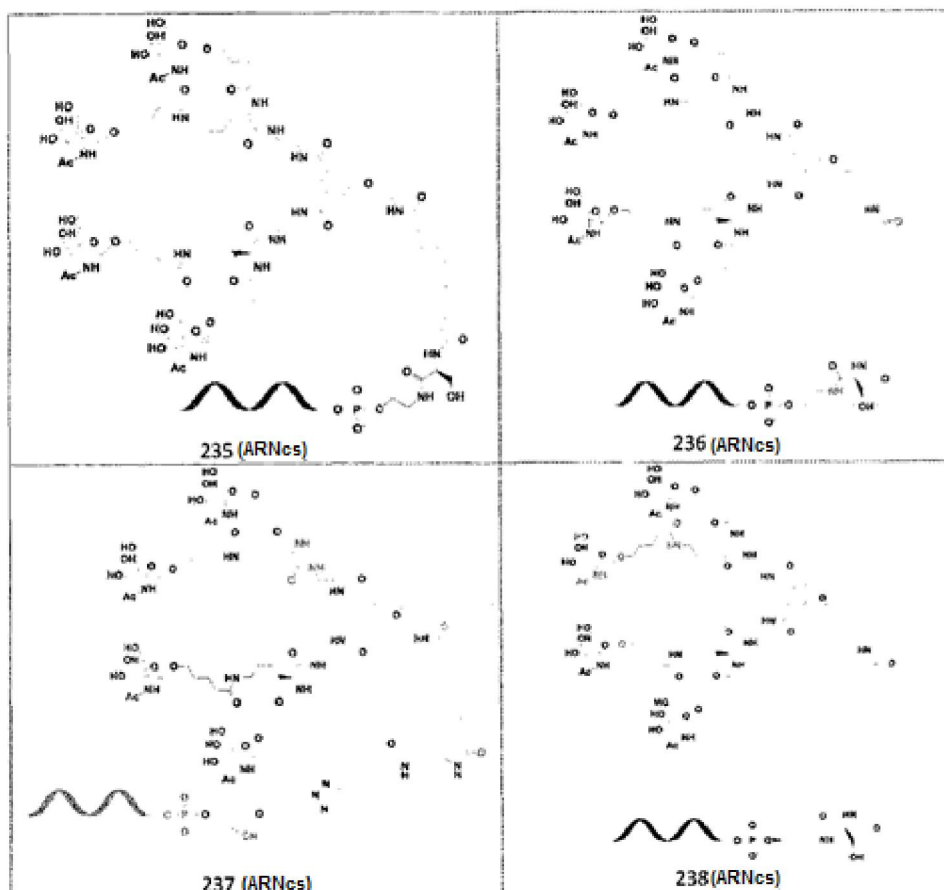


Tabla 38

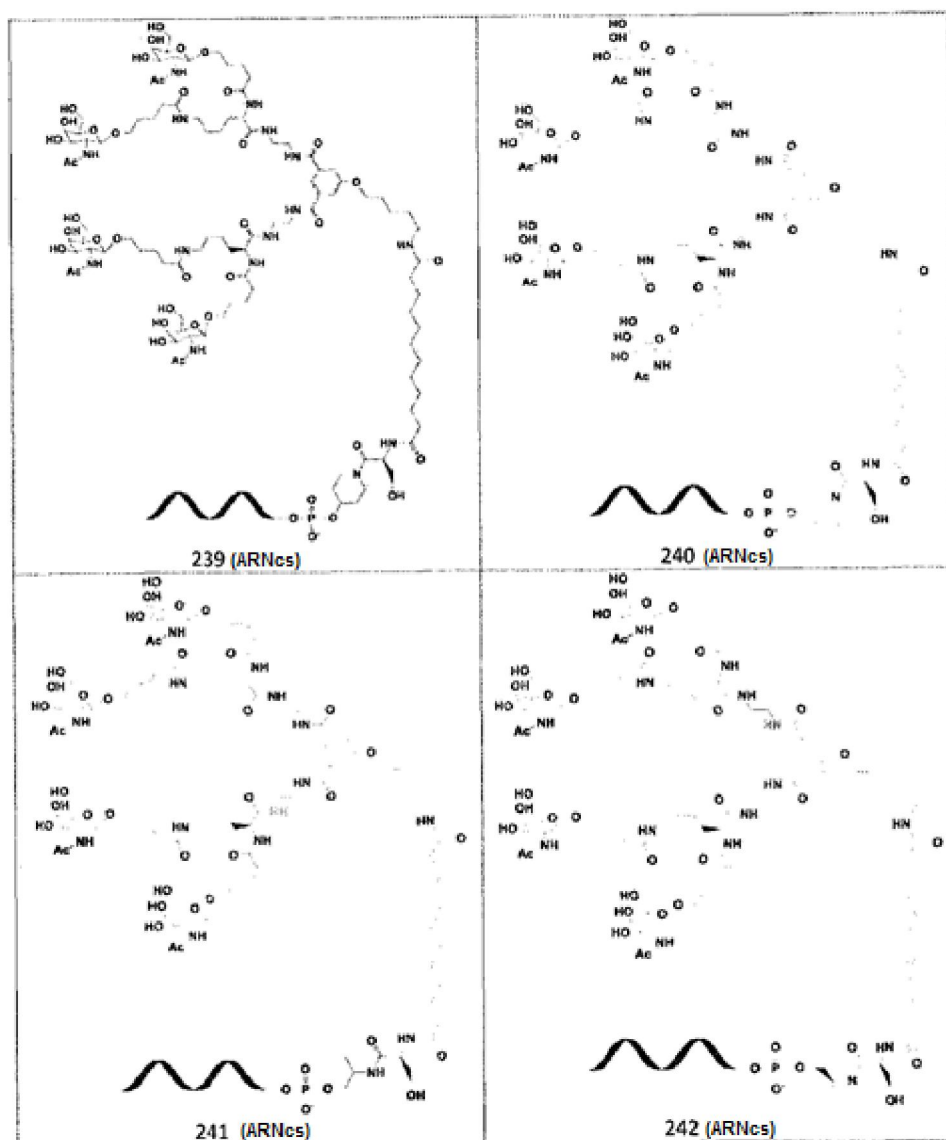


Tabla 39

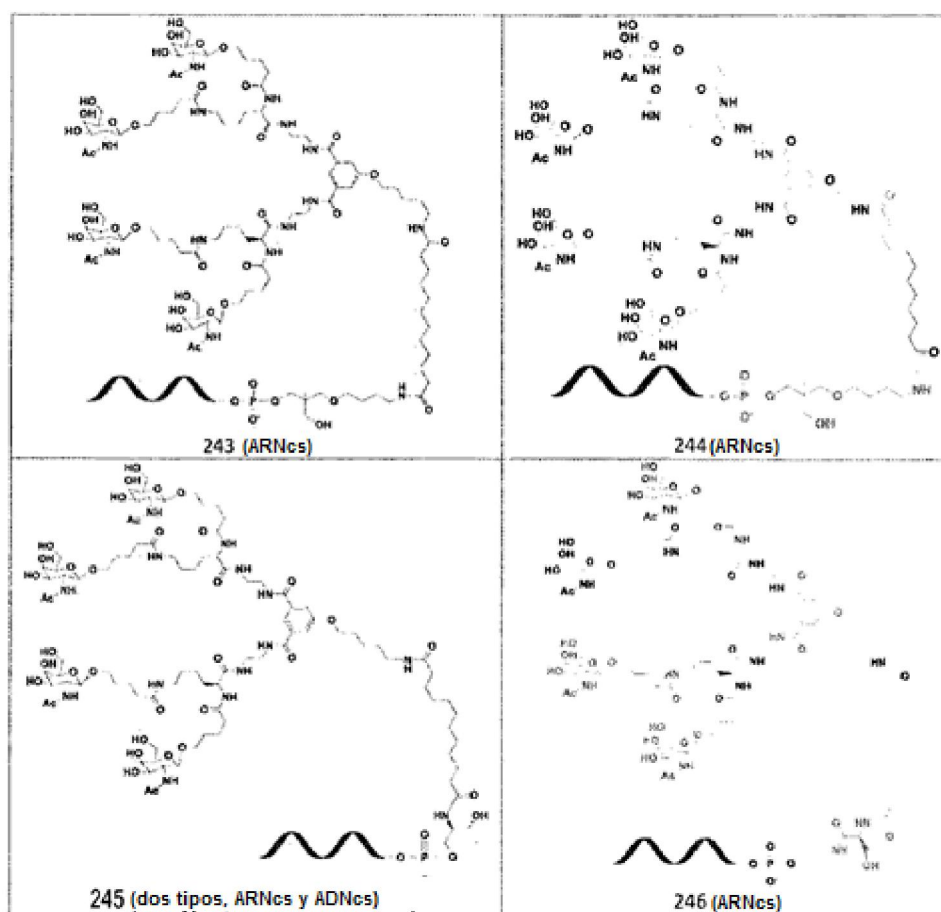


Tabla 40

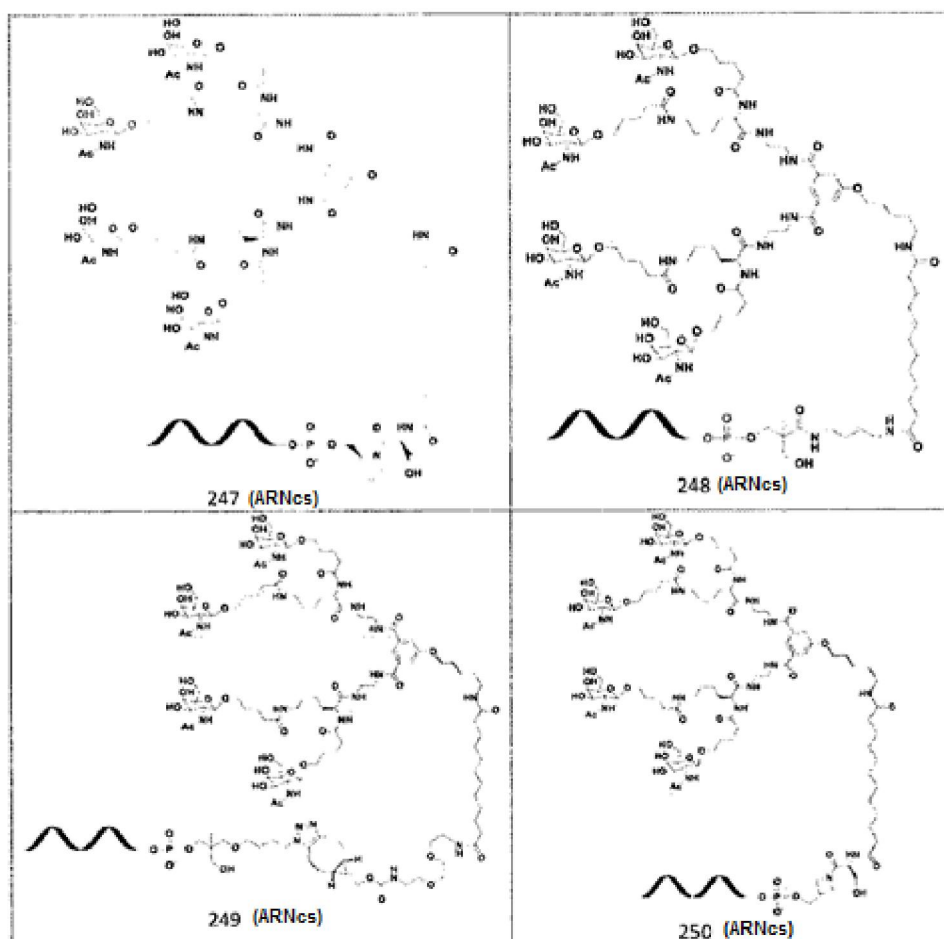


Tabla 41

Compuesto	Secuencia (5' a 3')	Peso molecular teórico	Encontrado
235_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>235</u>	8967	8966
236_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>236</u>	9009	9008
237_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>237</u>	9238	9238
238_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>238</u>	9063	9063
239_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>239</u>	9049	9049
240_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>240</u>	9049	9048

Compuesto	Secuencia (5' a 3')	Peso molecular teórico	Encontrado
241_3'-AT3-ssRNA	G(F) [^] G(M) [^] U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 241	9023	9022
242_3'-AT3-ssRNA	G(F) [^] G(M) [^] U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 242	9049	9049
243_3'-AT3-ssRNA	G(F) [^] G(M) [^] U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 243	9052	9051
244_3'-AT3-ssRNA	G(F) [^] G(M) [^] U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 244	9010	9009
245_3'-AT3-ssRNA	G(F) [^] G(M) [^] U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 245	8966	8966
245_3'-dT10	Tttttttt 245	5162	5161
246_3'-AT3-ssRNA	G(F) [^] G(M) [^] U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 246	9024	9023
247_3'-AT3-ssRNA	G(F) [^] G(M) [^] U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 247	9064	9063
248_3'-AT3-ssRNA	G(F) [^] G(M) [^] U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 248	9066	9064
249_3'-AT3-ssRNA	G(F) [^] G(M) [^] U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 249	9403	9403
250_3'-AT3-ssRNA	G(F) [^] G(M) [^] U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 250	9036	9037

Síntesis de conjugados de ácidos nucleicos 251 a 287

5 Se obtuvieron conjugados de ácidos nucleicos 251 a 287 de doble cadena de la misma manera que en la etapa 39 del Ejemplo 9 utilizando conjugados de ácidos nucleicos de cadena sencilla (ARNcs) 210 a 233 y 235 a 247.

Las secuencias de los conjugados de ácidos nucleicos sintetizados en este Ejemplo se muestran en las Tablas 42, 43, 45 y 47 a 54.

Tabla 42

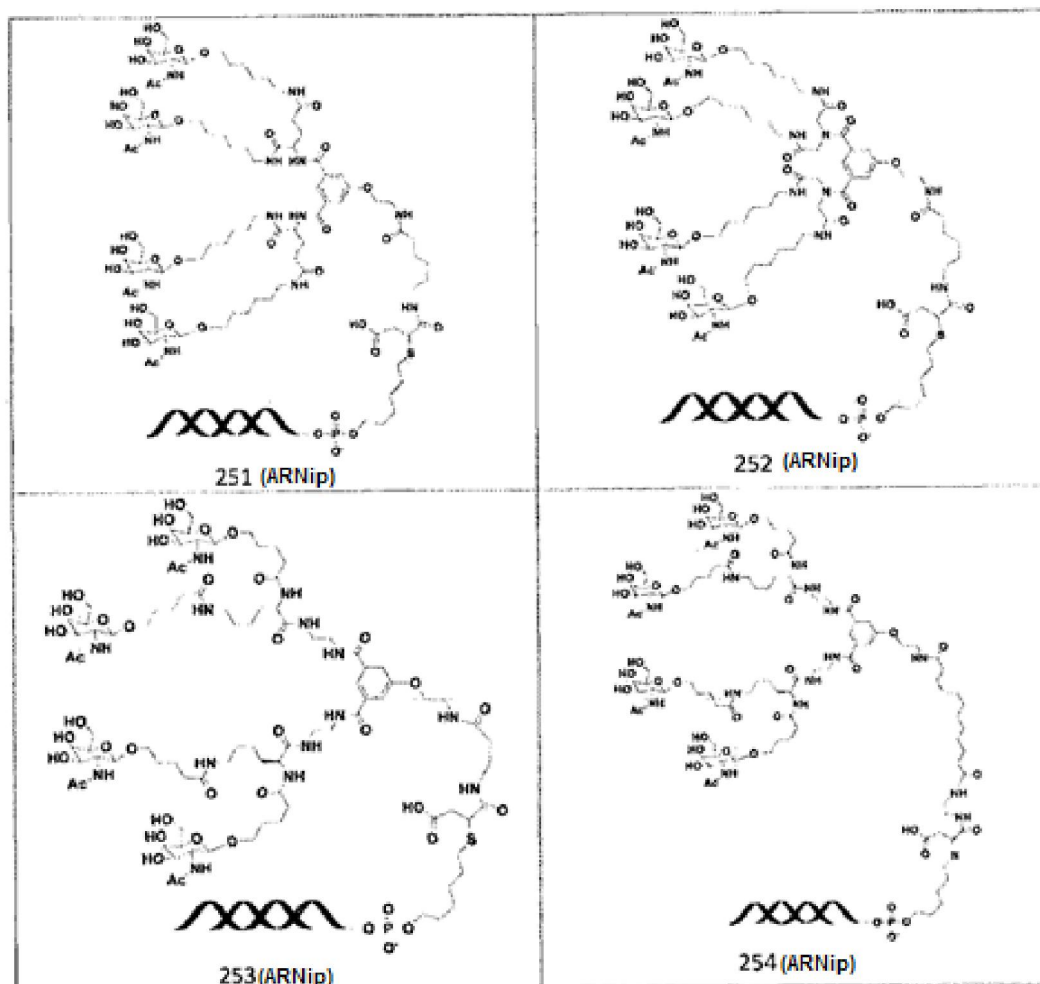


Tabla 43

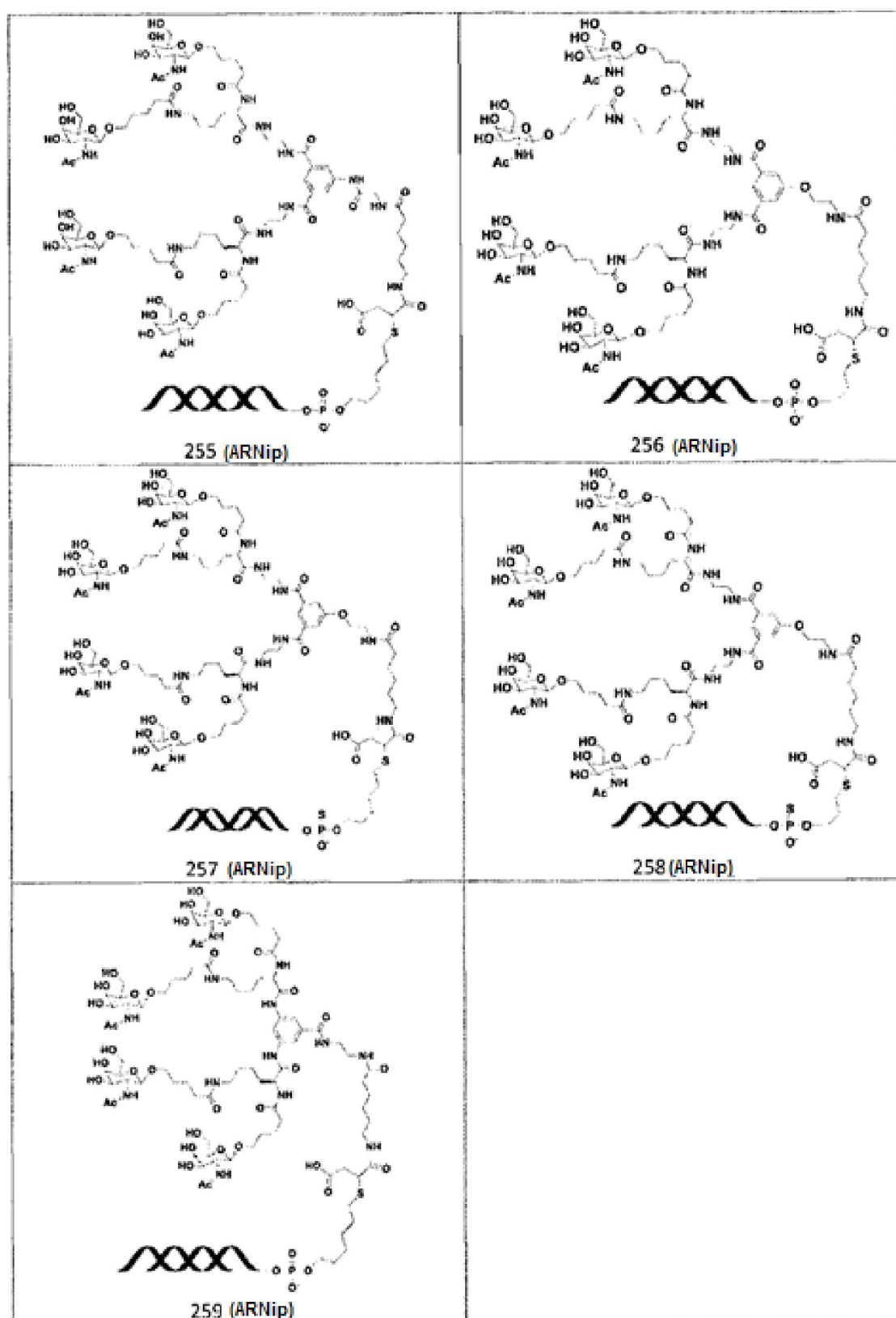


Tabla 44

Compuesto	Nombre de cadena sencilla	Secuencia (5' a 3')
251_3'-AT3-siRNA	210_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 210
252_3'-AT3-siRNA	211_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 211
253_3'-AT3-siRNA	212_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 212
254_3'-AT3-siRNA	213_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 213
255_3'-AT3-siRNA	214_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 214
256_3'-AT3-siRNA	215_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 215
257_3'-AT3-siRNA	216_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 216
258_3'-AT3-siRNA	217_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 217
259_3'-AT3-siRNA	218_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 218
-	AT3-asRNA	U(M)^U(F)^G(M)A(F)A(M)G(F)U(M)A(F)A(M)A(F) U(M)G(M)G(M)U(F)G(M)U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)C(M)^A(M)^G(M)

Tabla 45

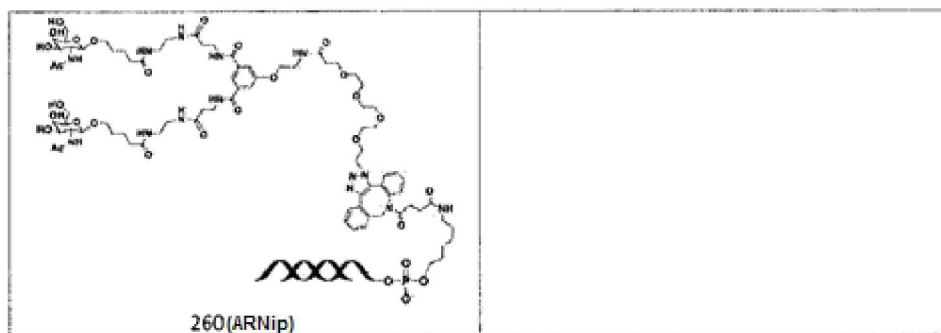


Tabla 46

Compuesto	Nombre de cadena sencilla	Secuencia (5' a 3')
260_5'-B2M-siRNA	218_5'-B2M-ssRNA	<u>219</u> A(F)G(M)G(F)A(M)C(F)U(M)G(F)G(M)U(F)C(M) U(F)U(F)U(M)C(F)U(M)A(F)U(M)C(F)U(M)^C(F)^U(M)
	B2M-asRNA	A(F)^G(M)^A(F)G(M)A(F)U(M)A(F)G(M)A(F)A(M)A(M) G(F)A(M)C(F)C(M)A(F)G(M)U(F)C(M)C(F)U(M)^U(F)^G(M)

Tabla 47

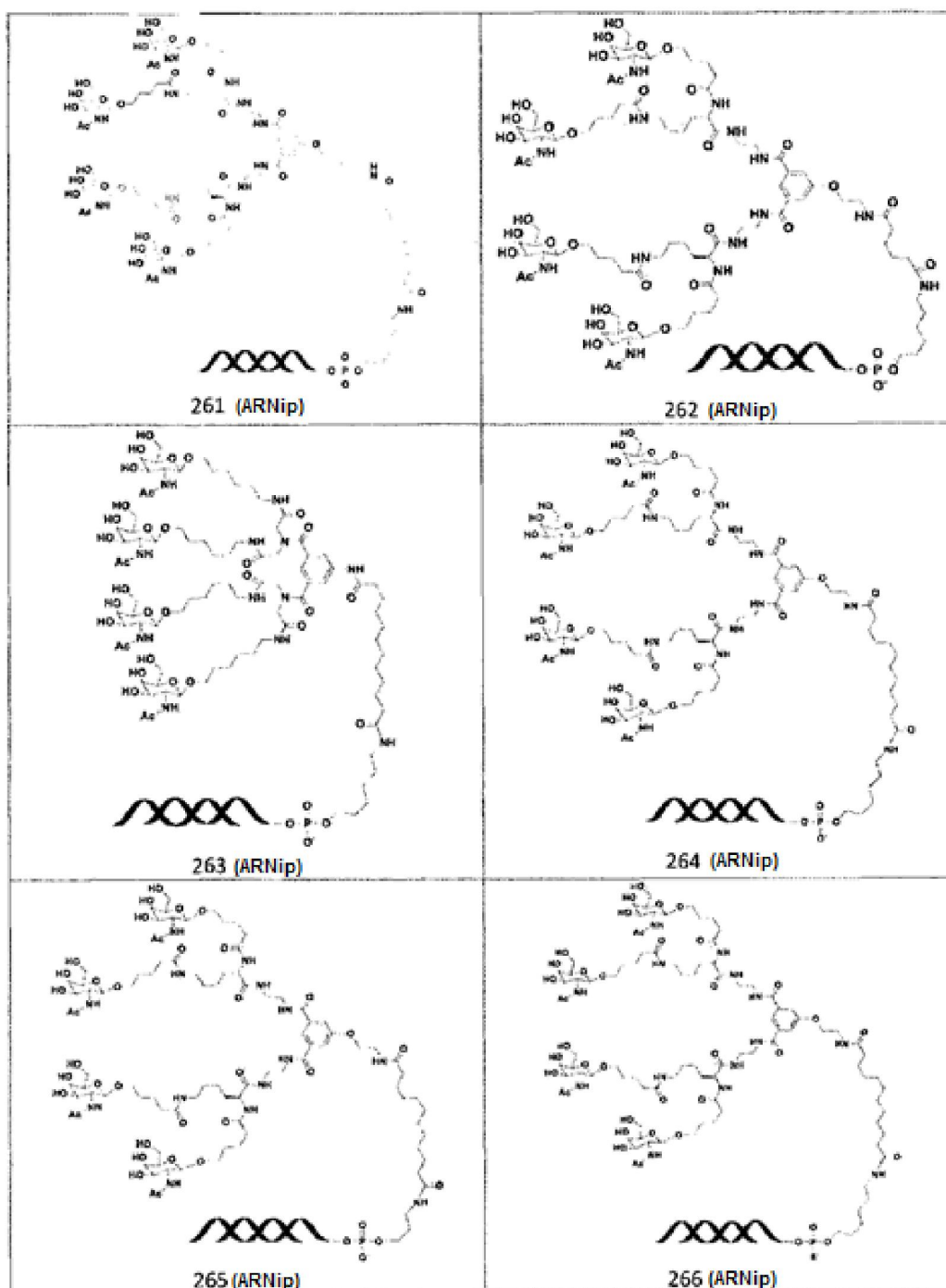
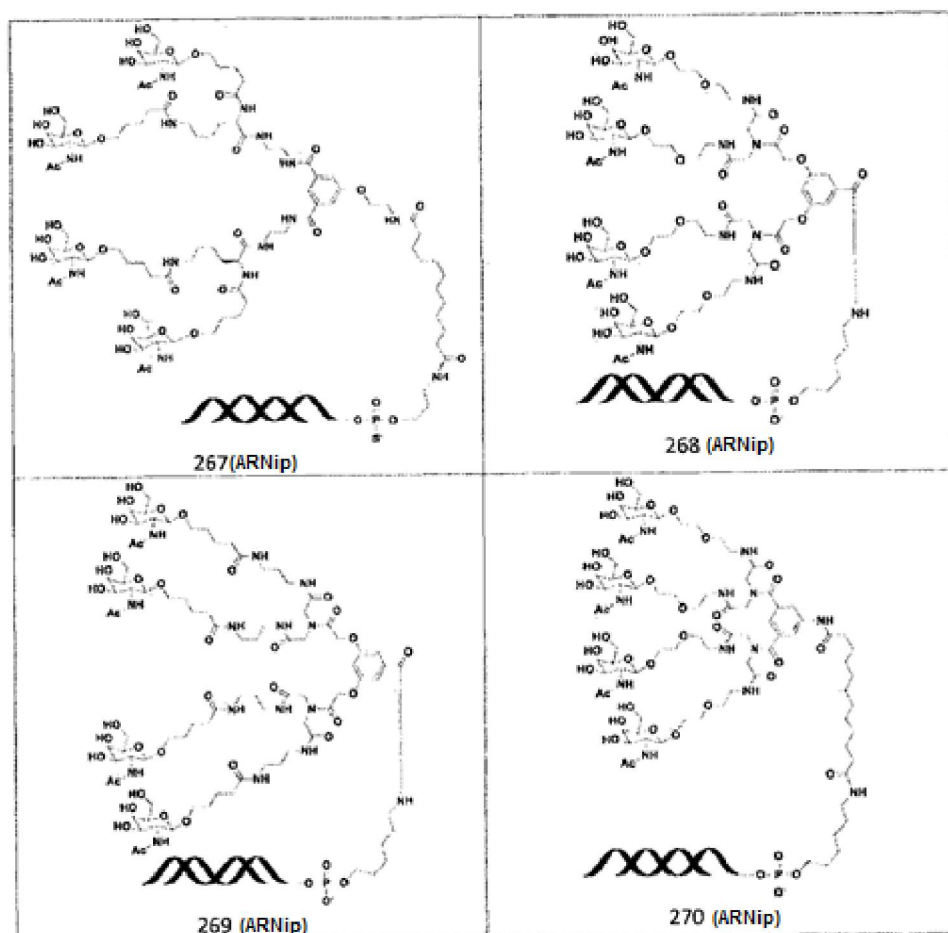


Tabla 48



5

Tabla 49

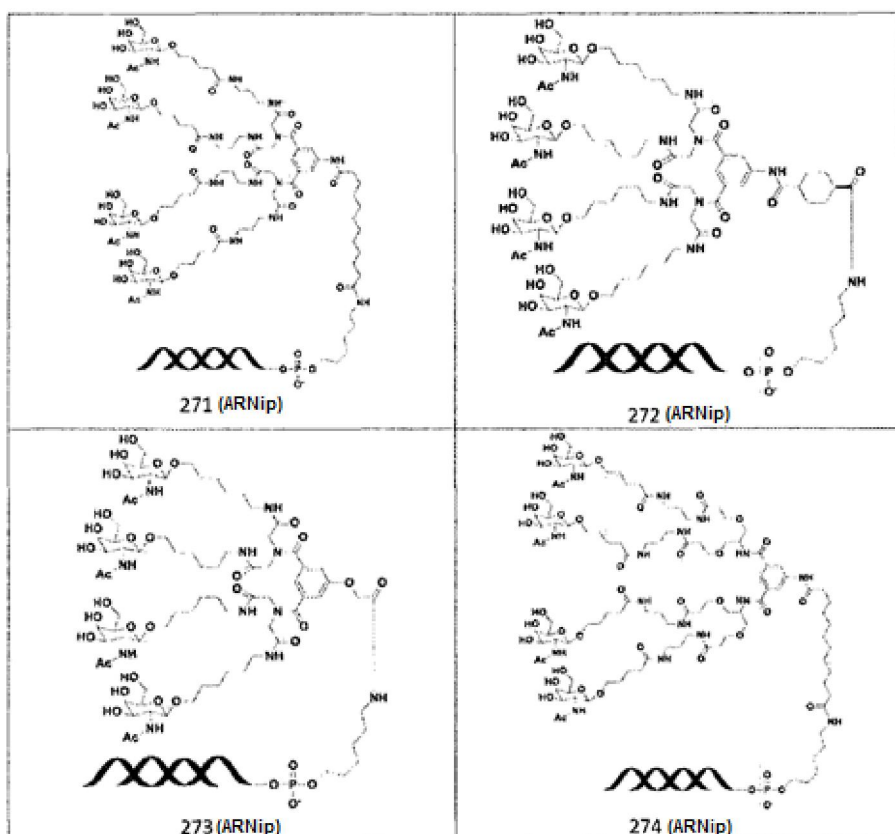


Tabla 50

Compuesto	Nombre de cadena sencilla	Secuencia (5' a 3')
261_3'-AT3-siRNA	220_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 220
262_3'-AT3-siRNA	221_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 221
263_3'-AT3-siRNA	222_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 222
264_3'-AT3-siRNA	223_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 223
265_3'-AT3-siRNA	224_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 224
266_3'-AT3-siRNA	225_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 225
267_3'-AT3-siRNA	226_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) 226

Compuesto	Nombre de cadena sencilla	Secuencia (5' a 3')
		(Continuación)
268_3'-AT3-siRNA	227_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>227</u>
269_3'-AT3-siRNA	228_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>228</u>
270_3'-AT3-siRNA	229_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>229</u>
271_3'-AT3-siRNA	230_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>230</u>
272_3'-AT3-siRNA	231_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>231</u>
273_3'-AT3-siRNA	232_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>232</u>
274_3'-AT3-siRNA	233_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>233</u>
-	AT3-asRNA	U(M)^U(F)^G(M)A(F)A(M)G(F)U(M)A(F)A(M)A(F) U(M)G(M)G(M)U(F)G(M)U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)C(M)^A(M)^G(M)

Tabla 51

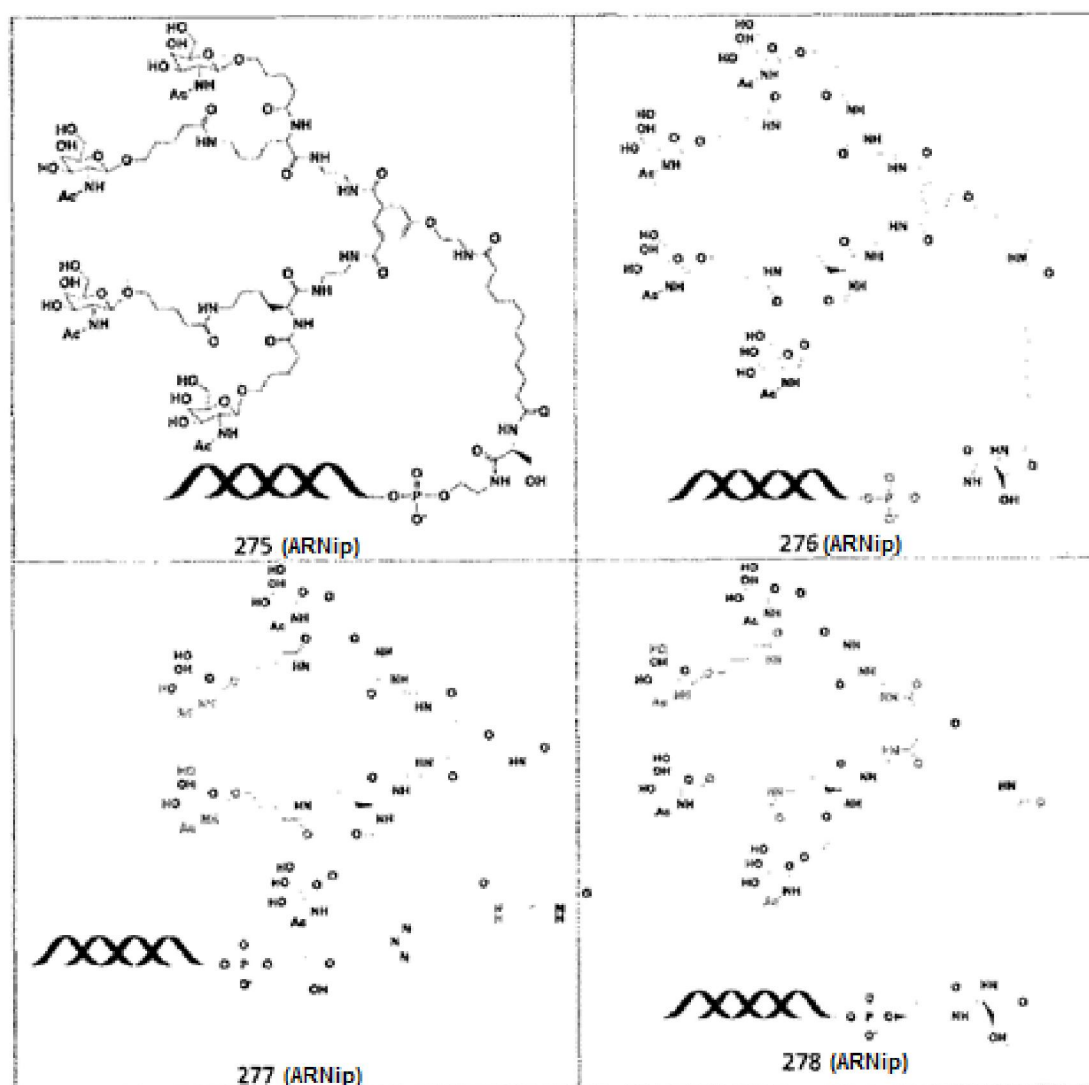


Tabla 52

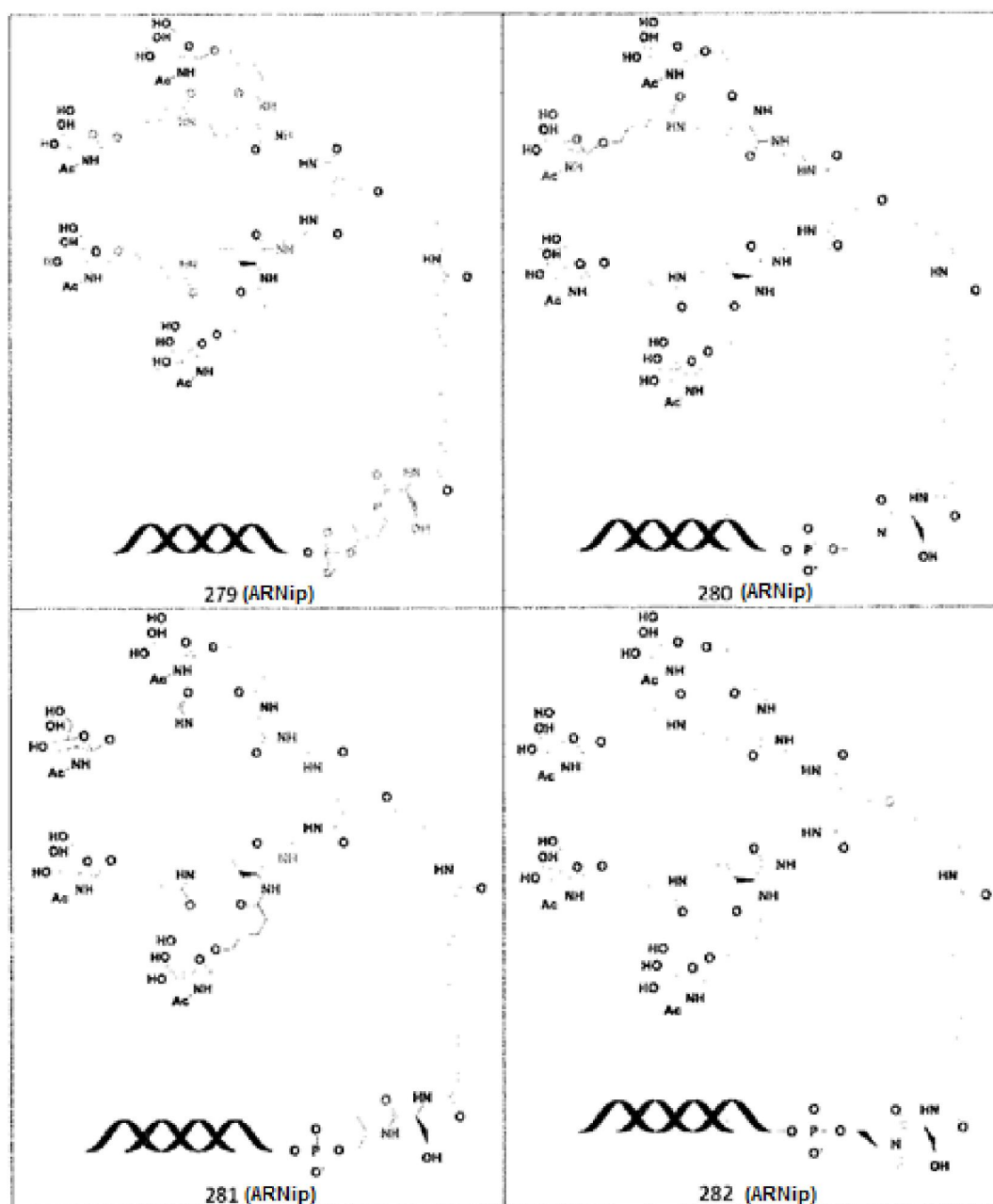


Tabla 53

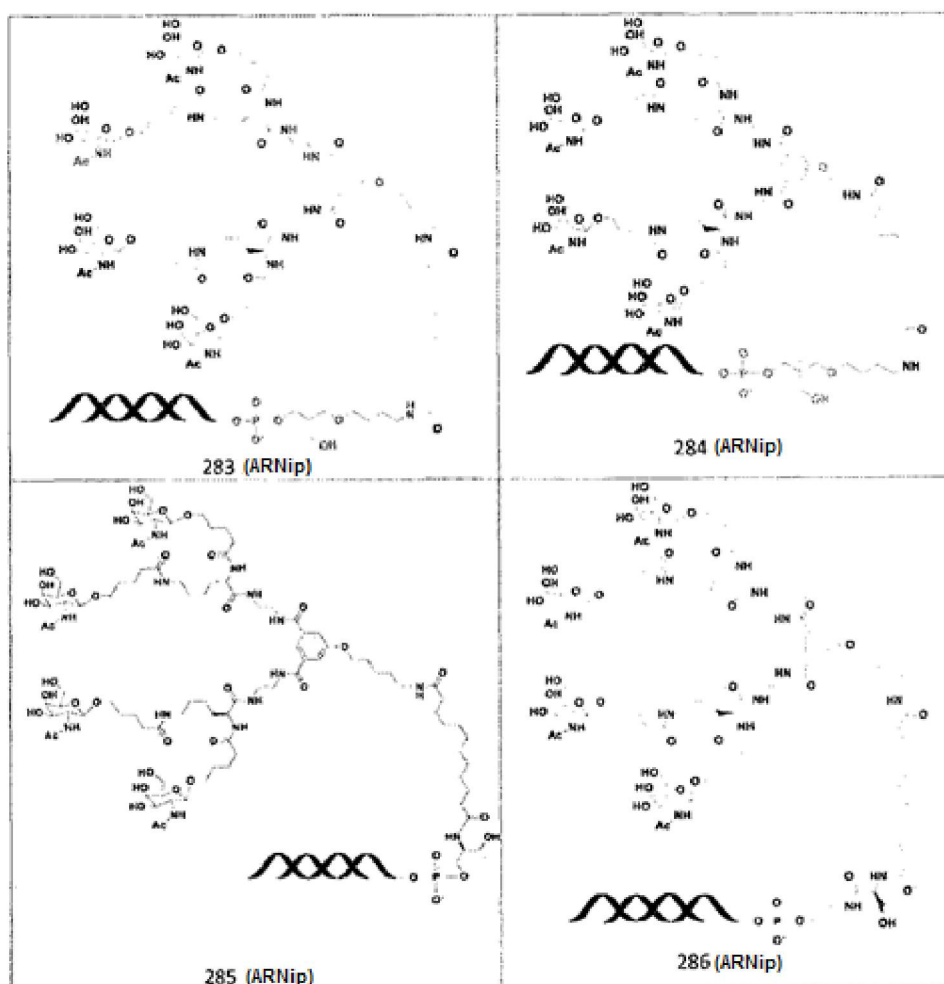


Tabla 54

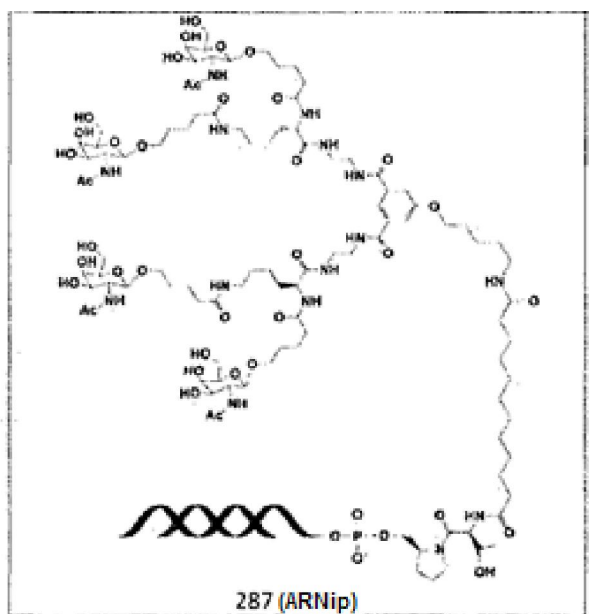
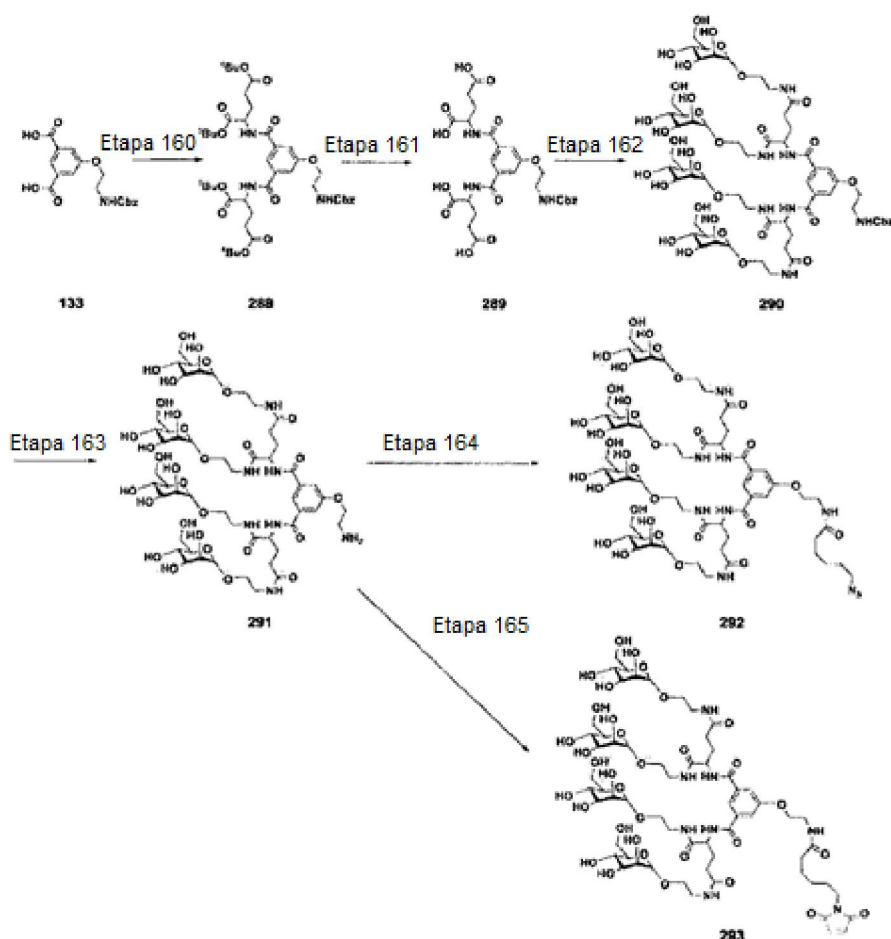


Tabla 55

Compuesto	Nombre de cadena sencilla	Secuencia (5' a 3')
275_3'-AT3-siRNA	235_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>235</u>
276_3'-AT3-siRNA	236_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>236</u>
277_3'-AT3-siRNA	237_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>237</u>
278_3'-AT3-siRNA	238_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>238</u>
279_3'-AT3-siRNA	239_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>239</u>
280_3'-AT3-siRNA	240_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>240</u>
281_3'-AT3-siRNA	241_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>241</u>
282_3'-AT3-siRNA	242_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>242</u>
283_3'-AT3-siRNA	243_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>243</u>
284_3'-AT3-siRNA	244_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>244</u>
285_3'-AT3-siRNA	245_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>245</u>
286_3'-AT3-siRNA	246_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>246</u>
287_3'-AT3-siRNA	247_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>247</u>

Ejemplo 16 Síntesis de unidad de ligando de azúcar-enlace



Etapa 160

5 El compuesto 288 se obtuvo en forma de un producto bruto de la misma manera que en la etapa 25 del Ejemplo 4 utilizando el compuesto 133 (0,5 g, 1,365 mmol) sintetizado en la etapa 99 del Ejemplos 13.

Etapa 161

10 El compuesto 289 se obtuvo en forma de un producto bruto de la misma manera que en la etapa 26 del Ejemplo 4 utilizando el compuesto 288 (0,296 g, 0,247 mmol) sintetizado en la etapa 160 del Ejemplos 16.

Etapa 162

15 El compuesto 290 (0,110 g, rendimiento: 31%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 8 del Ejemplo 1 utilizando el compuesto 289 (0,153 g, 0,247 mmol) sintetizado en la etapa 161 del Ejemplo 16 y 1-(2-azidoetil)-D-manopiranosido (0,221 g, 0,989 mmol), sintetizado por el método descrito en Inorganic Chemistry, Vol. 83, págs. 1000-1007, 2011.
ESI-MS m/z: 720 (M + H)⁺

Etapa 163

20 El compuesto 291 (0,077 g, rendimiento: 77%) se obtuvo de la misma manera que en la etapa 28 del Ejemplo 5 utilizando el compuesto 290 (0,110 g, 0,077 mmol) sintetizado en la etapa 162 del Ejemplo 16.
ESI-MS m/z: 1305 (M + H)⁺

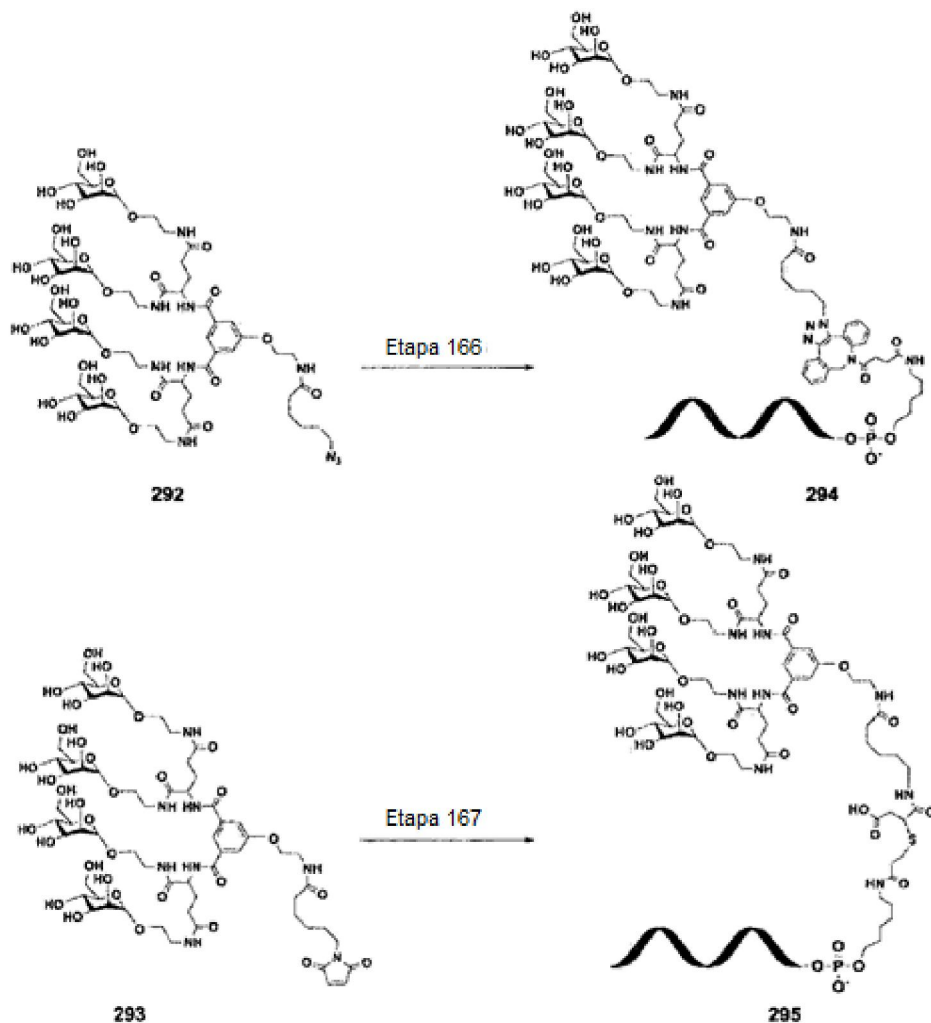
Etapa 164

30 El compuesto 291 (20 mg, 0,016 mmol), sintetizado en la etapa 163 del Ejemplos 16 y ácido 2,5-dioxopirrolidin-1-il 6-azidohexanoico (10 mg, 0,032 mmol) se disolvieron en tetrahidrofurano (2 mL). A la solución se añadió diisopropiletilamina (0,027 mL, 0,078 mmol) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla se purificó mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (Waters Corp., X Bridge C18, 5 µm, 4,6 mm x 250 mm, solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,01%, solución B: gradiente con acetonitrilo) para obtener el compuesto 292 (1,7 mg, rendimiento: 8%).
ESI-MS m/z: 1444 (M + H)⁺

Etapa 165

El compuesto 291 (20 mg, 0,016 mmol), sintetizado en la etapa 163 del Ejemplo 16 y N-(6-maleimidocaproiloxi)succinimida (9,6 mg, 0,031 mmol) se disolvieron en tetrahidrofurano (2 mL). A la solución se añadió diisopropiletilamina (0,027 mL, 0,078 mmol) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla se purificó mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (Waters Corp., X Bridge C18, 5 μ m, 4,6 mm x 250 mm, solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,01%, solución B: gradiente con acetonitrilo) para obtener el compuesto 293 (1,8 mg, rendimiento: 8%). ESI-MS m/z: 1498 (M + H)⁺

Ejemplo 17 Síntesis de conjugado de ácidos nucleicos



Etapa 166

Se obtuvo un conjugado de ácidos nucleicos 294 de cadena sencilla de la misma manera que en la etapa 40 del Ejemplo 10 utilizando el compuesto 292 sintetizado en la etapa 164 del Ejemplo 16.

Etapa 167

Se obtuvo un conjugado de ácidos nucleicos 295 de cadena sencilla de la misma manera que en la etapa 38 del Ejemplo 9 utilizando el compuesto 293 sintetizado en la etapa 165 del Ejemplo 16.

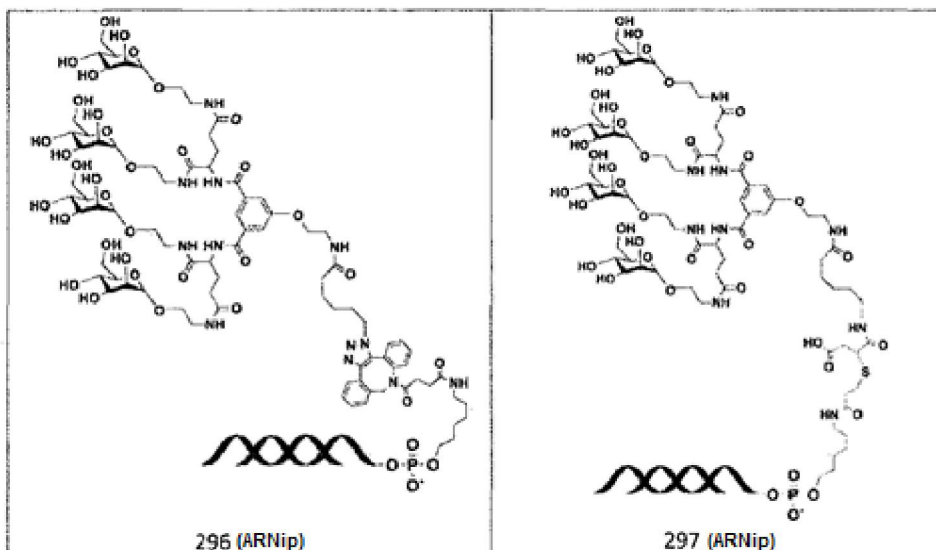
Las secuencias y los resultados de la espectrometría de masas de los conjugados de ácidos nucleicos sintetizados en este Ejemplo se muestran en la Tabla 56.

Tabla 56

Compuesto	Secuencia (5' a 3')	Peso molecular teórico	Encontrado
294_3'-B2M-ssRNA	A{F}G{M}G{F}A{M}C{F}U{M}G{F}G{M}U{F}C{M} U{F}U{F}U{M}C{F}U{M}A{F}U{M}C{F}U{M}^C{F}^U{M} 294	8692	8691
295_3'-Hprt1-ssRNA	U{F}C{M}C{F}U{M}A{F}U{M}G{F}A{M}C{F}U{M}G{F}U{M} A{F}G{M}A{F}U{M}U{F}U{M}U{F}A{M}U{F} 295	8524	8524

Los conjugados de ácidos nucleicos de doble cadena descritos en la Tabla 57 se obtuvieron de la misma manera que en la etapa 39 del Ejemplo 9 utilizando los conjugados de ácidos nucleicos descritos en la Tabla 56.

- 5 Las secuencias de los conjugados de ácidos nucleicos sintetizados en este Ejemplo se muestran en la Tabla 58.
Tabla 57



10 Tabla 58

Compuesto	Nombre de cadena sencilla	Secuencia (5' a 3')
296_B2M-siRNA	294_3'-B2M-ssRNA	A{F}G{M}G{F}A{M}C{F}U{M}G{F}G{M}U{F}C{M} U{F}U{F}U{M}C{F}U{M}A{F}U{M}C{F}U{M}^C{F}^U{M} 294
	B2M-as-RNA	A{F}^G{M}^A{F}G{M}A{F}U{M}A{F}G{M}A{F}A{M}A{M} G{F}A{M}C{F}C{M}A{F}G{M}U{F}C{M}C{F}U{M}^U{F}^G{M}
297_Hprt1-siRNA	295_3'-Hprt1-ssRNA	U{F}C{M}C{F}U{M}A{F}U{M}G{F}A{M}C{F}U{M}G{F}U{M} A{F}G{M}A{F}U{M}U{F}U{M}U{F}A{M}U{F} 295
	Hprt1-as-RNA	p-A{M}U{F}A{M}A{F}A{M}A{F}U{M}C{F}U{M}A{F}C{M}A{F} G{M}U{F}C{M}A{F}U{M}A{F}G{M}G{F}A{M}^A{F}^U{M}

Ejemplo de Ensayo 5 Actividad *In vitro* del conjugado de ácidos nucleicos contra la célula primaria del hígado de ratón

Entre los conjugados de ácidos nucleicos obtenidos en los Ejemplos y Ejemplos Comparativos, los descritos en la Tabla 59 se transfirieron cada uno a células de hígado primarias de ratón derivadas de CD-1 (fabricadas por Life Technologies Corp., N° Catálogo MSCP10) mediante el siguiente método.

5 Cada uno de los conjugados de ácidos nucleicos diluido con Opti-MEM (Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc., 31985) de manera que la concentración final fuera de 30, 10 o 3 nmol/L se dispensó a razón de 20 µL/pocillo a una placa de cultivo de 96 pocillos. A continuación, se inocularon células primarias del hígado de ratón suspendidas en Medio E de William (fabricado por Life Technologies Corp., N° de catálogo A12176-01) que contenía Complementos de Descongelación y Recubrimiento de Hepatocitos Primarios (fabricado por Life Technologies Corp., N° de Catálogo CM3000) a 12500
10 células/80µL/pocillo a la misma y se cultivaron a 37°C durante 6 horas bajo condiciones de 5% de CO₂. A continuación, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante del cultivo y se añadió a ello medio E de William que contenía Complementos de Descongelación y Recubrimiento de Hepatocitos Primarios (fabricado por Life Technologies Corp., N° de Catálogo CM4000). Las células no tratadas se inocularon como un grupo de control negativo.

15 Las células que albergan cada una de las preparaciones se cultivaron a 37°C durante 18 horas en una incubadora a 5% de CO₂ y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato enfriada con hielo. La recuperación de ARN total y la preparación de ADNc a través de la reacción de transcripción inversa utilizando el ARN total obtenido como molde se realizaron utilizando el kit SuperPrep Cell Lysis & RT para qPCR (fabricado por Toyobo Co., Ltd., número de catálogo SCQ-201) de acuerdo con el método descrito en las instrucciones adjuntas al producto.

20 El ADNc obtenido se utilizó como molde en la reacción PCR utilizando la Sonda de Ensayo de Expresión Génica TaqMan(R) (fabricada por Applied Biosystems, Inc.) como una sonda y el Sistema de PCR en Tiempo Real QuantStudio 12K Flex (fabricado por Applied Biosystems, Inc.) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones adjunto para amplificar el inhibidor de la peptidasa de serpina, clado C (antitrombina), gen del miembro 1 (también denominado antitrombina III; en lo sucesivo, AT3) y un gen expresado constitutivamente D-gliceraldehído-3-fosfato gen de la
25 deshidrogenasa (en lo sucesivo, gapdh). Se midieron sus respectivos niveles de amplificación de ARNm, y se calculó el valor semi-cuantitativo de ARNm de AT3 con el nivel de amplificación de ARNm de gapdh como control interno. La tasa de expresión de ARNm de AT3 se determinó a partir del valor semi-cuantitativo de ARNm de AT3 cuando el valor semi-cuantitativo de ARNm de AT3 en el control negativo medido de la misma manera que antes se definió como 1. Los
30 resultados obtenidos sobre la tasa de expresión de ARNm de AT3 se muestran en las Tablas 60 a 66 como una tasa de inhibición frente a la tasa de expresión de ARNm de AT3 del control negativo.

Tabla 59

Sustancia de ensayo N°	Compuesto N°
1	AT3-siRNA
2	53(3'-AT3-siRNA)
3	42(3'-AT3-siRNA)
4	264(3'-AT3-siRNA)
5	261(3'-AT3-siRNA)
6	285(3'-AT3-siRNA)
7	251(3'-AT3-siRNA)
8	252(3'-AT3-siRNA)
9	275(3'-AT3-siRNA)
10	276(3'-AT3-siRNA)
11	277(3'-AT3-siRNA)
12	278(3'-AT3-siRNA)
13	279(3'-AT3-siRNA)
14	280(3'-AT3-siRNA)
15	281(3'-AT3-siRNA)
16	282(3'-AT3-siRNA)
17	283(3'-AT3-siRNA)
18	284(3'-AT3-siRNA)
19	262(3'-AT3-siRNA)

Sustancia de ensayo N°	Compuesto N°
(Continuación)	
20	263(3'-AT3-siRNA
21	255(3'-AT3-siRNA)
22	253(3'-AT3-siRNA)
23	254(3'-AT3-siRNA)
24	257(3'-AT3-siRNA)
25	256(3'-AT3-siRNA)
26	258(3'-AT3-siRNA)
27	266(3'-AT3-siRNA)
28	265(3'-AT3-siRNA)
29	267(3'-AT3-siRNA)
30	268(3'-AT3-siRNA)
31	269(3'-AT3-siRNA)
32	270(3'-AT3-siRNA)
33	271(3'-AT3-siRNA)
34	272(3'-AT3-siRNA)
35	273(3'-AT3-siRNA)
36	274(3'-AT3-siRNA)
37	286(3'-AT3-siRNA)
38	287(3'-AT3-siRNA)

Tabla 60

Nivel de ARNm de AT3 [% tasa de inhibición]			
	Dosis [nmol/L]		
Sustancia de ensayo N°	30	10	3
1	16,24	-7,51	19,07
2	-1,77	-0,39	11,50
3	78,72	64,66	35,07
4	79,29	65,43	36,90
5	73,61	62,53	40,42

Tabla 61

Nivel de ARNm de AT3 [% tasa de inhibición]			
	Dosis [nmol/L]		
Sustancia de ensayo N°	30	10	3
1	18,78	12,29	3,78
6	89,90	79,76	56,89
7	83,00	76,72	56,30
8	81,80	76,27	55,76

5

Tabla 62

Nivel de ARNm de AT3 [% tasa de inhibición]			
	Dosis [nmol/L]		
Sustancia de ensayo N°	30	10	3
1	-4,22	-9,92	-6,34
9	96,88	91,91	73,54
10	96,70	93,00	80,95
11	97,58	95,21	86,62
12	97,13	94,73	82,98
13	97,97	94,97	83,79
14	97,41	93,87	82,14
15	97,38	93,23	79,17

Tabla 63

Nivel de ARNm de AT3 [% tasa de inhibición]			
	Dosis [nmol/L]		
Sustancia de ensayo N°	30	10	3
1	-4,23	6,14	9,84
16	98,66	97,09	90,01
17	97,26	96,22	83,87
18	97,90	95,52	84,55

Tabla 64

Nivel de ARNm de AT3 [% tasa de inhibición]			
	Dosis [nmol/L]		
Sustancia de ensayo N°	30	10	3
1	23,69	20,34	14,53
19	86,37	79,19	62,23
20	87,08	74,57	50,87
21	89,22	81,76	56,49
22	92,86	84,12	51,84
23	84,52	76,64	48,04

5

Tabla 65

Nivel de ARNm de AT3 [% tasa de inhibición]			
	Dosis [nmol/L]		
Sustancia de ensayo N°	30	10	3
1	-0,23	8,53	2,86
24	96,58	92,42	78,16
25	94,48	89,26	72,88
26	94,47	92,33	71,75
27	96,76	93,45	76,89
28	95,70	92,72	68,85
29	96,84	93,35	78,31

Nivel de ARNm de AT3 [% tasa de inhibición]			
	Dosis [nmol/L]		
Sustancia de ensayo N°	30	10	3
30	94,26	89,68	71,60
31	95,63	91,91	71,05
32	95,65	91,54	72,53
33	94,91	91,84	79,27

Tabla 66

Nivel de ARNm de AT3 [% tasa de inhibición]			
	Dosis [nmol/L]		
Sustancia de ensayo N°	30	10	3
1	-3,22	10,06	-12,88
34	97,67	96,70	88,26
35	97,18	96,13	89,84
36	96,80	95,47	87,56
37	98,10	96,09	88,26
38	97,55	96,19	88,25

5 Como es evidente a partir de las Tablas 60 a 66, el conjugado de ácidos nucleicos de la presente invención (sustancia de ensayo N°s 3 a 38) inhibió la expresión de ARNm del gen AT3 después de la transferencia a células del hígado primarias de ratón.

Ejemplo de Ensayo 6 Actividad *In vitro* del conjugado de ácidos nucleicos contra ratón

10 Entre los conjugados de ácidos nucleicos obtenidos en los Ejemplos y Ejemplos Comparativos, los descritos en la Tabla 59 se sometieron cada uno a un test de evaluación *in vivo* mediante el siguiente método. Cada uno de los conjugados de ácidos nucleicos utilizados se diluyó con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) (fabricada por Nacalai Tesque, Inc.) de acuerdo con el ensayo. Después de la aclimatación de los ratones (BALB/cA, obtenidos de CLEA Japan Inc.), se administró cada uno de los conjugados de ácidos nucleicos a 1,5 mg/kg o 0,5 mg/kg a los ratones mediante

15 inyección subcutánea. Para un grupo de control, se administró PBS solo a los ratones mediante inyección subcutánea. Tres días después de la administración, se extrajo sangre de la vena poscava bajo anestesia con isoflurano. La sangre recogida se mezcló con una solución anticoagulante que contenía citrato de sodio 3,2 M y D-glucosa 5 mmol/L en una relación de volumen de 9:1, y se recuperó un sobrenadante después de la centrifugación para obtener plasma. Después de la recogida de sangre, los animales fueron sacrificados y los hígados fueron recolectados y crioconservados en

20 nitrógeno líquido. A partir de las muestras de hígado crioconservadas, se recuperó el ARN total utilizando Reactivos de Aislamiento de ARN TRIzol(R) (fabricados por Life Technologies Corp., N° de Catálogo 15596026) y RNeasy Mini Kit (fabricado por Qiagen N.V., N° de Catálogo 74106) de acuerdo con los métodos descritos en las instrucciones adjuntas a los productos. ADNc se preparó adicionalmente mediante una reacción de transcripción inversa con el ARN total obtenido como molde utilizando el kit de síntesis de ADNc Transcriptor First Strand (fabricado por F. Hoffmann-La Roche, Ltd., N° de Catálogo 04897030001) de acuerdo con el método descrito en las instrucciones adjuntas al producto. El ADNc obtenido

25 se utilizó como molde en la reacción de PCR utilizando la Sonda de Ensayo de Expresión Génica TaqMan(R) (fabricada por Applied Biosystems, Inc.) como una sonda y el Sistema de PCR en Tiempo Real QuantStudio 12K Flex (fabricado por Applied Biosystems, Inc.) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones adjunto para amplificar el gen AT3 y el gen gapdh. Se midieron sus respectivos niveles de amplificación de ARNm, y se calculó el valor semi-cuantitativo de ARNm de AT3 con el nivel de amplificación de ARNm de AT3 como control interno. La tasa de expresión de ARNm de AT3 se determinó a partir del valor semi-cuantitativo de ARNm de AT3 cuando el valor semi-cuantitativo de ARNm de AT3 en el grupo control medido de la misma manera que antes se definió como 1. Además, una concentración de proteína AT3 en el plasma se midió utilizando el kit ELISA de Ratón Antitrombina III (fabricado por Abcam Inc., N° de Catálogo ab108800) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. La tasa de inhibición obtenida de la

30 expresión de ARNm de AT3 y la concentración de proteína AT3 en el plasma se muestran en las Tablas 67 a 69.

Tabla 67

	Nivel de ARNm de AT3 en hígado [% tasa de inhibición]		Concentración de proteína AT3 en plasma [µg/mL]	
	Dosis [mg/kg]		Dosis [mg/kg]	
Sustancia de ensayo N°	1,5	0,5	1,5	0,5
Control	-		323,05	
2	-13,30	-15,10	303,47	375,88
3	42,85	14,50	212,26	258,78
4	26,74	19,04	243,16	336,67
5	10,76	1,56	281,52	377,74
6	69,39	33,88	160,10	278,20
7	46,36	23,11	189,61	306,61
8	44,26	27,25	205,49	232,32

Tabla 68

	Nivel de ARNm de AT3 en hígado [% tasa de inhibición]		Concentración de proteína AT3 en plasma [µg/mL]	
	Dosis [mg/kg]		Dosis [mg/kg]	
Sustancia de ensayo N°	1,5	0,5	1,5	0,5
Control	-		406,25	
9	52,36	33,71	207,82	271,94
10	46,36	19,93	189,70	283,51
11	61,22	30,09	161,69	263,98
12	66,19	35,34	153,92	256,08
13	63,52	28,98	175,91	277,52
14	66,26	30,95	147,01	248,54
15	61,97	26,39	153,46	258,51
16	54,95	45,75	175,40	234,00
17	50,93	29,41	149,33	266,16
18	57,82	32,22	180,48	314,41

Tabla 69

	Nivel de ARNm de AT3 en hígado [% tasa de inhibición]		Concentración de proteína AT3 en plasma [µg/mL]	
	Dosis [mg/kg]		Dosis [mg/kg]	
Sustancia de ensayo N°	1,5	0,5	1,5	0,5
Control	-		430,38	
19	50,65	26,74	235,75	294,03
20	33,17	16,66	228,00	334,38
21	42,26	25,95	230,60	298,86
22	44,79	12,90	233,16	297,65
24	76,00	39,22	125,91	258,13
25	65,05	39,20	154,28	242,88

	Nivel de ARNm de AT3 en hígado [% tasa de inhibición]		Concentración de proteína AT3 en plasma [µg/mL]	
	Dosis [mg/kg]		Dosis [mg/kg]	
27	77,76	37,94	143,83	255,37
28	46,70	21,10	233,87	312,41
29	73,38	30,03	161,78	237,47
30	68,94	25,92	169,58	222,12
31	55,87	17,95	172,05	273,52
32	55,38	7,30	200,17	286,96
33	53,60	-8,73	207,01	290,95

Como es evidente a partir de las Tabla 67 a 69, el conjugado de ácidos nucleicos de la presente invención (sustancia de ensayo N°s 3a 22, 24, 25 y 27 a 33) redujo la expresión del gen AT3 y disminuyó la concentración de proteína AT3 en sangre *in vivo*.

5

Ejemplo de Ensayo 7 Actividad *In vitro* del conjugado de ácidos nucleicos contra la célula del hígado primaria humana

ARNip de B2M (sustancia de ensayo 39) y ARNip de 260_3'-B2M (sustancia de ensayo 40) obtenidos en el Ejemplo 15 se transfirieron cada uno a células del hígado primarias humanas (fabricadas por Biopredic International, N° de Catálogo HEP187) mediante el siguiente método.

10

Cada uno de los conjugados de ácidos nucleicos diluido con Opti-MEM (Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc., 31985) de manera que la concentración final fuera de 300, 100, 30, 10, 3 o 1 nmol/L se dispensó a razón de 20 µL/pocillo a una placa de cultivo de 96 pocillos. Entonces, las células del hígado primarias humanas se suspendieron a razón de $1,25 \times 10^5$ células/mL en medio de Plating (fabricado por Biopredic International, N° de Catálogo LV0304-2) se inocularon en células/80µL/ pocillo a los mismos y se cultivaron a 37°C durante 6 horas en condiciones de 5% de CO₂. A continuación, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante del cultivo y a ello se añadió medio de incubación (fabricado por Biopredic International, N° de Catálogo LV0304-2). Las células no tratadas se inocularon como un grupo de control negativo.

15

20

Las células que albergan cada una de las preparaciones se cultivaron a 37°C durante 18 horas en una incubadora a 5% de CO₂ y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato enfriada con hielo. La recuperación de ARN total y la preparación de ADNc a través de la reacción de transcripción inversa utilizando el ARN total obtenido como molde se realizaron utilizando el kit SuperPrep Cell Lysis & RT para qPCR (fabricado por Toyobo Co., Ltd., número de catálogo SCQ-201) de acuerdo con el método descrito en las instrucciones adjuntas al producto.

25

El ADNc obtenido se utilizó como molde en la reacción de PCR utilizando la Sonda de Ensayo de Expresión Génica TaqMan(R) (fabricada por Applied Biosystems, Inc.) como una sonda y el Sistema de PCR en Tiempo Real QuantStudio 12K Flex (fabricado por Applied Biosystems, Inc.) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones adjunto para amplificar el gen de microglobulina beta-2 (al que se alude en adelante como B2M) y un gen expresado constitutivamente D-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (al que se alude en adelante como gapdh). Se midieron sus respectivos niveles de amplificación de ARNm, y se calculó el valor semi-cuantitativo de ARNm de B2M con el nivel de amplificación de ARNm de gapdh como control interno. La tasa de expresión de ARNm de B2M se determinó a partir del valor semi-cuantitativo de ARNm de B2M cuando el valor semi-cuantitativo de ARNm de B2M en el control negativo medido de la misma manera que antes se definió como 1. Los resultados obtenidos sobre la tasa de expresión de ARNm de B2M se muestran en la Tabla 70 como una tasa de inhibición frente a la tasa de expresión de ARNm de B2M del control negativo.

35

Tabla 70

Sustancia de ensayo	Sustancia de ensayo ARNip de 39(B2M)					
Dosis [nmol/L]	300	100	30	10	3	1
Nivel de ARNm de B2M [% tasa de inhibición]	37,1	34,1	23,2	20,7	9,9	-6,4
Sustancia de ensayo	Sustancia de ensayo ARNip de 40(260_3'-B2M)					
Dosis [nmol/L]	300	100	30	10	3	1
Nivel de ARNm de B2M [% tasa de inhibición]	89,3	84,0	77,2	61,9	40,0	15,8

40

Ejemplo de Ensayo 8 Evaluación de la actividad de inactivación de ARNm del conjugado de ácidos nucleicos contra células macrófagas derivadas de monocitos humanos

Se lisaron células humanas de monocitos CD14-positivos (monocitos NPB-CD14 + congelados sin tocar, fabricados por AllCells, PB011F) de acuerdo con el protocolo adjunto utilizando medio RPMI1640 (fabricado por Nacalai Tesque, Inc., 30264-56) que contenía suero bovino fetal al 10% (al que se alude en adelante como medio FBS RPMI1640 al 10%) y solución de DNasa I (fabricada por StemCell Technologies Inc.,

07900). A continuación, se añadió a ello proteína CF de GM-CSF humana recombinante (fabricada por R&D Systems, Inc., 215-GM-050/CF) (a la que se alude en adelante como GM-CSF) de manera que la concentración final fue de 100 ng/mL. Las células se inocularon a una densidad de 10^6 células/mL a una multi-placa (fabricada por SUMILON/Sumitomo Bakelite Co., Ltd., MS-8196F5) y se cultivaron a 37°C bajo condiciones de 5% de CO₂.

Seis días después del inicio del cultivo, se eliminó el sobrenadante del cultivo y se añadieron a cada uno de los pocillos 80 µL de medio FBS RPMI1640 al 10% que contenía 100 ng/mL de GM-CSF.

Las muestras de ensayo utilizadas eran conjugado de ácidos nucleicos ARNip 296_3'-B2M (sustancia de ensayo 41) que fija como objetivo microglobulina beta-2 (a la que se alude en adelante como B2M) y HPRT-1 y ARNip de B2M (sustancia de ensayo 42) como control correspondiente al conjugado de ácidos nucleicos. La concentración final de la muestra de ensayo se estableció en 3 concentraciones: 1 µmol/L, 0,3 µmol/L y 0,1 µmol/L. El ensayo se realizó a N = 3.

La solución de conjugado de ácidos nucleicos se diluyó mediante los siguientes procedimientos: se diluyó una solución de ácidos nucleicos preparada con una solución tampón citrato (citrato 20 mM (pH 7), NaCl 150 mM) utilizando medio de suero reducido Opti-MEM(R) I (fabricado por Life Technologies Corp., 31985-070). Se añadieron 20 µL de la solución de ácidos nucleicos diluida al lisado celular, al tiempo que se añadían 20 µL de una solución tampón de citrato libre de ácidos nucleicos/solución mixta Opti-MEM al grupo de control negativo, seguido de cultivo a 37°C bajo condiciones de 5% de CO₂ durante 4 días.

Se preparó un lisado celular que contenía ARN utilizando el kit SuperPrep(R) Cell Lysis & RT para qPCR (fabricado por Toyobo Co., Ltd., SCQ-101), y se preparó ADNc mediante una reacción de transcripción inversa utilizando el kit RT para qPCR unido al kit de acuerdo con las instrucciones adjuntas al kit.

Este ADNc se utilizó como molde para la reacción PCR, y el método de la sonda Taqman se llevó a cabo utilizando QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (fabricado por Applied Biosystems, Inc.) de la siguiente manera: en el caso de cuantificar un efecto de inactivación en el gen B2M, B2M y genes HPRT-1 de control se sometieron cada uno a una reacción de PCR. Se midieron sus respectivos niveles de amplificación de ARNm, y se calculó el valor semi-cuantitativo de ARNm de B2M con el nivel de amplificación de ARNm de HPRT-1 como un control interno.

El gen B2M se midió utilizando la sonda TaqMan Hs00187842_m1 (fabricada por Applied Biosystems, Inc.) y utilizando TaqMan Gene Expression Master Mix (fabricada por Applied Biosystems, Inc., 4369542) como reactivo de reacción de acuerdo con el protocolo adjunto. El nivel de ARNm diana del ácido nucleico se calculó como una relación relativa cuando el nivel de ARNm de B2M en el grupo de control negativo (grupo de ácidos nucleicos no transferido) se definió como 1. Los resultados que indican la relación relativa del nivel de ARNm por media \pm desviación estándar se muestran en la Tabla 71.

Tabla 71

Sustancia de ensayo	Sustancia de ensayo 42 (ARNip de B2M)			Sustancia de ensayo 41 (ARNip de 296_3'-B2M)		
Dosis [nmol/L]	1	0,3	0,1	1	0,3	0,1
Nivel de ARNm de B2M [% tasa de inhibición]	-1,5	-16,5	-0,08	40,9	34,7	29,0

Estos resultados demostraron que el conjugado de ácidos nucleicos de la presente invención (sustancia de ensayo 41) exhibe un efecto de inactivación significativo sobre los macrófagos derivados de monocitos humanos, en comparación con el ARNip de B2M control (sustancia de ensayo 42).

Aplicabilidad Industrial

El conjugado de ácidos nucleicos de la presente invención puede utilizarse para tratar diversas enfermedades relacionadas *in vivo* mediante administración a mamíferos.

Ensayo Libre de Listado de Secuencias

SEQ ID NO: 1 representa la secuencia de nucleótidos de ApoBASO.
SEQ ID NO: 2 representa la secuencia de nucleótidos de ARN de AT3.
SEQ ID NO: 3 representa la secuencia de nucleótidos de ARN de AT3.

SEQ ID NO: 4 representa la secuencia de nucleótidos de ARN de B2M.
 SEQ ID NO: 5 representa la secuencia de nucleótidos de ARN de B2M.
 SEQ ID NO: 6 representa la secuencia de nucleótidos de CD45ASO.
 SEQ ID NO: 7 representa la secuencia de nucleótidos de 3'-dT10.
 5 SEQ ID NO: 8 representa la secuencia de nucleótidos de ARN de Hprt1.
 SEQ ID NO: 9 representa la secuencia de nucleótidos de ARN de Hprt1.

LISTA DE SECUENCIAS

10 [0612]
 <110> KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.
 <120> CONJUGADO DE OLIGONUCLEÓTIDOS
 <130> K1635AHP0001
 15 <150> JP 2016-016707
 <151> 2016-01-29
 <160> 9
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 20 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ApoBASO
 25 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(1)
 <223> LNA
 <220>
 30 <221> característica miscelánea
 <222> (2)..(2)
 <223> LNA_mC
 <220>
 <221> característica miscelánea
 35 <222> (2)..(13)
 <223> 5'-fosfonotioato
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (11)..(11)
 40 <223> LNA
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (12)..(12)
 <223> LNA_mC
 45 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (13)..(13)
 <223> LNA
 <400> 1
 50 gnattggtat tna 13
 <210> 2
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> ARNcs de AT3
 <220>
 <221> base_modificada

<222> (1)..(1)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroguanosina
 <220>
 <221> base_modificada
 5 <222> (2)..(2)
 <223> gm
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (2)..(3)
 10 <223> 5'-fosfonotioato
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluorouridina
 15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)..(4)
 <223> um
 <220>
 20 <221> base_modificada
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
 <220>
 <221> base_modificada
 25 <222> (6)..(6)
 <223> 2'-O-metiladenosina
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(7)
 30 <223> 2'-desoxi-2'-fluorocitidina
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-metiladenosina
 35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (9)..(10)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluorocitidina
 <220>
 40 <221> base_modificada
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
 <220>
 <221> base_modificada
 45 <222> (12)..(12)
 <223> um
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(13)
 50 <223> 2'-desoxi-2'-fluorouridina
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (14)..(14)
 <223> um
 55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (16)..(16)
 <223> cm
 5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluorouridina
 <220>
 10 <221> base_modificada
 <222> (18)..(18)
 <223> um
 <220>
 <221> base_modificada
 15 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluorocitidina
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)..(20)
 20 <223> 2'-O-metiladenosina
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
 25 <400> 2
 gguuaacacc auuuacuuca a 21
 <210> 3
 <211> 23
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ARNas de AT3
 <220>
 <221> base_modificada
 35 <222> (1)..(1)
 <223> um
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (2)..(2)
 40 <223> 2'-desoxi-2'-fluorouridina
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (2)..(3)
 <223> 5'-fosfonotioato
 45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> gm
 <220>
 50 <221> base_modificada
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
 <220>
 <221> base_modificada
 55 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O-metiladenosina
 <220>
 <221> base_modificada

```

<222> (6)..(6)
<223> 2'-desoxi-2'-fluoroguanosina
<220>
<221> base_modificada
5 <222> (7)..(7)
<223> um
<220>
<221> base_modificada
<222> (8)..(8)
10 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
<220>
<221> base_modificada
<222> (9)..(9)
<223> 2'-O-metiladenosina
15 <220>
<221> base_modificada
<222> (10)..(10)
<223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
<220>
20 <221> base_modificada
<222> (11)..(11)
<223> um
<220>
<221> base_modificada
25 <222> (12)..(13)
<223> gm
<220>
<221> base_modificada
<222> (14)..(14)
30 <223> 2'-desoxi-2'-fluorouridina
<220>
<221> base_modificada
<222> (15)..(15)
<223> gm
35 <220>
<221> base_modificada
<222> (16)..(16)
<223> 2'-desoxi-2'-fluorouridina
<220>
40 <221> base_modificada
<222> (17)..(17)
<223> um
<220>
<221> base_modificada
45 <222> (18)..(18)
<223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
<220>
<221> base_modificada
<222> (19)..(19)
50 <223> 2'-O-metiladenosina
<220>
<221> base_modificada
<222> (20)..(20)
<223> 2'-desoxi-2'-fluorocitidina
55 <220>
<221> base_modificada
<222> (21)..(21)
<223> cm

```

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (22)..(22)
 <223> 2'-O-metiladenosina
 5 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (22)..(23)
 <223> 5'-fosfonotioato
 <220>
 10 <221> base_modificada
 <222> (23)..(23)
 <223> gm
 <400> 3
 uugaaguaaa ugguguuaac cag 23
 15 <210> 4
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> ARNcs de B2M
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
 25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> gm
 <220>
 30 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroguanosina
 <220>
 <221> base_modificada
 35 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-metiladenosina
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (5)..(5)
 40 <223> 2'-desoxi-2'-fluorocitidina
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (6)..(6)
 <223> um
 45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroguanosina
 <220>
 50 <221> base_modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> gm
 <220>
 <221> base_modificada
 55 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluorouridina
 <220>
 <221> base_modificada

<222> (10)..(10)
 <223> cm
 <220>
 <221> base_modificada
 5 <222> (11)..(12)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluorouridina
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(13)
 10 <223> um
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluorocitidina
 15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)..(15)
 <223> um
 <220>
 20 <221> base_modificada
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
 <220>
 <221> base_modificada
 25 <222> (17)..(17)
 <223> um
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (18)..(18)
 30 <223> 2'-desoxi-2'-fluorocitidina
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (19)..(19)
 <223> um
 35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluorocitidina
 <220>
 40 <221> característica miscelánea
 <222> (20)..(21)
 <223> 5'-fosfonotioato
 <220>
 <221> base_modificada
 45 <222> (21)..(21)
 <223> um
 <400> 4
 aggacugguc uuucuaucuc u 21
 <210> 5
 50 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ARNas de B2M
 55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> gm
 5 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (2)..(3)
 <223> 5'-fosfonotioato
 <220>
 10 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
 <220>
 <221> base_modificada
 15 <222> (4)..(4)
 <223> gm
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (5)..(5)
 20 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (6)..(6)
 <223> um
 25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
 <220>
 30 <221> base_modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> gm
 <220>
 <221> base_modificada
 35 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)..(11)
 40 <223> 2'-O-metiladenosina
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroguanosina
 45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-O-metiladenosina
 <220>
 50 <221> base_modificada
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluorocitidina
 <220>
 <221> base_modificada
 55 <222> (15)..(15)
 <223> cm
 <220>
 <221> base_modificada

```

<222> (16)..(16)
<223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
<220>
<221> base_modificada
5 <222> (17)..(17)
<223> gm
<220>
<221> base_modificada
<222> (18)..(18)
10 <223> 2'-desoxi-2'-fluorouridina
<220>
<221> base_modificada
<222> (19)..(19)
<223> cm
15 <220>
<221> base_modificada
<222> (20)..(20)
<223> 2'-desoxi-2'-fluorocitidina
<220>
20 <221> base_modificada
<222> (21)..(21)
<223> um
<220>
<221> base_modificada
25 <222> (22)..(22)
<223> 2'-desoxi-2'-fluorouridina
<220>
<221> característica miscelánea
<222> (22)..(23)
30 <223> 5'-fosfonotioato
<220>
<221> base_modificada
<222> (23)..(23)
<223> gm
35 <400> 5
agagauagaa agaccagucc uug 23
<210> 6
<211> 16
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> CD45ASO
<220>
<221> característica miscelánea
45 <222> (1)..(4)
<223> LNA
<220>
<221> característica miscelánea
<222> (2)..(16)
50 <223> 5'-fosfonotioato
<220>
<221> característica miscelánea
<222> (13)..(16)
<223> LNA
55 <400> 6
ccaaatgccca agagtt 16
<210> 7
<211> 10

```

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> 3'-dT10
 5 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(1)
 <223> ARN
 <400> 7
 10 tttttttttt 10
 <210> 8
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> ARNcs de Hprt1
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 20 <223> 2'-desoxi-2'-fluorouridina
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> cm
 25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluorocitidina
 <220>
 30 <221> base_modificada
 <222> (4)..(4)
 <223> um
 <220>
 <221> base_modificada
 35 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (6)..(6)
 40 <223> um
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroguanosina
 45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-O-metiladenosina
 <220>
 50 <221> base_modificada
 <222> (9)..(9)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluorocitidina
 <220>
 <221> base_modificada
 55 <222> (10)..(10)
 <223> um
 <220>
 <221> base_modificada

<222> (11)..(11)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroguanosina
 <220>
 <221> base_modificada
 5 <222> (12)..(12)
 <223> um
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(13)
 10 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (14)..(14)
 <223> gm
 15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)..(15)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
 <220>
 20 <221> base_modificada
 <222> (16)..(16)
 <223> um
 <220>
 <221> base_modificada
 25 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluorouridina
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (18)..(18)
 30 <223> um
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluorouridina
 35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)..(20)
 <223> 2'-O-metiladenosina
 <220>
 40 <221> base_modificada
 <222> (21)..(21)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluorouridina
 <400> 8
 uccuaugacu guagauuuua u 21
 45 <210> 9
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> ARNas de Hprt1
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-metiladenosina
 55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-fosforilo

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluorouridina
 5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-O-metiladenosina
 <220>
 10 <221> base_modificada
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
 <220>
 <221> base_modificada
 15 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O-metiladenosina
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (6)..(6)
 20 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(7)
 <223> um
 25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluorocitidina
 <220>
 30 <221> base_modificada
 <222> (9)..(9)
 <223> um
 <220>
 <221> base_modificada
 35 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (11)..(11)
 40 <223> cm
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
 45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(13)
 <223> gm
 <220>
 50 <221> base_modificada
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-desoxi-2'-fluorouridina
 <220>
 <221> base_modificada
 55 <222> (15)..(15)
 <223> cm
 <220>
 <221> base_modificada

```

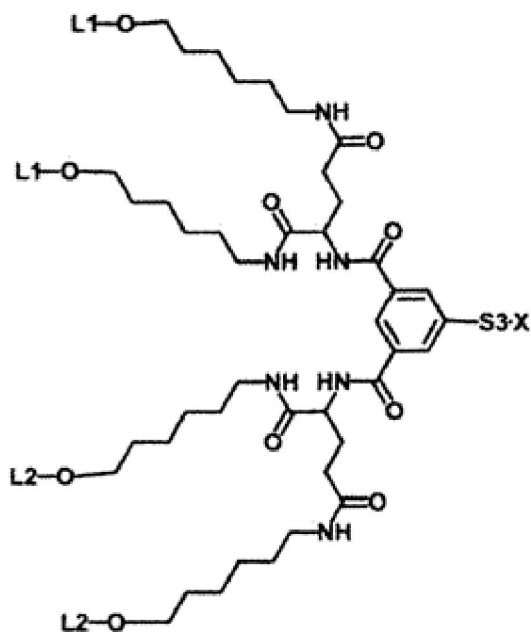
<222> (16)..(16)
<223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
<220>
<221> base_modificada
5 <222> (17)..(17)
<223> um
<220>
<221> base_modificada
<222> (18)..(18)
10 <223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
<220>
<221> base_modificada
<222> (19)..(19)
<223> gm
15 <220>
<221> base_modificada
<222> (20)..(20)
<223> 2'-desoxi-2'-fluoroguanosina
<220>
20 <221> base_modificada
<222> (21)..(21)
<223> 2'-O-metiladenosina
<220>
<221> base_modificada
25 <222> (22)..(22)
<223> 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
<220>
<221> característica miscelánea
<222> (22)..(23)
30 <223> 5'-fosfonotioato
<220>
<221> base_modificada
<222> (23)..(23)
<223> um
35 <400> 9

auaaaaucua cagucauagg aau 23

```

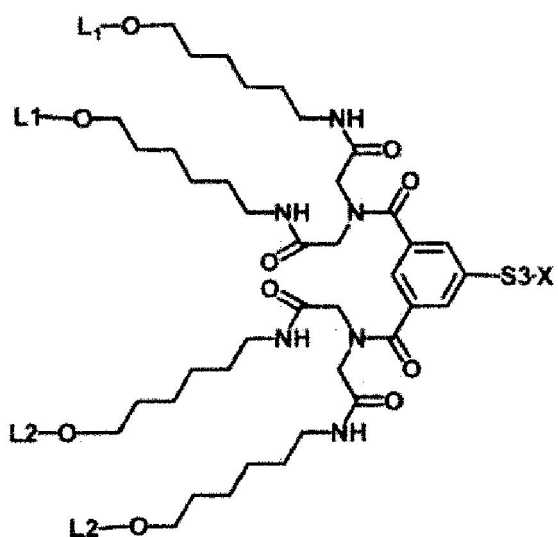
REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de ácidos nucleicos que tiene una estructura representada por las siguientes fórmulas 7-1 a 7-9:
Fórmula 7-1:

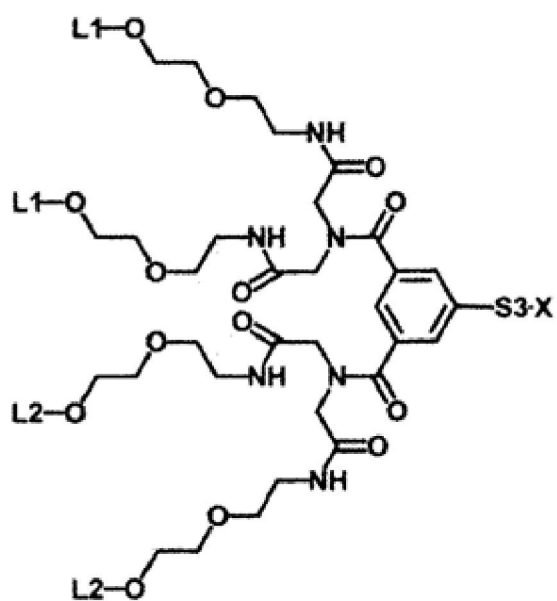


5

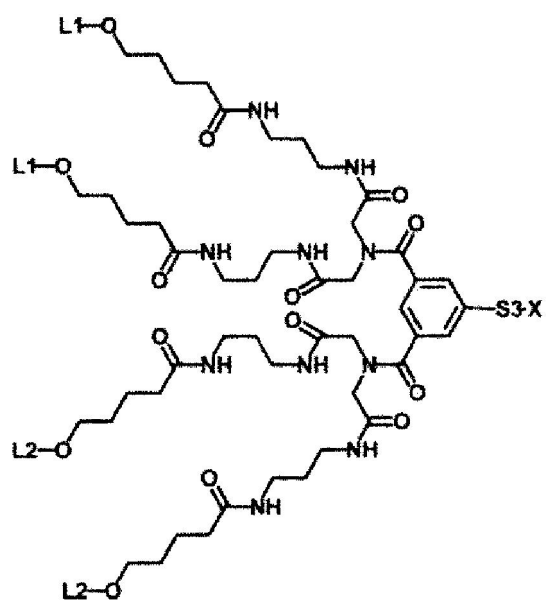
Fórmula 7-2:



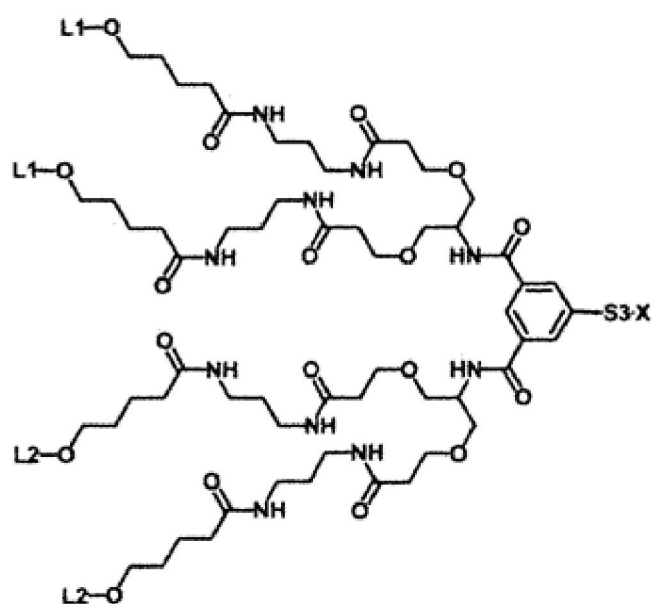
Fórmula 7-3:



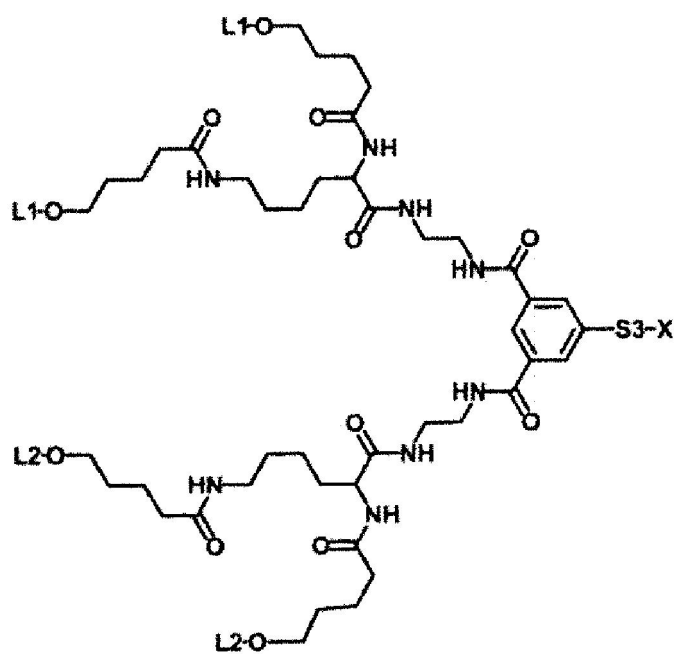
Fórmula 7-4:



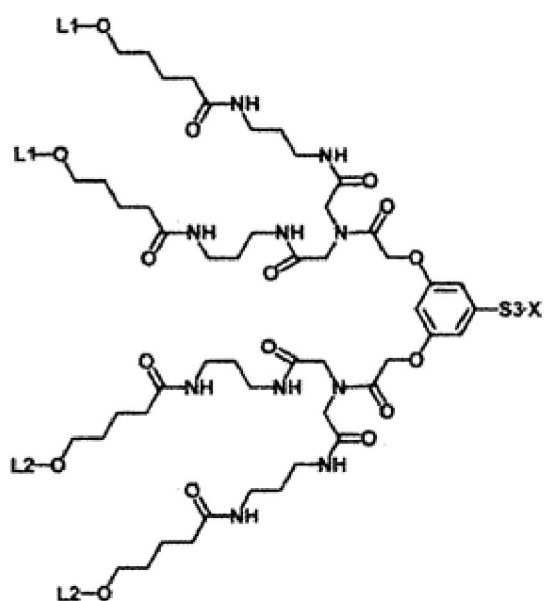
Fórmula 7-5:



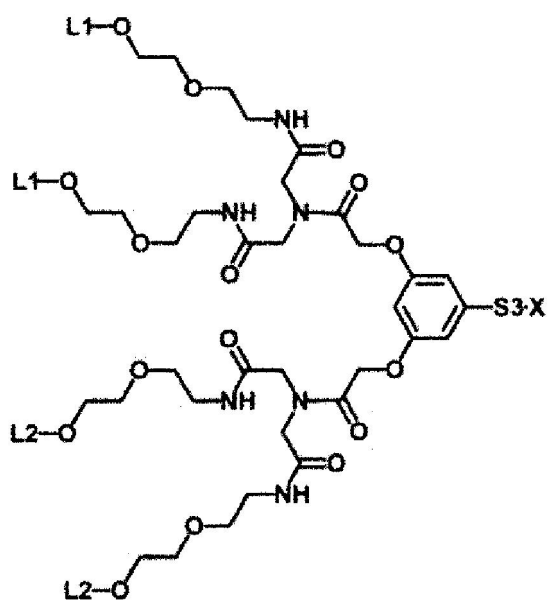
Fórmula 7-6:



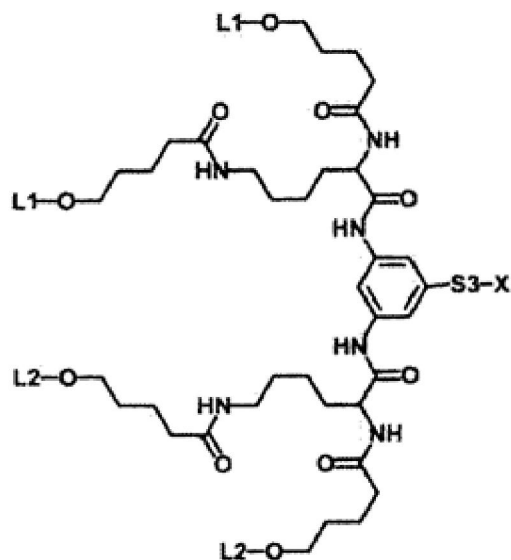
Fórmula 7-7:



Fórmula 7-8:



Fórmula 7-9:



en donde

X es un oligonucleótido,

L1 y L2 son, cada uno independientemente, un ligando de azúcar, y

S3 es un enlazador.

2. El conjugado de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ligando de azúcar es manosa o N-acetilgalactosamina.

3. El conjugado de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el oligonucleótido comprende un nucleótido modificado.

4. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de ácidos nucleicos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la composición farmacéutica es para transferir a una célula.

6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la célula es una célula del hígado.

7. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde la composición farmacéutica es para la administración por vía intravenosa o subcutánea.

8. Un conjugado de ácidos nucleicos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso como medicamento.

9. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 para uso como medicamento.