

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 481**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/54 (2007.01)

A61K 47/69 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2014 PCT/KR2014/006031**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15002511**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2014 E 14819529 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3018208**

54 Título: **Estructura de oligonucleótidos de tipo nanopartícula mejorada que tiene alta eficiencia y método para preparar la misma**

30 Prioridad:

05.07.2013 KR 20130079309

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

04.03.2021

73 Titular/es:

**BIONEER CORPORATION (100.0%)
8-11 Munpyeongseo-ro Daedeok-gu
Daejeon 306-220, KR**

72 Inventor/es:

**PARK, HAN OH;
CHAE, JEIWOOK;
YOON, PYOUNG OH;
HAN, BORAM;
CHOI, GI-EUN;
KO, YOUNGHO;
KWON, TAEWOO;
LEE, JAE DON y
KIM, SUN GI**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 809 481 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

Estructura de oligonucleótidos de tipo nanopartícula mejorada que tiene alta eficiencia y método para preparar la misma

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a una estructura de oligonucleótidos que tiene alta eficiencia que es útil de manera efectiva para el tratamiento de cáncer, enfermedades infecciosas, etc.

10

La estructura de oligonucleótidos según la presente invención tiene una estructura en la que el material hidrófilo y un material hidrófobo se conjugan a ambos extremos del oligonucleótido usando un enlace covalente simple o un enlace covalente mediado por enlazador de manera que el oligonucleótido incluido en la estructura de oligonucleótidos se administró eficazmente en las células, en la que la estructura puede convertirse en una forma de nanopartículas mediante interacciones hidrofóbicas de las estructuras de oligonucleótidos en una disolución acuosa.

15

Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que incluye la estructura de oligonucleótidos, un método para preparar la estructura de oligonucleótidos, y una tecnología para la administración de oligonucleótido usando la estructura de oligonucleótidos.

20

Antecedentes de la técnica

En la actualidad, se han desarrollado diversos tipos de agentes terapéuticos basados en oligonucleótidos, tales como oligonucleótido antisentido (ASO), interferencia de ARN (en lo sucesivo, denominada 'ARNi'), microARN (miARN), etc.

25

El ASO tiene una función de controlar la transferencia de información a partir de un gen en proteína cambiando un metabolismo intermedio de ARNm a través de ARN monocatenario o cadena de ADN, lo cual es para lograr el control de expresión deseado de la proteína diana mediante la selección de secuencias de bases que son suficientemente complementarias y están específicamente hibridadas. El ASO es la secuencia específicamente unida a un gen diana, que no tiene un efecto sobre la expresión de otros genes distintos del gen diana. Por lo tanto, la tecnología de ASO es una herramienta que es útil para el análisis de las funciones *in vivo* de la proteína específica, y tiene una posibilidad de que se utilice como terapia génica con respecto a enfermedades específicas (FASEBJ.9, 1288-1296, 1995).

30

35

El miARN (microARN) es ARN corto de un grupo largo que se produce de manera natural en un sujeto, y al menos algunos de ellos controlan la expresión del gen diana. El miARN se forma a partir de aproximadamente transcriptomas precursores horquillados monocatenarios de 70 nucleótidos por Dicer ribonucleasa (Ambros *et al.* 2003. *Current Biology* 13 (10): 807-818), en el que el Dicer corta el precursor para formar 21-23 miARN de cadena doble de nucleótidos. En muchos casos, el miARN se transcribe a partir de algunas de las secuencias de ADN de las cuales, todavía no se han encontrado las funciones. El miARN no se traduce en proteínas, sino más bien, los miARN se combinan con los ARNm específicos que bloquean la traducción. Sin embargo, los miARN forman incorrectamente pares de bases con las dianas de los mismos para inhibir la traducción.

40

45

Dado que se ha encontrado un papel del ARNi, se encontró que las funciones de secuencia de manera secuencial ARNi a ARNm en diversos tipos de células de mamíferos (Silence of the transcripts: RNA interference in medicine. *J Mol Med*, 2005, 83: 764-773). Cuando una cadena larga de ARN bicatenario se administró a una célula, el ARN bicatenario administrado se convierte en un ARN interferente pequeño (en adelante, denominado 'ARNip') que se procesa a de 21 a 23 pares de bases (pb) por una endonucleasa llamada Dicer. ARNip tiene una cadena corta de ARN bicatenario que tiene de 19 a 27 bases y se acopla a un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), mediante el cual una cadena de guía (antisentido) reconoce y descompone un ARNm diana para inhibir específicamente la secuencia de la expresión del gen diana (Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2002. 1, 503-514.).

50

55

En particular, la cadena larga de ARN bicatenario administrada desde el exterior tiene un problema de causar de manera excesiva una reacción inmune de secuencia no específica a través de la expresión de interferón en una célula de mamífero; sin embargo, se encontró que el problema puede superarse por un ARNip de cadena corta (Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001. 411, 494-498).

60

Sin embargo, el ARNip también tiene una posibilidad de estimulación de respuesta inmune innata generada a través de sensores presentes en las células y, en consecuencia, con el fin de superar la posibilidad, la estructura específica del ARNip se cambia o se han desarrollado sustituyentes 2-metoxi o sustituyentes 2-fluoro.

65

Un ARNip sintetizado químicamente tiene una doble cadena de aproximadamente 19 a 27 pares de base (pb) y tiene una estructura de saliente 2-nt(nucleótido) en el extremo 3', y para que el ARNip bicatenario exprese una actividad,

se sabe que el ARNip bicatenario tiene una estructura que consiste en el grupo 3'-hidroxilo (OH) y el grupo 5'-fosfato (PO₄) (Effect of asymmetric terminal structures of short RNA duplexes on the RNA interference activity and strand selection. *Nucleic Acids Res* 1 Octubre 2008:5812-5821). Se sabe que un ARNip comercializado y sintetizado tiene una estructura en la que los grupos hidroxilo están presentes en ambos extremos, y cuando el ARNip sintetizado se administra a una célula, el extremo 5' de ARNip es fosforilado mediante una cinasa de fosforilación para expresar funciones de ARNip (siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. *RNA* 2003. 9: 1034-1048).

Bertrand *et al.*, encontraron que, en comparación con un oligonucleótido antisentido (ASO) sobre el mismo gen diana, ARNip tiene un efecto de inhibición significativamente la expresión de ARNm *in vitro* e *in vivo*, y el efecto correspondiente se mantiene durante un largo tiempo (Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. 296: 1000-1004).

Además, dado que ARNip se acopla de manera complementaria a un ARNm diana para regular específicamente en secuencia la expresión del gen diana, un mecanismo del ARNip tiene la ventaja de que una diana que sea capaz de aplicarse se pueda aumentar notablemente en comparación con el producto médico existente basado en anticuerpos o fármaco molecular pequeño. (Progress towards *in vivo* use of siRNAs. *MOLECULAR THERAPY*. 2006 13(4):664-670).

Incluso si un agente terapéutico a base de oligonucleótido (ARNip, etc) a base de agente terapéutico tiene un efecto excelente y una gama útil de diversas maneras, con el fin de desarrollar el ARNip como agente terapéutico, se requiere que el ARNip se administre de manera efectiva a la célula diana mediante la mejora de la estabilidad de ARNip y una eficiencia de administración de células de ARNip (Harnessing *in vivo* siRNA delivery for drug discovery and therapeutic development. *Drug Discov Today*. Enero de 2006; 11(1-2):67-73).

En particular, ya que los oligonucleótidos tales como ARNip, etc., no se pasan a través de una bicapa de fosfolípidos hidrófobos de una célula debido a cargas negativas de la misma, es difícil que se administren en la célula a través de una simple difusión.

Con la finalidad de aumentar la eficacia de administración de los oligonucleótidos *in vivo* o *in vitro*, se han desarrollado diversos tipos de materiales de administración de células. Los liposomas, los tensioactivos catiónicos, etc., se utilizan en general y en gran medida. Además, los métodos de uso de un portador tal como método de fusión de un gen en liposoma, un método de uso de un lípido catiónico o un polímero catiónico, etc., un método de cambio de una estructura química, es decir, el cambio de una estructura básica combinada de oligonucleótido a metilfosfonato, ácido nucleico peptídico (PNA), etc., y se ha conocido un método de uso de un conjugado (Chemically modified siRNA: tools and applications. *Drug Discov Today*. Octubre de 2008; 13(19-20):842-855; Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* julio de 2008; 36(12):4158-71).

Entre ellos, un método de uso de un nanoportador, es decir, un método de uso de diversos polímeros tales como liposoma, compuesto de polímero catiónico, etc., es capturar oligonucleótidos en un nanoportador mediante la formación de nanopartículas para la administración de los oligonucleótidos capturados a células. Entre los métodos de uso del nanoportador, se usa principalmente un método de uso de nanopartículas poliméricas, micela de polímero, lipoplex, o similares, en el que el lipoplex consiste en lípido catiónico para interactuar con lípido aniónico de endosoma de una célula, induciendo de este modo un efecto de desestabilización del endosoma para la administración del ARNip en una célula (Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 15 de octubre de 1996; 93(21):11493-8).

En particular, se sabe que cuando el oligonucleótido es ARNip, los materiales químicos, etc., están conectados a las partes de extremo de una cadena pasajera ARNip (sentido) para proporcionar un aumento de las características de farmacocinética, de tal manera que una alta eficiencia puede inducirse *in vivo* (Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*. 11 de noviembre de 2004; 432(7014):173-8). En el presente documento, la estabilidad del ARNip puede variar dependiendo de las propiedades de los materiales químicos unidos a extremos de la cadena de sentido de ARNip (pasajero) o antisentido (guía). Por ejemplo, un ARNip al que un compuesto de polímero tal como polietilenglicol (PEG) se conjuga, interactúa con un grupo de fosfato aniónico de ARNip en presencia de materiales catiónicos para formar un complejo, siendo de este modo, un portador que tiene una estabilidad de ARNip mejorada (Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer. *J Control Release*. 14 de julio de 2008; 129(2):107-16). En particular, la micela que consiste en complejos de polímero tiene un tamaño extremadamente pequeño, distribución significativamente uniforme, y se forma espontáneamente, siendo de este modo fácil de manejar la calidad de la formulación y la segura reproducibilidad, en comparación con otros sistemas usados como un vehículo de administración de fármacos, tales como microesferas, nanopartículas, etc.

Además, con el fin de mejorar una eficiencia de administración intracelular de ARNip, la tecnología de uso de un conjugado ARNip en el que el material hidrófilo que es un polímero biocompatible (por ejemplo, polietilenglicol (PEG)) se conjuga con el ARNip mediante un enlace covalente simple o un enlace covalente mediado por enlazador, para, de este modo, asegurar la estabilidad de ARNip y se desarrolló la efectiva permeabilidad de membrana celular

(véase la publicación de patente coreana n.º 883471). Sin embargo, la modificación química del ARNip y la conjugación con el polietilenglicol (PEG) (PEGilación) aún tiene desventajas de que la estabilidad en un cuerpo vivo es baja y la administración en un tejido diana no es uniforme.

5 Con el fin de resolver las desventajas, una estructura que comprende oligo ARN bicatenario ('estructura de oligo ARN bicatenario') en el que un material hidrófilo y un material hidrófobo están unidos a oligonucleótidos, en particular, el oligo ARN bicatenario, tal como ARNip, se desarrolló, en el que la estructura del oligo ARN bicatenario forma una nanopartícula de autoensamblado denominada ARN inhibidor de micela autoensamblada (SAMIrRNA™) mediante una interacción hidrófoba de un material hidrófobo (véase la publicación de patente coreana n.º 1224828), la tecnología SAMiRNA™ tiene la ventaja de que nanopartículas homogéneas que tienen un tamaño significativamente pequeño son capaces de obtenerse en comparación con las tecnologías de administración existentes.

15 Como un ejemplo específico de la tecnología SAMiRNA™, se usa PEG (polietilenglicol) como un material hidrófilo, en la que PEG es un polímero sintético, que se usa para aumentar la solubilidad de los productos farmacéuticos, en particular, de proteína, y para el control de la farmacocinética. El PEG es un material polidisperso como todos los polímeros sintéticos, un polímero en un lote consiste en la suma de un número de diferentes monómeros, se muestra un peso molecular en la curva de Gauss, y el índice de polidispersidad (M_w / M_n) expresa el grado de homogeneidad de un material. Es decir, cuando el PEG tiene un peso molecular bajo (3 a 5 kDa), el índice de polidispersidad es de aproximadamente 1,01, y cuando PEG tiene un peso molecular alto (20 kDa), el índice de polidispersidad es de aproximadamente 1,2, que es alto, de manera que como el peso molecular es más alto, la homogeneidad del material es relativamente baja (F. M. Veronese. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. Biomaterials (2001) 22:405-417).

25 Por consiguiente, cuando el PEG se une a los productos farmacéuticos, la característica de polidispersidad de PEG se refleja en el conjugado, de manera que es difícil verificar un solo material. Recientemente, con el fin de superar el problema, la producción de materiales que tiene un bajo índice de polidispersidad mediante la síntesis de PEG y la mejora de los procesos de purificación es una tendencia creciente, pero tiene todavía problemas debido a la característica de polidispersidad del material, en particular, cuando PEG se une a un material que tiene un peso molecular pequeño, hay dificultad para confirmar si se realiza o no la unión con facilidad, etc. (Francesco M. Veronese and Gianfranco Pasut. PEGylation, successful approach to drug delivery. DRUG DISCOVERY TODAY(2005) 10(21) :1451-1458).

35 Además, el tamaño de las nanopartículas afecta significativamente a la eficiencia de administración en la célula diana, cuando el tamaño de las nanopartículas es de 50 nm o menos, las nanopartículas se retiran rápidamente del cuerpo a través de la excreción, y cuando el tamaño de las nanopartículas es de 100 nm o más, las nanopartículas no se entregan de manera uniforme en el tejido, y el efecto se reduce. Por lo tanto, se requiere para formar nanopartículas que tienen cada una un tamaño predeterminado (Wim H De Jong and Paul JA Borm. Int J Nanomedicine. Junio de 2008; 3(2): 133-149).

40 Por lo tanto, el mercado en un nuevo concepto de la técnica de administración de oligonucleótidos para la solución de característica de polidispersidad de materiales hidrófilos tales como PEG, etc., de sí mismos mientras se mantienen los excelentes efectos de SAMiRNA™ según la técnica relacionada tal como son, se ha requerido con urgencia.

45 El documento CA 2859127 A1 da a conocer una estructura de oligo ARN de doble hélice en la que ligandos específicos de diana se unen a la estructura de oligo ARN de doble hélice en la que se unen covalentemente compuestos de alta masa molecular para mejorar la administración de oligo ARN de doble hélice que pueden usarse de manera útil en el tratamiento de enfermedades, específicamente, cáncer.

50 Descripción de la invención

Las realizaciones de la presente invención se reflejan en las reivindicaciones independientes 1, 12, 13, 15, 16, 17, y 18.

55 Las realizaciones preferidas de la presente invención se reflejan en las reivindicaciones dependientes 2-11 y 14.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo concepto de nanopartículas que tienen un tamaño pequeño y polidispersidad mejorada y una estructura de oligonucleótidos que forma las nanopartículas.

60 Además, otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para preparar la estructura de oligonucleótidos y nanopartículas formadas de la estructura de oligonucleótidos, una composición farmacéutica que incluye la estructura de oligonucleótidos y una tecnología para controlar la expresión génica usando la misma.

65 Los presentes inventores encontraron que en una tecnología de SAMiRNA™ en la que están las nanopartículas autoensambladas existentes, cuando el material hidrófilo de la estructura de oligonucleótidos que configura SAMiRNA™ se bloquea como una unidad de base que incluye monómeros uniformes (el número de monómeros es

m) teniendo un peso molecular predeterminado y un enlazador según sea necesario, se usa el número apropiado de materiales hidrófilos bloqueados según sea necesario, las nanopartículas formadas por la estructura de oligonucleótidos tienen un tamaño significativamente pequeño y polidispersidad notablemente mejorada en comparación con la SAMiRNA™ existente, y completaron la presente invención.

5 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un diagrama esquemático de una nanopartícula formada de estructuras de oligonucleótidos a la que cada uno de los materiales hidrófilos que tienen el mismo peso molecular están unidas según la presente invención.

10 La figura 2 muestra toda la ruta de síntesis de 3,4,6-triacetil-1-hexa(etilenglicol)-N-acetil-galactosamina-CPG (vidrio de poro controlado).

15 La figura 3 muestra toda la ruta de síntesis de 2,3,4,6-tetraacetil-1-hexa(etilenglicol)-manosa-CPG (vidrio de poro controlado).

La figura 4 muestra toda la ruta de síntesis de 2,3,4,6-tetraacetil-1-hexa(etilenglicol)-glucosa-CPG (vidrio de poro controlado).

20 La figura 5 muestra los resultados del análisis de RMN de 1,3,4,6-tetraacetil-N-acetil-galactosamina (compuesto 1 de la figura 2).

25 1H RMN (300 MHz, DMSO-d6); 7,91~7,86 (d, 1H), 5,66~5,61 (d, 1H), 5,28~5,25 (d, 1H), 5,10~5,03 (d, 1H), 4,25~4,19 (t, 1H), 4,15~3,94 (m, 3H), 2,12~2,10 (s, 3H), 2,04~2,02 (s, 3H), 2,00~1,98 (s, 3H), 1,91~1,89 (s, 3H), 1,78~1,76 (s, 3H)

La figura 6 muestra los resultados del análisis de RMN de 3,4,6-triacetil-1-hexa(etilenglicol)-N-acetil-galactosamina (compuesto 2 de la figura 2).

30 1H RMN (300 MHz, CDC13); 6,66~6,61 (d, 1H), 5,33~5,29 (d, 1H), 5,02~4,96 (d, 1H), 4,80~4,75 (d, 1H), 4,25~4,07 (m, 2H), 3,93~3,79 (m, 2H), 3,73~3,54 (m, 24H), 2,16~2,14 (s, 3H), 2,05~2,03 (s, 3H), 1,99~1,97 (s, 6H)

35 La figura 7 muestra los resultados del análisis de RMN de 3,4,6-triacetil-1-[hexa (etilenglicol) -N'-1',2'-propanodiol]-N-acetil-galactosamina 3,4,6-triacetil-1-[hexa(etilenglicol)-N'-1',2'-propanodiol]-N-acetil-galactosamina (compuesto 3 de la figura 2).

40 1H RMN (300 MHz, CDC13); 1H RMN (300MHz, CDC13) ; 6,83~6,78 (d, 1H), 6,10~6,08 (s, 1H), 5,33~5,29 (d, 1H), 5,00~4,94 (d, 1H), 4,82~4,77 (d, 1H), 4,22~4,08 (m, 4H), 3,94~3,85 (m, 2H), 3,83~3,74 (m, 1H), 3,66~3,52 (m, 24H), 3,40~3,24 (m, 2H), 2,18~2,16 (s, 6H), 2,05~2,03 (s, 3H), 2,00~1,98 (s, 3H)

La figura 8 muestra los resultados del análisis de RMN de 3,4,6-triacetil-1-[hexa(etilenglicol)-N'-1'-metoxi(dimetoxitritilo)-2'-propanol]-N-acetil-galactosamina (compuesto 4 de la figura. 2).

45 1H RMN (300MHz, DMSO-d6) ; 7,80~7,75 (d, 1H), 7,40~7,20 (m, 9H), 7,00~6,98 (s, 1H), 6,90~6,85 (d, 4H), 5,22~5,20 (s, 1H), 5,00~4,87 (m, 2H), 4,58~4,55 (d, 1H), 4,04~4,02 (s, 4H), 3,94~3,82 (m, 1H), 3,74~3,72 (s, 6H), 3,51~3,49 (s, 24H), 3,18~3,12 (m, 1H), 2,94~2,85 (m, 2H), 2,11~2,09 (s, 3H), 2,00~1,98 (s, 3H), 1,90~1,88 (s, 3H), 1,78~1,76 (s, 3H)

50 La figura 9 muestra los resultados del análisis de RMN de 3,4,6-triacetil-1-[hexa(etilenglicol)-N'-1'-metoxi(dimetoxitritilo)-2'-propoxi(ácido succínico)]-N-acetil-galactosamina (compuesto 5 de la figura 2).

55 1H RMN (300MHz, CDC13); 7,43~3,38 (d, 2H), 7,31~7,19 (m, 7H), 6,84~6,79 (d, 4H), 6,75~6,67 (t, 1H), 5,52~4,89 (m, 1H), 5,32~5,30 (s, 1H), 5,21~5,19 (s, 1H), 5,01~4,95 (d, 1H), 4,81~4,76 (d, 1H), 4,30~4,08 (m, 3H), 3,93~3,86 (m, 2H), 3,79~3,77 (s, 6H), 3,66~3,52 (m, 24H), 3,36~3,32 (m, 1H), 3,21~3,17 (d, 2H), 2,75~2,56 (m, 4H), 2,18~2,16 (s, 3H), 2,04~2,01 (m, 6H), 1,98~1,96 (s, 3H)

La figura 10 muestra una estructura de una estructura de oligonucleótidos a la que está unido un ligando, y como ejemplo de la misma, mono-NAG-(hexaetilenglicol) n-oligo-lípido y una estructura del lípido introducido en su interior.

60 (A) Una estructura de la estructura de oligonucleótidos a la que está unido el ligando.

(B) Una estructura de mono-NAG-(hexaetilenglicol) n-oligo-lípido.

65 La figura 11 muestra los resultados de espectroscopia de masas (MALDI-TOF MS) de mono-NAG-(hexaetilenglicol) 1-oligo-lípido.

Un peso molecular de (mono-NAG-(hexaetilenglicol) 1-oligo-lípido (PM 7807,4)).

La figura 12 muestra los resultados de espectroscopia de masas (MALDI-TOF MS) de mono-NAG-(hexaetilenglicol) 2-oligo-lípido.

Un peso molecular de (mono-NAG-(hexaetilenglicol) 2-oligo-lípido (PM 8152,7)).

La figura 13 muestra los resultados de espectroscopia de masas (MALDI-TOF MS) de mono-NAG-(hexaetilenglicol) 3-oligo-lípido.

Un peso molecular de (mono-NAG-(hexaetilenglicol) 3-oligo-lípido (PM 8498,0)).

La figura 14 muestra los resultados de espectroscopia de masas (MALDI-TOF MS) de mono-NAG-(hexaetilenglicol) 4-oligo-lípido.

Un peso molecular de (mono-NAG-(hexaetilenglicol) 4-oligo-lípido (PM 8843,3)).

La figura 15 es un gráfico obtenido mediante la medición de una concentración micelar crítica de nanopartículas (SAMI RNA) de estructuras de oligo ARN bicatenario a las que están unidos los materiales hidrófilos que tienen cada uno el mismo peso molecular según la presente invención.

La figura 16 es un gráfico obtenido mediante la medición de tamaño e índice de polidispersidad de las nanopartículas (SAMI RNA) de las estructuras de oligo ARN bicatenario a las que están unidos los materiales hidrófilos que tienen cada uno el mismo peso molecular según la presente invención.

(n significa el número de repetición de monómero de material hidrófilo, y las nanopartículas de la estructura de oligo ARN bicatenario formada de la estructura correspondiente.)

La figura 17 muestra el grado de inhibición de las expresiones de gen diana en líneas celulares tratadas con las nanopartículas (SAMI RNA) de las estructuras de oligo ARN bicatenario a las que los materiales hidrófilos que tienen cada uno el mismo peso molecular están unidos según la presente invención.

(n significa el número de repetición de monómero de material hidrófilo, y las nanopartículas de la estructura de oligo ARN bicatenario formada de la estructura correspondiente.)

Mejor modo de llevar a cabo la invención

El oligonucleótido de la presente invención es un material que consiste en un ADN (desoxirribonucleótido) o ARN (ribonucleótido), y significa oligonucleótido de antisentido formado en una cadena simple o una cadena doble formada de enlaces complementarios, ARN interferente pequeño (ARNip), ARN horquillado pequeño (shARN), microARN (miARN), inhibidor de miARN, aptámero, etc., pero la presente invención no se limita a los mismos.

En particular, cuando el oligonucleótido en la presente invención es el oligonucleótido bicatenario, la cadena de antisentido es una cadena que se une de manera complementaria al ARNm diana en el complejo silenciador inducido por ARN (RISC) para descomponer el ARNm diana, teniendo por lo tanto la actividad de ARNi, y la cadena de sentido significa una cadena que tiene una secuencia complementaria a la cadena de antisentido. "Complementaria" o "unión complementaria" en la presente invención significa que dos secuencias están unidas entre sí para formar una estructura bicatenaria, en la que la unión no es necesariamente una unión de coincidencia perfecta, y puede incluir también una falta de coincidencia en un caso donde algunas secuencias son diferentes.

Además, un miARN simula, en la presente invención que es un ARN bicatenario que tienen la misma secuencia y estructura que miARN presente en la naturaleza, lo que significa un miARN en una forma químicamente sintetizada. Un inhibidor de miARN significa un oligonucleótido monocatenario sintetizado químicamente que está unido de manera complementaria a miARN presente en la naturaleza para inhibir la acción del miARN correspondiente.

En una realización a modo de ejemplo, la presente invención proporciona una forma novedosa de estructura de oligonucleótidos que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula estructural (1) o la fórmula estructural (2).



En las fórmulas estructurales (1) y (2), A es un monómero de material hidrófilo, B es un material hidrófobo, J es un enlazador en el que monómeros de materiales hidrófilos (la suma es m) se conectan el uno al otro o un enlazador en el que monómeros de material hidrófilo (la suma es m) se conectan a oligonucleótidos, X e Y son cada uno

independientemente un enlace covalente simple o un enlace covalente mediado por enlazador, R es un oligonucleótido monocatenario o bicatenario, m es un número entero de 1 a 15 y n es un número entero de 1 a 10,

Q es (L₁-Z₁) o P-J₁-J₂,

L es un ligando unido específicamente a un receptor que promueve la internalización de célula diana a través de endocitosis mediada por receptor (RME), y Z es un enlazador que media un enlace covalente simple o un enlace entre el monómero de material hidrófilo en un bloque de material hidrófilo y el ligando,

i representa un número entero de 0 a 5, preferiblemente, un número entero de 0 a 3, y j significa 0 o 1, siempre que i sea 0, j es necesariamente 0,

P significa un grupo amino o un grupo de polihistidina, y

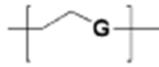
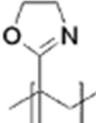
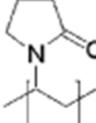
J₁ y J₂ son enlazadores de manera independiente que median un enlace covalente simple, o un enlace entre el grupo amino o el grupo de polihistidina con el material hidrófilo.

El "bloque de material hidrófilo" en la presente invención significa una unidad de repetición representada por (A_m-J) o (J-A_m) en las fórmulas estructurales (1) y (2).

En las fórmulas estructurales (1) y (2), el monómero de material hidrófilo A puede usarse sin limitación, siempre que cumplan los objetos de la presente invención entre los monómeros del polímero hidrófilo no iónico. El monómero de material hidrófilo A es preferiblemente un monómero seleccionado de los siguientes compuestos (1) a (3) mostrados en la tabla 1, más preferiblemente, un monómero del compuesto (1), y G en el compuesto (1) puede seleccionarse preferiblemente de CH₂, O, S y NH.

En particular, entre los monómeros de material hidrófilo, el monómero de compuesto (1) puede tener diversos grupos funcionales introducidos en su interior y buena afinidad *in vivo*, e inducir una pequeña respuesta inmune, teniendo de ese modo una excelente biocompatibilidad y, además, puede aumentar la estabilidad *in vivo* del oligonucleótido incluido en las estructuras según las fórmulas estructurales (1) y (2), y puede aumentar la eficiencia de la administración, lo cual es significativamente adecuado para producir la estructura según la presente invención.

[Tabla 1] Estructura de monómero de material hidrófilo preferente en la presente invención

Compuesto (1)	Compuesto (2)	Compuesto (3)
 <p>G es CH₂, O, S o NH</p>		

El material hidrófilo en las fórmulas estructurales (1) y (2) tiene preferiblemente un peso molecular total de 1.000 a 2.000. Por lo tanto, por ejemplo, cuando hexaetilenglicol representado por el compuesto (1), es decir, un material en el que G es O, y m es 6, se usa en las fórmulas estructurales (1) y (2), un peso molecular del espaciador de hexaetilenglicol es de 344, de modo que el número de repetición (n) se prefiere que sea de 3 a 5.

En particular, en la presente invención, la unidad de repetición del grupo hidrófilo representado por (A_m-J) o (J-A_m), en las fórmulas estructurales (1) y (2), es decir, el bloque de material hidrófilo, es capaz de usarse en un número apropiado representado por n, según sea necesario. A, el monómero de material hidrófilo y J, el enlazador, incluido en cada bloque de material hidrófilo, pueden ser de manera independiente el mismo entre sí o ser diferentes entre sí en cada bloque de material hidrófilo. Es decir, cuando se usan 3 bloques de material hidrófilo (n = 3), el monómero de material hidrófilo del compuesto (1) se usa en el primer bloque, el monómero de material hidrófilo del compuesto (2) se usa en el segundo bloque, el monómero de material hidrófilo del compuesto (3) se usa en el tercer bloque, etc. Es decir, diferentes monómeros de material hidrófilo para todos los bloques de material hidrófilos pueden usarse, y cualquier monómero de material hidrófilo seleccionado de los monómeros de material hidrófilo de compuestos (1) a (3) pueden usarse igualmente en todos los bloques de material hidrófilo. Del mismo modo, los enlazadores que median la unión del monómero de material hidrófilo también pueden ser iguales entre sí o diferentes entre sí para todos los bloques de material hidrófilo. Además, m que es el número de monómeros de material hidrófilo pueden ser los mismos entre sí o diferentes entre sí entre todos los bloques de material hidrófilo. Es decir, 3 monómeros de material hidrófilo (m = 3) están conectados en el primer bloque de material hidrófilo, 5 monómeros de material hidrófilo (m = 5) están conectados en el segundo bloque de material hidrófilo, 4 monómeros de material hidrófilo (m = 4) están conectados en el tercer bloque de material hidrófilo, etc. Es decir, monómeros de material hidrófilo que tienen cada uno diferentes números o que tienen cada uno el mismo número pueden usarse en todos los bloques de material hidrófilo.

Además, en la presente invención, el enlazador (J) se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en PO₃⁻, SO₃ y CO₂, pero la presente invención no se limita a los mismos. Es obvio para un experto en la técnica que cualquier enlazador puede usarse dependiendo del monómero de material hidrófilo usado, etc., siempre que cumpla los objetos de la presente invención.

5 Algo o todo el monómero de material hidrófilo puede modificarse para tener grupos funcionales necesarios para la unión con otros materiales tales como un ligando diana específico, etc., según sea necesario.

10 El bloque de material hidrófilo puede unirse a cualquier posición de extremo 3' o extremo 5' del oligo monocatenario, y puede estar unido a cualquier posición de extremo 3' o extremo 5' de la cadena de sentido o la cadena de antisentido del oligo bicatenario.

15 Los materiales hidrófobos B en las fórmulas estructurales (1) y (2) forman las nanopartículas formadas de las estructuras de oligonucleótidos de las fórmulas estructurales (1) y (2) a través de una interacción hidrofóbica. El material hidrófobo preferiblemente tiene un peso molecular de 250 a 1.000, y puede incluir un derivado de esteroide, un derivado de glicérido, éter de glicerol, glicol de polipropileno, hidrocarburos de C₁₂ a C₅₀ saturados o insaturados, diacilfosfatidilcolina, ácido graso, fosfolípido, lipopoliamino, etc., pero la presente invención no se limita a los mismos. Es obvio para un experto en la técnica que cualquier material hidrófobo puede usarse siempre y cuando cumpla los objetos de la presente invención.

20 El derivado de esteroide puede seleccionarse del grupo que consiste en colesterol, colestanol, ácido cólico, formiato de colesterilo, formiato de colestano y amino de colesterilo, y el derivado de glicérido puede seleccionarse de mono-, di- y triglicéridos, etc., en donde el ácido graso del glicérido se prefiere que sea un ácido graso insaturado o saturado de C₁₂ a C₅₀.

25 En particular, entre los materiales hidrófobos, se prefiere hidrocarburo insaturado o saturado o colesterol ya que es fácilmente capaz de unirse en una etapa de síntesis de la estructura de oligonucleótidos según la presente invención, e hidrocarburo de C₂₄, en particular, es lo más preferente tetradocosano incluyendo una unión de disulfuro.

30 El material hidrófobo está unido al extremo opuesto (extremo distal) del oligonucleótido unido al bloque de material hidrófilo, y puede estar unido a cualquier posición de la cadena de sentido o la cadena de antisentido del oligo bicatenario.

35 El oligonucleótido (R) en la presente invención puede incluir un ARNip o shARN monocatenario o bicatenario, simulación de microARN de antisentido, inhibidor de microARN, oligonucleótidos de antisentido (ASO), etc., sin limitación, y en particular, es lo más preferente ARNip bicatenario.

40 Cuando se usan los oligonucleótidos bicatenario como ARNip, miARN bicatenario etc., la cadena de sentido y/o la cadena de antisentido del oligonucleótido bicatenario consiste en de 15 a 40, preferiblemente de 19 a 31 nucleótidos, y en particular, se prefiere unir al menos un grupo fosfato, preferiblemente de uno a tres grupos fosfato a extremo 5' de la cadena de antisentido.

45 Además, el oligonucleótido tiene diversas modificaciones para proporcionar resistencia de nucleasa y disminuir una estimulación inmune no específico con el fin de mejorar la estabilidad *in vivo*, en el que la modificación puede ser una o más combinaciones seleccionadas de modificación en la que el grupo -OH en el carbono 2' en una estructura de azúcar en uno o más nucleótidos está sustituido con -CH₃ (metilo), -OCH₃ (metoxi), -NH₂, -F (flúor), -O-2-metoxietilo, -O-propilo, -O-2-metiltoetilo, -O-3-aminopropilo, -O-3-dimetilaminopropilo, -O-N-metilacetamido o -O-dimetilamidoxietilo; modificación en la que el oxígeno en una estructura de azúcar en nucleótidos se sustituye con azufre; y la modificación de fosforotioato o boranofosfato, uniones de metilfosfonato de uniones de nucleótidos, o pueden ser la modificación de ácido nucleico peptídico (PNA), la modificación de ácido nucleico bloqueado (LNA), o la modificación de ácido nucleico de desbloqueo (UNA) (Crooke *et al.*, Ann Rev. Med. Vol. 55: páginas 61-65 2004, documentos US 5.660.985, US 5.958.691, US 6.531.584, US 5.808.023, US 6.326.358, US 6.175.001 Braasch D. A. *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 14:1139- 1143, 2003; Chiu Y. L. *et al.*, RNA, 9:1034-1048, 2003; Amarguioui M. *et al.*, Nucleic Acid Res 31:589-595, 2003, Nucleic Acids Research, 2010, Vol. 38, n.º 17 5761-5773, Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, n.º 5 1823-1832).

60 Mientras tanto, el tejido del tumor es rígido para tener limitación de la difusión en comparación con el tejido normal, en el que esta limitación de difusión afecta al movimiento de los residuos, tales como nutrientes, oxígeno y dióxido de carbono necesarios para el crecimiento del tumor, de manera que la limitación de difusión se supera mediante la formación de los vasos sanguíneos alrededor del tumor a través de angiogénesis. Los vasos sanguíneos en el tejido del tumor formados por la angiogénesis tienen una estructura de los vasos sanguíneos con fugas y defectuosa con una diferencia de 100 nm a 2 um, dependiendo de los tipos de tumores. Por lo tanto, las nanopartículas pasan fácilmente a través del endotelio capilar de tejido de cáncer que tiene la estructura de vasos sanguíneos con fugas y defectuosa en comparación con los capilares organizados del tejido normal, de manera que es fácil de acceder al intersticio del tumor en el proceso de circulación de sangre. Además, los vasos linfáticos (drenaje linfático) no están

presentes en el tejido tumoral, de manera que se acumulan fármacos, lo que se refiere a un efecto de permeación y retención mejorada (EPR). Este fenómeno en el que las nanopartículas son específicamente tejido de tumor entregado por este efecto, se refiere al direccionamiento pasivo (direccionamiento pasivo) (Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. Urol. Oncol. Enero-Febrero de 2008; 26 (1) :57-64).

5 Un direccionamiento activo representa un caso en el que un resto de direccionamiento se une a la nanopartícula, y se informó de que el direccionamiento activo promueve la acumulación preferencial de las nanopartículas en el tejido diana o mejora la internalización en el que las nanopartículas se administran en la célula diana (Does a targeting ligand influence nanoparticle tumor localization or uptake Trends Biotechnol. 2008 Oct; 26(10):552-8. Epub 21 de agosto de 2008). El direccionamiento activo usa materiales (resto de direccionamiento) que tienen una capacidad de ser capaz de unirse a carbohidratos, receptores, antígenos que son específicos para dirigir la superficie celular o sobreexpresada (Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. Mol Cancer Ther 2006; 5(8): 1909-1917).

15 Por lo tanto, cuando se proporciona un resto de direccionamiento en la estructura de oligonucleótidos según la presente invención y la nanopartícula formada a partir de la misma, la administración a la célula diana se promueve con eficacia para lograr la administración a la célula diana, incluso en una concentración relativamente baja de la dosis, mostrando de esta manera una función de alto control para la expresión de gen diana, y evitando de este modo la administración no específica del oligonucleótido en otros órganos y células.

20 Por consiguiente, la presente invención proporciona estructuras representadas por las fórmulas estructurales (3) y (4) en las que Q es (L_i-Z_j) en estructuras según las fórmulas estructurales (1) y (2), y en las que el ligando (L), en particular, se incluye además, el ligando (L) unido específicamente al receptor que promueve la internalización de célula diana a través de endocitosis mediada por receptor (RME).

25 $(L_i-Z_j)-(A_m-J)_n-X-R-Y-B$ Fórmula estructural (3)

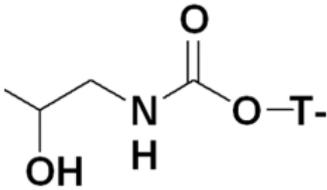
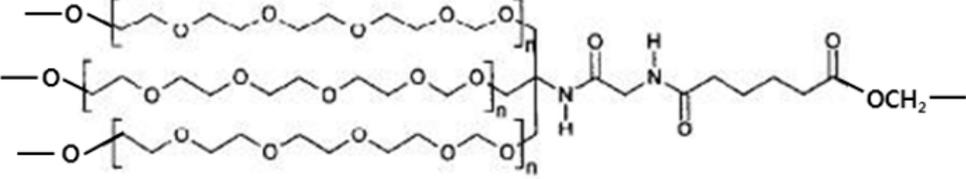
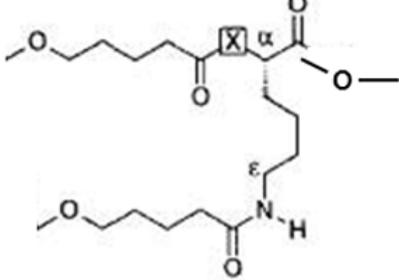
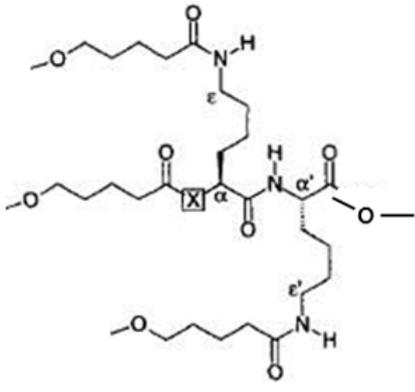
$(L_i-Z_j)-(J-A_m)_n-X-R-Y-B$ Fórmula estructural (4)

30 El ligando en las fórmulas estructurales (3) y (4) puede seleccionarse preferiblemente del grupo que consiste en un anticuerpo específico de receptor diana o aptámero, teniendo el péptido propiedades de RME para la promoción de la internalización celular de la manera específica de célula diana; o folato (generalmente, folato y ácido fólico se usan de manera interseccional, y el folato en la presente invención significa folato en un estado natural o en un estado activado en un cuerpo humano), productos químicos tales como azúcar, carbohidrato, etc., incluyendo hexoaminas tales como N-acetil-galactosamina (NAG), etc., glucosa, manosa, pero la presente invención no se limita a los mismos.

35 En particular, cuando el ligando de la presente invención es azúcar tal como N-acetil-galactosamina (NAG), manosa, glucosa, etc., el ligando correspondiente no solo puede complementar y fortalecer la hidrofiliidad que puede disminuirse en función del número de repetición del monómero en el bloque de material hidrófilo, sino que también proporciona un efecto de direccionamiento de las nanopartículas formadas de estructuras según las fórmulas estructurales (3) y (4) de la presente invención, de manera que las nanopartículas pueden formarse fácilmente.

40 El ligando puede o bien conectarse directamente al monómero de material hidrófilo en el bloque de material hidrófilo mediante un enlace covalente, o puede unirse al monómero de material hidrófilo en el bloque de material hidrófilo mediante un enlazador (Z) que media la unión del ligando. Es obvio para un experto en la técnica que cuando el ligando está unido covalentemente al monómero de material hidrófilo en el bloque de material hidrófilo por el enlazador (Z), puede usarse cualquier enlazador siempre que cumpla los objetos de la presente invención. En particular, el enlazador preferiblemente tiene cualquier estructura seleccionada de los compuestos (4) a (7) mostrados en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Estructura del enlazador preferente en la presente invención.

	<p>compuesto (4)</p>
	<p>compuesto (5)</p>
	<p>compuesto (6)</p>
	<p>compuesto (7)</p>

5 En el compuesto (4), T es un compuesto en el que cualquier compuesto seleccionado de los compuestos (1) a (3) se repite de 1 a 15 veces, y en particular, se prefiere repetir el compuesto representado por la fórmula estructural (1) de 1 a 15 veces. En el compuesto (4), T se une al ligando, y el extremo distal se une al monómero de material hidrófilo en el bloque de material hidrófilo o el enlazador.

10 Además, en los compuestos (5) a (7), el lado izquierdo del grupo funcional se une al ligando, y el lado derecho se une al monómero de material hidrófilo en el bloque de material hidrófilo, y n en el compuesto (5) es 0 o 1. Al menos un grupo funcional que es capaz de unirse al ligando se incluye en los compuestos (5) a (7), de manera que al menos una unión de ligando puede mejorar más la eficiencia de administración del oligo ARN bicatenario según la presente invención en el tejido diana.

15 En las fórmulas estructurales (3) y (4), cuando ambos de i y j son 0, se proporciona una estructura de oligonucleótidos a la que el ligando no está unido, y cuando i es 1 y j es 0, se proporciona una forma en la que el ligando se une directamente al monómero de material hidrófilo en el bloque de material hidrófilo, y cuando i es un número entero de 1 o más, y j es 1, se proporciona una forma mediada por enlazador en la que el ligando se une al monómero de material hidrófilo en el bloque de material hidrófilo.

20 Además, la presente invención proporciona estructuras en las que el grupo amino o el grupo de polihistidina se introduce adicionalmente en el extremo del material hidrófilo de las estructuras representadas por las fórmulas estructurales 1 y 2, en particular, la parte de extremo distal del extremo unido a ARNip, es decir, las estructuras representadas por las fórmulas estructurales 5 y 6 en las que Q es P-J₁-J₂ en las fórmulas estructurales (1) y (2).

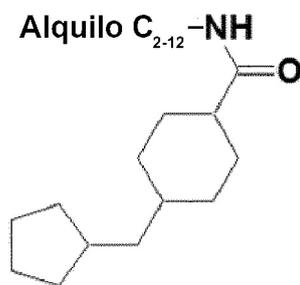
P-J₁-J₂-(A_m-J)_n-X-R-Y-B Fórmula estructural (5)

P-J₁-J₂-(J-A_m)_n-X-R-Y-B Fórmula estructural (6)

5 En las fórmulas estructurales (5) y (6), J₁ y J₂ son enlazadores y cada uno es de manera independiente un enlace covalente simple o se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en alquilo C₂₋₁₂, alquilo, alqueno, alquino, PO₃⁻, SO₃ y CO₂, pero la presente invención no se limita a los mismos. Es obvio para un experto en la técnica que cualquier enlazador puede usarse como J₁ y J₂, siempre que cumpla los objetos de la presente invención
10 dependiendo del material hidrófilo usado.

15 Preferiblemente, cuando se introduce el grupo amino, en la fórmula estructural (5), J₂ es preferiblemente PO₃⁻, y J₁ es preferiblemente alquilo C₆, y en la fórmula estructural (6), J₂ es preferiblemente un enlace covalente simple, y J₁ es preferiblemente alquilo C₆, pero la presente invención no se limita a los mismos.

Además, cuando se introduce el grupo de polihistidina, en la fórmula estructural (5), J₂ es preferiblemente PO₃⁻, y J₁ es preferiblemente el compuesto (8), y en la fórmula estructural (6), J₂ es preferiblemente un enlace covalente simple, y J₁ es preferiblemente el compuesto (8), pero la presente invención no se limita a los mismos.



Compuesto (8)

20 El grupo amino en las fórmulas estructurales (5) y (6) puede ser grupos amino primario a terciario, y el grupo amino primaria es particularmente preferido. El grupo amino introducido puede estar presente como una sal de amina. Por ejemplo, la sal del grupo amino primaria puede estar presente en una forma de NH₃⁺. Además, el grupo de polihistidina en las fórmulas estructurales (5) y (6) incluye preferiblemente, de 3 a 10 histidinas, más preferiblemente, de 5 a 8 histidinas, y lo más preferiblemente, 6 histidinas. Además de histidina, puede incluirse adicionalmente al menos una cisteína.

30 El grupo amino o el grupo de polihistidina se introduce para llevar a cabo fácilmente la introducción intercelular y escapar del endosoma de la estructura de ARN de oligonucleótido, y una posibilidad de introducir el grupo amino y usar el grupo de polihistidina para llevar a cabo fácilmente la introducción intercelular y el escape del endosoma de los portadores tales como punto cuántico, dendrímero, liposoma, etc., y ya se ha informado del efecto de los mismos.

35 Específicamente, se sabe que el grupo amino primario expresado en el extremo o en la parte externa del portador es protonado en pH *in vivo* para formar un conjugado con un gen cargado de manera negativa mediante una interacción electrostática, y el escape del endosoma se realiza fácilmente debido a aminas terciarias internas que tienen un efecto tampón a un pH bajo del endosoma después de haber sido introducido en las células, siendo por
40 ello capaz de proteger el portador de la descomposición de lisosoma (Gene Delivery and Expression Inhibition Using Polymer-Based Hybrid Material. Polymer Sci. Technol., Vol. 23, N. °3, págs. 254-259).

Se sabe que la histidina, que es uno de los aminoácidos no esenciales, tiene un anillo de imidazol (pKa3 6,04) en un residuo (-R) para aumentar una capacidad de tampón (capacidad de tamponado) en el endosoma y el lisosoma, de manera que la expresión de histidina puede usarse para aumentar la eficiencia de escape del endosoma en
45 portadores de genes no virales, incluyendo liposomas (Novel histidine-conjugated galactosylated cationic liposomes for efficient hepatocyte selective gene transfer in human hepatoma HepG2 cells. J. Controlled Release 118, págs. 262-270).

50 En las fórmulas estructurales (1) a (6) en la presente invención, el bloque de material hidrófilo o el material hidrófobo está unido al oligonucleótido por el enlace covalente simple o el enlace covalente mediado por enlazador (X o Y). El enlazador que media el enlace covalente está unido covalentemente al bloque de material hidrófilo o el material hidrófobo representado por (A_m-J)_n o (J-A_m)_n en las fórmulas estructurales (1) y (2) en el extremo del oligonucleótido, y no está particularmente limitado, siempre y cuando se proporciona el enlace que es posible que se descomponga en un entorno específico, según sea necesario. Por lo tanto, cualquier compuesto para la unión para activar el

oligonucleótido y/o el material hidrófilo (o material hidrófobo) en la preparación de la estructura de oligonucleótidos puede usarse como el enlazador. El enlace covalente puede ser cualquiera de un enlace no degradable o un enlace degradable. Aquí, los ejemplos del enlace no degradable pueden incluir un enlace amida o un enlace de fosforilación, y ejemplos del enlace degradable puede incluir un enlace de disulfuro, un enlace degradable de ácido, un enlace éster, un enlace anhídrido, un enlace biodegradable o un enlace enzimáticamente degradable, y similares, pero la presente invención no se limita necesariamente a los mismos.

En las fórmulas estructurales (1) a (6) de la presente invención, cuando el oligonucleótido bicatenario, en particular, se usa el oligo ARN bicatenario, las uniones del oligo ARN bicatenario y el bloque de material hidrófilo y el material hidrófobo puede variarse como se muestra en las fórmulas estructurales 7 a 18 de la tabla 3 a continuación.

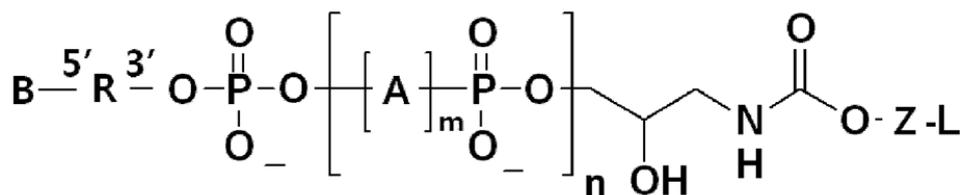
Tabla 3. Tipos de uniones entre el oligo ARN bicatenario y material hidrófilo e hidrófobo preferente en la presente invención

Fórmula estructural	Tipos	Detalles
Fórmula estructural (7)	$(A_m-J)_n-X-3' S 5'-Y-B$ AS	Este tipo muestra parte del resto de la fórmula estructural (1) excluyendo Q, y un tipo de ese bloque de material hidrófilo se une al extremo 3' de la cadena de sentido con n repetidamente y el material hidrofóbico se une al extremo 5' de la cadena de sentido
Fórmula estructural (8)	$(A_m-J)_n-X-3' S 5'-Y-B$ pAS	Un tipo al que más de un grupo fosfato se une al extremo 5' de la cadena de antisentido en la fórmula estructural (7)
Fórmula estructural (9)	$L-Z-(A_m-J)_n-X-3' S 5'-Y-B$ AS	Un tipo al que el ligando se une al bloque de material hidrófilo en la fórmula estructural (7)
Fórmula estructural (10)	$L-Z-(A_m-J)_n-X-3' S 5'-Y-B$ pAS	Un tipo al que más de un grupo fosfato se une al extremo 5' de la cadena de antisentido en la fórmula estructural (9)
Fórmula estructural (11)	$P-J_1-J_2-(A_m-J)_n-X-3' S 5'-Y-B$ AS	Un tipo al que el grupo amino o polihistidina se une al bloque de material hidrófilo en la fórmula estructural (7)
Fórmula estructural (12)	$P-J_1-J_2-(A_m-J)_n-X-3' S 5'-Y-B$ pAS	Un tipo al que más de un grupo fosfato se une al extremo 5' de la cadena de antisentido en la fórmula estructural (9)
Fórmula estructural (13)	$(J-A_m)_n-X-3' S 5'-Y-B$ AS	Este tipo muestra parte del resto de la fórmula estructural (2) con excluyendo Q, y un tipo al que el bloque de material hidrófilo se une al extremo 3' de la cadena de sentido con n repetidamente y el material hidrofóbico se une al extremo 5' de la cadena de sentido
Fórmula estructural (14)	$(J-A_m)_n-X-3' S 5'-Y-B$ pAS	Un tipo al que más de un grupo de fosfato se une al extremo 5' de la cadena de antisentido en la fórmula estructural (13)

Fórmula estructural (15)	$L-Z-(J-A_m)_n-X-3' S 5'-Y-B$ AS	Un tipo al que el ligando se une al bloque de material hidrófilo en la fórmula estructural (13)
Fórmula estructural (16)	$L-Z-(J-A_m)_n-X-3' S 5'-Y-B$ pAS	Un tipo al que más de un grupo fosfato se une al extremo 5' de la cadena de antisentido en la fórmula estructural (15)
Fórmula estructural (17)	$P-J_1-J_2-(J-A_m)_n-X-3' S 5'-Y-B$ AS	Un tipo al que el grupo amino o polihistidina se une al bloque de material hidrófilo en la fórmula estructural (13)
Fórmula estructural (18)	$P-J_1-J_2-(J-A_m)_n-X-3' S 5'-Y-B$ pAS	Un tipo al que más de un grupo fosfato se une al extremo 5' de la cadena de antisentido en la fórmula estructural (15)

En la tabla 3, S significa una cadena de sentido del oligo ARN bicatenario, AS significa una cadena de antisentido del oligo ARN bicatenario, y pAS significa una cadena de antisentido a la que está unido un grupo fosfato. El resto de A, B, X, Y, L, Z, n y m son los mismos que se definen en las fórmulas estructurales (1) y (2).

5 En particular, la estructura de oligonucleótidos según la presente invención representada por la fórmula estructural (4) tiene, preferentemente, una estructura representada por la siguiente fórmula estructural (19):

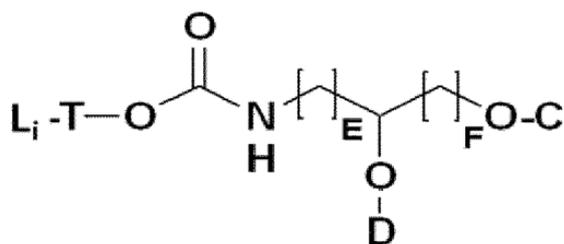


Fórmula estructural (19)

10 En la fórmula estructural (19), A es un monómero de material hidrófilo, B es un material hidrófobo, L es un ligando unido específicamente al receptor que promueve la internalización de célula diana a través de endocitosis mediada por receptor (RME), Z es un enlazador que media una unión entre el monómero de material hidrófilo y el ligando, R es un oligonucleótido monocatenario o bicatenario, m es un número entero de 1 a 15, n es un número entero de 1 a 10, y A, B, L, R, etc., son los mismos tal como se definen en la fórmula estructural (4) de la presente memoria descriptiva.

15 En particular, A es cualquier material seleccionado de los compuestos (1) a (3) mostrados en la tabla 1, y Z es preferiblemente un compuesto (4).

20 En otro aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona un soporte sólido representado por la siguiente fórmula estructural (20):



Fórmula estructural (20)

25 En la fórmula estructural (20), L es la misma que se define en las fórmulas estructurales (3) y (4), y T es la misma que se define en el compuesto (4). Además, uno de C y D es el soporte sólido, el otro es dimetoxitritilo, E y F son cada uno independientemente un número entero de 1 a 10, e i representa 0 o 1.

En aún otro aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona un método para la preparación de estructuras de oligonucleótidos representadas por las fórmulas estructurales (1) a (4) usando el soporte sólido representado por la fórmula estructural (20).

5 El método consiste en preparar las estructuras de oligonucleótidos representadas por las fórmulas estructurales (1) a (4) usando el soporte sólido representado por la fórmula estructural (20) de la presente invención, y cuando el oligonucleótido es monocatenario, el método incluye:

10 (1) unir de manera covalente un bloque de material hidrófilo al soporte sólido representado por la fórmula estructural (20) n-veces de manera repetida;

(2) sintetizar un oligonucleótido monocatenario basado en el soporte sólido al que se une el bloque de material hidrófilo;

15 (3) unir de manera covalente un material hidrófobo al extremo 5' de oligonucleótido al que se une el bloque de material hidrófilo; y

(4) separar la estructura de oligonucleótidos del soporte sólido.

20 En la presente invención, el soporte sólido incluye vidrio de poro controlado (CPG), poliestireno, gel de sílice, papel de celulosa, etc., pero la presente invención no está limitada a los mismos. Cuando el soporte sólido es CPG, un diámetro es preferiblemente de 40 a 180 μm , y preferiblemente tiene un tamaño de poro de 500 a 3000 Å.

25 Además, cuando el oligonucleótido de la estructura de oligonucleótidos de la presente invención es un ARN bicatenario, el oligonucleótido bicatenario consiste preferiblemente en de 19 a 31 nucleótidos. El oligonucleótido bicatenario utilizable en la presente invención puede ser cualquier oligonucleótido bicatenario con respecto a cualquier gen que se usas para la terapia génica o para la investigación de genes o que tiene una posibilidad de usarse para la terapia génica o la investigación de genes.

30 La presente invención proporciona estructuras de oligonucleótidos bicatenarios (ARN) representados por las fórmulas estructurales (7) a (10) y (13) a (16) mostradas en la tabla 3, y un método para preparar las mismas. Específicamente, el método es para preparar las estructuras de oligonucleótidos representados por las fórmulas estructurales (7) a (10) y (13) a (16) usando el soporte sólido representado por la fórmula estructural (20) de la presente invención, y cuando el oligonucleótido es bicatenario, el método incluye:

35 (1) unir de manera covalente un bloque de material hidrófilo al soporte sólido representado por la fórmula estructural (20) n veces de manera repetida;

(2) sintetizar un ARN monocatenario basado en el soporte sólido al que se une el bloque de material hidrófilo;

40 (3) unir de manera covalente un material hidrófobo al extremo 5' de ARN al que se une el bloque de material hidrófilo;

45 (4) separar la estructura de polímero de ARN y un ARN monocatenario que tiene una secuencia complementaria a la misma del soporte sólido; y

(5) formar el oligonucleótido bicatenario mediante hibridación de la estructura de polímero de ARN y el ARN monocatenario que tiene una secuencia complementaria a la misma.

50 Más preferentemente, el método incluye:

(1) unir un bloque de material hidrófilo basado en el soporte sólido representado por la fórmula estructural (20);

(2) repetir la etapa (1) n-1 veces;

55 (3) sintetizar un ARN monocatenario basado en el soporte sólido al que está unido el bloque de material hidrófilo;

(4) unir un material hidrófobo al extremo 5' del ARN monocatenario;

60 (5) cuando se completa la síntesis, separar y purificar la estructura de polímero de ARN y un ARN monocatenario que tiene una secuencia complementaria a la misma desde el soporte sólido; y

(6) preparar la estructura de oligo ARN bicatenario mediante la hibridación de la estructura de polímero de ARN y el ARN monocatenario que tiene una secuencia complementaria a la misma.

65 Después de la etapa (5) anterior, cuando se completa la preparación, si se desea o no se prepara la estructura de

5 polímero de ARN y el ARN monocatenario, puede confirmarse mediante la purificación de la reactante usando cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) y la medición de un peso molecular de los mismos usando espectrometría de masas MALDI-TOF. En el método de preparación, la síntesis de ARN monocatenario que tiene una secuencia complementaria a la secuencia del ARN monocatenario sintetizado en la etapa (3), puede llevarse a cabo antes de la etapa (1) o puede realizarse durante cualquiera de las etapas (1) a (5).

10 Además, cuando un grupo fosfato se une al extremo 5' de la cadena de antisentido como se muestra en la fórmula estructural (8) o (14), el grupo fosfato puede unirse al extremo 5' de la cadena de antisentido antes o después de la etapa (6) del método de preparación.

15 Además, la presente invención proporciona estructuras de oligo ARN bicatenario a la que el ligando está unido representado por las fórmulas estructurales (9), (10), (15) y (16), y un método para preparar el mismo. Específicamente, el método para la preparación de las estructuras de oligo ARN bicatenario usando el soporte sólido representado por la fórmula estructural (20) incluye:

(1) unir de manera covalente un bloque de material hidrófilo basado en el soporte sólido representado por la fórmula estructural (20) n-veces repetidamente;

20 (2) sintetizar un ARN monocatenario basado en el soporte sólido al que está unido un bloque de material de ligando hidrófilo, sintetizado por la etapa (1);

(3) unir de manera covalente de un material hidrófobo al extremo 5' del material obtenido de la etapa (2);

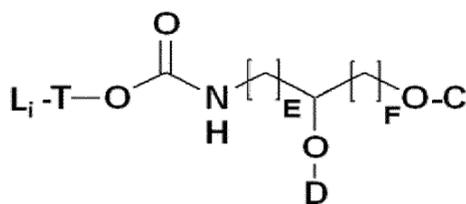
25 (4) cuando se completa la síntesis, separar y purificar la estructura de polímero de ARN monocatenario a la que el ligando está unido y el ARN monocatenario que tiene una secuencia complementaria a la misma del soporte sólido (CPG); y

(5) formar de la estructura de oligo ARN bicatenario mediante la hibridación de la estructura de polímero de ARN a la que está unido el ligando y el ARN monocatenario que tiene una secuencia complementaria a la misma.

30 Después de la etapa (5) anterior, cuando se completa la preparación, si se desea o no que se prepare la estructura de polímero de ARN a la que está unido el ligando y la estructura de ARN monocatenario, puede confirmarse mediante la purificación del reactante usando cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) y la medición de un peso molecular de los mismos usando espectrometría de masas MALDI-TOF. En el método de preparación, la síntesis del ARN monocatenario que tiene una secuencia complementaria a la secuencia del ARN monocatenario sintetizada en la etapa (2), puede realizarse antes de la etapa (1) o puede realizarse durante cualquier etapa de las etapas (1) a (4).

40 Además, cuando un grupo de fosfato se une al extremo 5' de la cadena de antisentido como se muestra en la fórmula estructural (10) o (16), el grupo fosfato puede estar unido al extremo 5' de la cadena de antisentido antes o después de la etapa (6) del método de preparación.

45 En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar un material representado por la fórmula estructural (21) y las estructuras de oligonucleótidos representadas por las fórmulas estructurales (1) a (4), usando el material. La fórmula estructural (21) es diferente de la fórmula estructural (20) solo en vista de los sustituyentes C y D:



Fórmula estructural (21)

50 En el material representado por la fórmula estructural (21), uno de C y D es dimetoxitritilo, y el otro es cianoetilfosforoamidita.

55 El método consiste en preparar las estructuras de oligonucleótidos representadas por las fórmulas estructurales (1) a (4) usando el material representado por la fórmula estructural (21) de la presente invención, y cuando el oligonucleótido es monocatenario, el método incluye:

(1) sintetizar un oligonucleótido monocatenario usando un soporte sólido al que está unido un grupo funcional, preferiblemente, CPG;

(2) unir de manera covalente un monómero de material hidrófilo basado en el soporte sólido al que está unido el oligonucleótido n-veces repetidamente;

5 (3) unir de manera covalente un material representado por la fórmula estructural (21) al extremo 5' del oligonucleótido al que está unido el material hidrófilo;

(4) separar la estructura de polímero oligonucleótido del soporte sólido; y

10 (5) unir de manera covalente un material hidrófobo a través del grupo funcional unido al extremo 3' de la estructura de oligonucleótidos obtenida en la etapa (4).

Además, el método consiste en preparar las estructuras de oligonucleótidos representadas por las fórmulas estructurales (1) a (4) usando el material representado por la fórmula estructural (21) de la presente invención, y cuando el oligonucleótido es bicatenario, el método incluye:

15 (1) sintetizar un oligonucleótido monocatenario usando un soporte sólido al que está unido un grupo funcional, preferiblemente, CPG;

20 (2) unir de manera covalente un monómero de material hidrófilo basado en el soporte sólido al que el oligonucleótido está unido n-veces repetidamente;

(3) unir de manera covalente un material representado por la fórmula estructural (21) al extremo 5' del oligonucleótido al que está unido el material hidrófilo;

25 (4) separar la estructura de polímero de ARN y el ARN monocatenario que tiene una secuencia complementaria a la misma a partir del soporte sólido;

30 (5) unir de manera covalente un material hidrófobo a través del grupo funcional unido al extremo 3' de la estructura de oligonucleótidos obtenida en la etapa (4); y

(6) formar la estructura de oligonucleótidos bicatenarios mediante la hibridación de la estructura de polímero de ARN y el ARN monocatenario que tiene una secuencia complementaria a la misma.

35 Además, cuando un grupo fosfato se une al extremo 5' de la cadena de antisentido, el grupo fosfato puede unirse al extremo 5' de la cadena de antisentido antes o después de la etapa (6) del método de preparación.

Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona nanopartículas formadas de las estructuras de oligonucleótidos representadas por cualquiera de las fórmulas estructurales (1) a (6). El oligonucleótido es anfipático que contiene tanto materiales hidrófobos como materiales hidrófilos, en los que la parte hidrófila que consiste en n bloques de material hidrófilo tiene afinidad a través de una interacción, tal como enlace de hidrógeno, etc., con las moléculas de agua presentes en el cuerpo para que esté orientado hacia la parte exterior, y los materiales hidrófobos estén orientados hacia la parte interior mediante una interacción hidrófoba entre los mismos, formando de esta manera una nanopartícula termodinámicamente estable (SAMiRNA). Es decir, los materiales hidrófobos se colocan en el centro de la nanopartícula y los bloques de material hidrófilo se colocan en una dirección hacia fuera del oligonucleótido, formando de ese modo nanopartículas que protegen el oligo ARN bicatenario (véase la figura 1). Las nanopartículas tal como se formaron anteriormente pueden mejorar la administración intracelular del oligonucleótido y mejorar una eficacia para el control de la expresión génica de oligonucleótido, que es posible para que se utilice para el tratamiento de enfermedades.

50 Adicionalmente, ya que el monómero de material hidrófilo en el bloque de material hidrófilo y el número de monómeros del mismo puede controlarse fácilmente, y el número de bloques de material hidrófilo que se usan también puede controlarse fácilmente, las partes de material hidrófilo que consiste en n bloques de material hidrófilo en todas las estructuras de oligonucleótidos son las mismas entre sí, de manera que la estructura de oligonucleótidos que tiene la parte de material hidrófilo tiene ventajas en porque es fácil de realizar análisis de materiales, y en comparación con la estructura de oligonucleótidos sintetizada usando el material hidrófilo a través de proceso de purificación adicional con el fin de tener el mismo peso molecular, un proceso de síntesis es sencillo, y el coste puede reducirse.

60 Además, ya que el tamaño de nanopartículas formadas de la estructura de oligonucleótidos puede regularse mediante el control del número de repetición de bloques de material hidrófilo y monómeros de material hidrófilo en el bloque de material hidrófilo, las nanopartículas formadas basadas en el oligonucleótido pueden tener la capacidad de administración de células significativamente reproducible.

65 Además, el oligonucleótido al que está unido el ligando, en el que el ligando es particularmente azúcares tales como N-acetil-galactosamina (NAG), manosa, glucosa, etc., y la estructura de oligonucleótidos se representa por la

fórmula estructural (1) o (2), puede complementar de manera simultánea y fortalecer hidrofiliidad que se reduce cuando se reduce el número de repetición de bloques de material hidrófilo, estabilizando de ese modo la formación de las nanopartículas. Las nanopartículas a las que el ligando está unido tal como se formaron anteriormente pueden mejorar la administración intracelular del oligonucleótido y mejorar la eficacia del oligonucleótido, que es posible que se utilice para el tratamiento de enfermedades. Se describirá una síntesis más específica de la estructura y características, eficacia de administración intracelular y efectos de nanopartículas formadas de las estructuras de oligonucleótidos mediante los siguientes ejemplos con más detalle.

Además, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento que usa las estructuras de oligonucleótidos o las nanopartículas formadas en base a las estructuras de oligonucleótidos. Específicamente, el método de tratamiento incluye la preparación de las nanopartículas formadas de las estructuras de oligonucleótidos y la administración de las nanopartículas en un cuerpo de un animal.

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que incluye una cantidad farmacéuticamente eficaz de nanopartículas formadas de las estructuras de oligonucleótidos.

La composición de la presente invención puede prepararse incluyendo adicionalmente al menos un tipo de portador farmacéuticamente aceptable para la administración, además de los componentes eficaces descritos anteriormente para la administración. El portador farmacéuticamente aceptable se requiere que sea compatible con los componentes eficaces de la presente invención. Un componente seleccionado de solución salina, agua estéril, solución de Ringer, solución salina tamponada, solución de dextrosa, solución de maltodextrina, glicerol, etanol o puede usarse una mezcla de dos o más de los mismos. Además, otros aditivos convencionales tales como antioxidantes, tampón, fungistático, etc., pueden añadirse a la misma según sea necesario. Además, la composición puede prepararse como una formulación para inyección, tales como una disolución acuosa, suspensión, emulsión, etc., mediante la adición de diluyente, dispersante, agente tensioactivo, aglutinante y lubricante a la misma. Además, los métodos adecuados en la técnica o un método dado a conocer en la ciencia farmacéutica de Remington, empresa de publicación Mack, Easton PA, pueden usarse preferiblemente para la formulación dependiendo de cada enfermedad o componente.

La composición farmacéutica de la presente invención puede determinarse basándose en los síntomas del paciente general y la gravedad de la enfermedad por expertos generales en la técnica. Además, la composición puede formularse con diversos tipos, tales como polvo, comprimido, cápsula, disolución, inyección, pomada, jarabe y similares, y puede proporcionarse como recipiente de dosis unitaria o un dosis múltiple, por ejemplo, una ampolla sellada, botella, y similares.

La composición farmacéutica de la presente invención puede ser administrada por vía oral o parenteral. Ejemplos de una vía de administración de la composición farmacéutica según la presente invención pueden incluir administración oral, intravenosa, intramuscular, intrarterial, intramedular, intradural, intracardiaca, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intestinal, sublingual o administración tópica, pero la presente invención no se limita a los mismos.

Para la administración clínica tal como se ha descrito anteriormente, la composición farmacéutica de la presente invención puede prepararse como una formulación apropiada mediante la tecnología conocida. La cantidad de administración de la composición de la presente invención puede tener diversos intervalos de los mismos en función del peso, edad, sexo, estado de salud, dieta, tiempo de administración, método, tasa de excreción, la gravedad de enfermedad, y similares, de un paciente, y puede determinarse fácilmente por un experto general en la técnica.

La presente divulgación proporciona un método para regular la expresión de genes *in vivo* o *in vitro*, usando la estructura de oligonucleótidos. Además, la presente divulgación proporciona un método para regular la expresión de genes *in vivo* o *in vitro*, usando la nanopartícula que contiene la estructura de oligonucleótidos.

Ejemplos

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá en detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son solo para ejemplificar la presente invención, y será obvio para los expertos en la técnica que el alcance de la presente invención no debe interpretarse como que está limitada a estos ejemplos.

Ejemplo 1. Preparación de (3' N-acetil-galactosamina) CPG (vidrio de poro controlado)

Con el fin de preparar una estructura de oligo ARN bicatenario al que está unido un ligando, se preparó N-acetil-galactosamina CPG que es un material de ligando y que puede unirse a la estructura de oligo ARN bicatenario.

Ejemplo 1-1. Preparación de reactivo 1-hexa(etilenglicol)-N-acetil-galactosamina-CPG (vidrio de poro controlado)

Con el fin de unir N-acetil-galactosamina (NAG) a la estructura de oligo ARN bicatenario, se preparó 1-hexa(etilenglicol)- N-acetil-galactosamina-CPG (vidrio de poro controlado) como se muestra en la figura 2.

Ejemplo 1-1-1. Preparación de 1,3,4,6-tetraacetil-NAG (compuesto 1 de la figura 2)

Los materiales de partida, hidrocloreto de galactosamina (Sigma Aldrich, EE.UU.) (10 g, 46,37 mmol), acetonitrilo (150 ml), y trietilamina (556,48 ml) se mezclaron entre sí y se sometió a reflujo durante 1 hora. La mezcla se enfrió lentamente a temperatura ambiente, se enfrió a 0 °C usando agua con hielo, y anhídrido acético (43,83 ml, 463,70 mmol) se añadió gota a gota. Después de que se completó la adición, se retiró el agua con hielo, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Después de que se completó la reacción, se añadió lentamente disolución acuosa de bicarbonato de sodio saturado hasta que el pH fuera neutro. Después de que el pH fuera neutro, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para obtener un sólido, el sólido obtenido se filtró, y el filtrado se lavó secuencialmente con acetato de etilo, agua destilada, y acetato de etilo. El sólido se secó a vacío para obtener 1,3,4,6-tetraacetil-NAG (9,792 g, 56%) (véase la figura 2).

Ejemplo 1-1-2. Preparación de 3,4,6-triacetil-1-hexa(etilenglicol)-N-acetil-galactosamina (compuesto 2 de la figura 2)

1,3,4,6-tetraacetil-N-acetil-galactosamina (6,77 g, 18,04 mmol) obtenido del ejemplo 1-1-1, cloruro de hierro (III) (3,80 g, 23,45 mmol), y cloruro de metileno (200 ml) se mezclaron entre sí y se agitaron a temperatura ambiente. Después de agitar durante 10 minutos, hexa(etilenglicol) (5,90 ml, 4,82 mmol) se añadió a la misma y se sometió a reflujo durante 2 horas. Después de que se completó la reacción, la mezcla se filtró a través de celita, y el filtrado se lavó con cloruro de metileno. El filtrado se concentró a presión reducida, y se añadieron acetato de etilo y agua destilada para extraer una capa de agua. La capa de agua obtenida se extrajo con cloruro de metileno, y se recogió la capa orgánica y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida, y se secó al vacío para obtener 3,4,6-triacetil-1-hexa (etilenglicol)-N-acetil-galactosamina (2,24 g, 74,9%) (véase la figura 3).

Ejemplo 1-1-3. Preparación de 3,4,6-triacetil-1-[hexa(etilenglicol)-N'-1', 2'-propanodiol]-N-acetil-galactosamina (compuesto 3 de la figura 2).

Se añadió 3,4,6-triacetil-1-hexa(etilenglicol)-N-acetil-galactosamina (13,66 g, 22,33 mmol) obtenido por el ejemplo 1-1-2 a acetonitrilo (220 ml) y se agitó. Carbonato de N-N'-disuccinimidilo (9,15g, 35,73mmol), y trietilamina (9,90 ml, 71,46 mmol) se añadieron al mismo y se agitaron durante 24 horas. 3-amino-1,2-propanodiol (3,26 g, 35,73 mmol) se diluyó con N, N'-dimetil formamida (60 ml), trietilamina (4,95 ml, 35,73 mmol) se añadió a la misma, y se añadió la mezcla a una disolución de reacción y se agitó durante 24 horas. La mezcla se concentró a presión reducida y se secó al vacío. La mezcla se separó mediante una columna, y la disolución obtenida se concentró a presión reducida. La mezcla obtenida se secó al vacío para obtener 3,4,6-triacetil-1-[hexa(etilenglicol)-N'-1', 2'-propanodiol]-N-acetil-galactosamina (9,23g, 56,7%) (véase la figura 4).

Ejemplo 1-1-4. Preparación de 3,4,6-triacetil-1-[hexa(etilenglicol)-N'-1'-metoxi(dimetoxitritilo)-2'-propanol]-N-acetil-galactosamina (compuesto 4 de la figura 2).

3,4,6-triacetil-1-[hexa(etilenglicol)-N'-1', 2'-propanodiol]-N-acetil-galactosamina (9,23 g (12,67 mmol, 1 eq)) obtenido por el ejemplo 1-1-3 se añadió a cloruro de metileno (120 ml) y se agitó. Se añadió trietilamina (5,27 ml (38,00 mmol, 3 eq)) a la misma. Se añadió cloruro de DMT (4,72 g, 13,93 mmol) diluido en cloruro de metileno (20 ml) y la mezcla se agitó durante 24 horas. La mezcla se concentró a presión reducida, se extrajo con acetato de etilo, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida. La mezcla se separó mediante una columna, y la disolución obtenida se concentró a presión reducida. La mezcla obtenida se secó al vacío para obtener el 3,4,6-triacetil-1-[hexa(etilenglicol)-N'-1'-metoxi-dimetoxitritilo-2'-propanol]-N-acetil-galactosamina deseado (7,77 g, 59,5%).

Ejemplo 1-1-5. Preparación de 3,4,6-triacetil-1-[hexa(etilenglicol)-N'-1'-metoxi(dimetoxitritilo)-2'-propoxi(ácido succínico)]-N-acetil-galactosamina (compuesto 5 de la figura 2).

3,4,6-triacetil-1-[hexa(etilenglicol)-N'-1'-metoxi(dimetoxitritilo)-2'-propanol]-N-acetil-galactosamina (7,72 g, 7,487 mmol) obtenido mediante el ejemplo 1-1-4 se añadió a piridina (70 ml), y se agitó. Anhídrido acético (3,75 g, 37,486 mmol) y DMAP (0,46 g, 3,745 mmol) se añadieron al mismo, y la mezcla se agitó a de 60 a 70 °C durante 24 horas. La mezcla se concentró a presión reducida y se secó al vacío. La mezcla se extrajo con acetato de etilo. La mezcla se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida. El filtrado se separó por la columna y la disolución obtenida se concentró a presión reducida. La mezcla obtenida se secó al vacío para obtener el 3,4,6-triacetil-1-[hexa(etilenglicol)-N'-1'-metoxi(dimetoxitritilo)-2'-propoxi(ácido succínico)]-N-acetil-galactosamina deseado (7,61 g, 89,9%).

Ejemplo 1-1-6. Preparación del compuesto de CPG antes del recubrimiento de 3,4,6-triacetil-1-hexa(etilenglicol)-N-acetil-galactosamina-CPG (compuesto 6 de la figura 2)

3,4,6-triacetil-1-[hexa(etilenglicol)-N'-1'-metoxi(dimetoxitritilo)-2'-propoxi(ácido succínico)]-N-acetil-galactosamina (0,34 g, 0,30 mmol) obtenido mediante el ejemplo 1-1-5 se añadió a un vidrio de poro controlado por alquilamina cadena larga (LCAA-CPG) (1000 Å) (5 g), cloruro fosfórico de bis-2-oxo-3-oxazolidinil (0,2 g, 0,45 mmol), 1-

hidroxibenzotriazo (0,06 g, 0,45 mmol), y cloruro de metileno (50 ml). Se añadió trietilamina (0,03 ml, 2,25 mmol) al mismo. Se hizo reaccionar la mezcla durante 24 horas. La mezcla se filtró y se lavó con metanol. La mezcla se secó para obtener un compuesto de CPG deseado (4,91 g) antes del recubrimiento de 3,4,6-triacetil-1-hexa(etilenglicol)-N-acetil-galactosamina-CPG.

5 Ejemplo 1-1-7. Preparación de 3,4,6-triacetil-1-hexa(etilenglicol)-N-acetil-galactosamina-CPG (vidrio de poro controlado) (compuesto 7 de la figura 2).

10 El compuesto de CPG (4,86 g) antes del recubrimiento de 3,4,6-triacetil-1-hexa(etilenglicol)-N-acetil-galactosamina-CPG obtenido mediante el ejemplo 1-1-6, se añadió a piridina (30 ml), anhídrido acético (6,02 ml, 63,70 mmol) y 1-metilimidazol (5,08 ml, 63,70 mmol), y se hizo reaccionar durante 24 horas. La mezcla se filtró y se lavó con metanol. El filtrado se secó al vacío para obtener un compuesto deseado, 3,4,6-triacetil-1-hexa(etilenglicol)-N-acetil-galactosamina-CPG (vidrio de poro controlado) (2,8 g).

15 Ejemplo 2. Preparación de la estructura de oligo ARN bicatenario

En lo sucesivo, con el fin de inhibir la Survivina, se usó un oligo ARN bicatenario para Survivina. La Survivina, que es la proteína expresada comúnmente en la mayoría de tumores neoplásicos o líneas celulares transformadas sometidas a prueba hasta ahora, se espera que un objetivo importante en el tratamiento del cáncer (Survivin: a new target for anti-cancer therapy. Cancer Treat Rev. Noviembre de 2009; 35(7): 553-62).

20 El oligo ARN bicatenario para Survivina de la presente invención consiste en una cadena de sentido de la SEQ ID NO: 1 y una cadena de antisentido que tiene una secuencia complementaria al mismo, y un oligo ARN bicatenario usado como grupo de control consiste en una cadena de sentido de SEQ ID NO: 2 y una cadena de antisentido que tiene una secuencia complementaria al mismo. Las secuencias de base del oligo ARN bicatenario usado en los presentes ejemplos son de la siguiente manera:

(SEQ ID NO: 1) 5'-AAG GAG AUC AAC AUU UUC A-3'

(SEQ ID NO: 2) 5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG A-3'

30 En el oligo ARN bicatenario, la cadena simple de oligo ARN bicatenario se sintetizó mediante un método de uso de β -cianoetilfosforamidita para conectar un enlace fosfodiéster que forma una estructura de cadena principal de ARN (Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII: use of beta-cyanoethyl-N,N-dialkylamino-/N-morpholinophosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. Nucleic Acids Res. 11 de junio de 1984; 12(11): 4539-57).

35 Una secuencia deseada de la cadena simple de ARN podría obtenerse a partir del proceso de síntesis en el soporte sólido (CPG) que contiene nucleósido unido al mismo y la repetición de ciclos incluyendo desbloqueo, acoplamiento, recubrimiento y oxidación. Se usó el sintetizador de ARN 384 (Bioneer, Corea) para una serie del proceso de síntesis correspondiente del oligo ARN bicatenario.

40 Con el fin de analizar propiedades físicas de la nanopartícula formada de la estructura de oligo ARN bicatenario de acuerdo con el número de repetición del monómero de material hidrófilo que forma la estructura de oligo ARN bicatenario, se prepararon estructuras de oligo ARN bicatenario que tienen las siguientes estructuras.

45 Las estructuras de oligo ARN bicatenario a las que se unen el ligando preparado en la presente invención, tenía estructuras mostradas en la siguiente tabla 4, respectivamente.

Tabla 4. Detalles de estructura a la que se unen el ligando preparado en la presente invención

Nombre	Estructura detallada
SAMiRNA	C ₂₄ -5' S-3' PEG-NAG AS 5'-PO ₄
monoSAMiRNA (n=1)	C ₂₄ -5' S-3'-hexaetilenglicol-NAG AS 5'-PO ₄
monoSAMiRNA (n=2)	C ₂₄ -5' S-3' (hexaetilenglicol-PO ₄) ₁ -hexaetilenglicol-NAG AS 5'-PO ₄
monoSAMiRNA (n=3)	C ₂₄ -5' S-3' (hexaetilenglicol-PO ₄) ₂ -hexaetilenglicol NAG AS 5'-PO ₄
monoSAMiRNA (n=4)	C ₂₄ -5' S-3' (hexaetilenglicol-PO ₄) ₃ -hexaetilenglicol NAG AS 5'-PO ₄

50 En la tabla 4, S es una cadena de sentido del oligo ARN bicatenario; AS es una cadena de antisentido del oligo ARN bicatenario; PO₄ es un grupo fosfato; NAG es un ligando, N-acetil-galactosamina; PEG es un material hidrófilo

polidisperso, es decir, polietilenglicol; hexametilenglicol- PO_3^- es un monómero de material hidrófilo en el que hexaetilenglicol está unido a través de un grupo fosfato (PO_3^-); el subíndice es el número de repetición (n) del monómero de material hidrófilo; C_{24} es un material hidrófobo, y tetradocosano que incluye un enlace de disulfuro; y 5' y 3' significan directividades del extremo de oligo ARN bicatenario.

La cadena de antisentido de estructura de oligo ARN bicatenaria tiene la misma estructura. La cadena de antisentido de la estructura de oligo ARN bicatenaria se preparó por el método anteriormente descrito en el que un enlace fosfodiéster que forma una estructura de cadena principal de ARN se enlaza usando β -cianoetilfosoramidita. Entonces, con el fin de unir un grupo fosfato al extremo 5', reactivo de fosforilación química (CPR), que es [3-(4,4'-dimetoxitritiloxi)-2,2-dicarboxietil]propil-(2-cianoetil)-(N, N-diisopropil)-fosforamidita se usó para preparar una cadena de antisentido de S-SAMiRNALP- PO_4 a la que un grupo fosfato está unido al extremo 5'. De otro modo, la cadena de antisentido al que está unido el grupo fosfato se preparó mediante la recuperación de la cadena simple de ARN a partir de CPG y el tratamiento de una cinasa de fosforilación para unir el grupo fosfato al extremo 5'.

En el caso de la cadena de sentido de la estructura de oligo ARN bicatenario SAMiRNA, la cadena de sentido de SAMiRNA en la que NAG-PEG se une al extremo 3' y tetradocosano (C_{24}) se une al extremo 5' se preparó mediante la unión del material hidrófilo, es decir, polietilenglicol fosforamidato (PEG-fosforamidita, en el que el PEG tiene un peso molecular (Mn) de 2000) a través de la reacción anterior usando 3,4,6-triacetil-1-hexa(etilenglicol)-N-acetil-galactosamina-CPG preparados mediante el ejemplo 1, como un soporte, sintetizar ARN, y la unión de tetradocosano (C_{24}) que incluye un enlace de disulfuro al extremo 5'.

En el caso de la cadena de sentido de estructura del oligo ARN bicatenario monoSAMiRNA (n = 1), la cadena de sentido de monoSAMiRNA (n = 1) en la que NAG-hexaetilenglicol se une al extremo 3' y tetradocosano se une al extremo 5' se preparó mediante la síntesis de ARN a través de la reacción anterior usando 3,4,6-triacetil-1-hexa(etilenglicol)-N-acetil-galactosamina-CPG preparada mediante el ejemplo 1, como soporte, y, adicionalmente unir el material hidrófobo, es decir, tetradocosano (C_{24}) que incluye un enlace disulfuro, al extremo 5'.

En el caso de la cadena de sentido de estructura del oligo ARN bicatenario monoSAMiRNA (n = 2), la cadena de sentido de monoSAMiRNA (n = 2) en la que NAG-hexaetilenglicol-(- PO_4 -hexaetilenglicol)₁ se une al extremo 3' y tetradocosano se une al extremo 5' se preparó mediante la unión del monómero de material hidrófilo, es decir, demetoxitritilhexaetilenglicol fosforamidato, a través de la reacción anterior usando 3,4,6-triacetil-1-hexa(etilenglicol)-N-acetil-galactosamina-CPG preparados mediante el ejemplo 1, como soporte, sintetizar ARN, y, unir adicionalmente el material hidrófobo, es decir, tetradocosano (C_{24}) que incluye un enlace disulfuro, al extremo 5'.

En el caso de la cadena de sentido de estructura de oligo ARN bicatenario monoSAMiRNA (n = 3), la cadena de sentido de monoSAMiRNA (n = 3) en la que NAG-hexaetilenglicol-(- PO_4 -hexaetilenglicol)₂ se une al extremo 3' y el tetradocosano se une al extremo 5' se preparó mediante la unión de manera continua del monómero de material hidrófilo, es decir, dos demetoxitritilo hexaetilenglicol fosforamidatos, a través de la reacción anterior usando 3,4,6-triacetil-1-hexa(etilenglicol)-N-acetil-galactosamina-CPG preparados mediante el ejemplo 1, como un soporte, sintetizar ARN, y, adicionalmente unir el material hidrófobo, es decir, tetradocosano (C_{24}) que incluye un enlace disulfuro, al extremo 5'.

En el caso de la cadena de sentido de estructura de oligo ARN bicatenaria monoSAMiRNA (n = 4), la cadena de sentido de monoSAMiRNA (n = 4) en la que NAG-hexaetilenglicol-(- PO_3 -hexaetilenglicol)₃ se une al extremo 3' y tetradocosano se une al extremo 5' se preparó mediante la unión de manera continua del monómero de material hidrófilo, es decir, tres demetoxitritilo hexaetilenglicol fosforamidatos, a través de la reacción anterior usando 3,4,6-triacetil-1-hexa(etilenglicol)-N-acetil-galactosamina-CPG preparados mediante el ejemplo 1, como un soporte, sintetizar ARN, y, adicionalmente unir el material hidrófobo, es decir, tetradocosano (C_{24}) que incluye un enlace disulfuro, al extremo 5'.

Cuando se completó la síntesis, la estructura de cadena simple de ARN y la estructura de polímero de ARN sintetizadas mediante el tratamiento del 28% (v/v) de amoniaco en baño de agua a 60 °C se separaron de CPG y restos de protección se retiraron del mismo mediante una reacción de desprotección, respectivamente. La cadena simple de ARN y la estructura de polímero de ARN de la que se retiró el resto de protección se trataron con N-metilpirolidon, trietilamina y trietilaminatridihidrofluoro en una razón en volumen de 10:3:4 en un horno a 70 °C, para retirar 2' TBDMS (de terc-butildimetilsililo). La cadena simple de ARN, la estructura de polímero de ARN, y la estructura de polímero de ARN al que está unido el ligando se separaron de los reactivos mediante HPLC, y los pesos moleculares de los mismos se midieron mediante un espectrómetro de masas MALDI-TOF (SHIMADZU, Japón) para confirmar si o no la secuencia de bases y la estructura de polímero de ARN corresponden a las que serán sintetizadas (figuras 11 a 14). Entonces, con el fin de preparar cada estructura de oligo ARN bicatenario, la cadena de sentido y la cadena de antisentido en una cantidad equivalente se mezclaron entre sí y se colocaron en un tampón de hibridación 1X (HEPES 30 mM, acetato de potasio 100 mM, acetato de magnesio 2 mM (pH 7,0 a 7,5), seguido por la reacción en un baño de agua de temperatura constante a 90°C durante 3 minutos, y luego se hizo reaccionar a 37 °C, preparando de este modo el SAMiRNA deseado, monoSAMiRNA (n = 1), monoSAMiRNA (n = 2), monoSAMiRNA (n = 3) y monoSAMiRNA (n = 4), respectivamente. Se confirmó por electroforesis que se hibridaron las estructuras de oligo ARN bicatenario producidas.

Ejemplo 3. Análisis de propiedades físicas de nanopartículas que consisten en monoSAMIrRNA

Una nanopartícula, es decir, micela, se formó mediante una interacción hidrófobo entre los materiales hidrófobos unidos al extremo del oligo ARN bicatenario monoSAMIrRNA preparado mediante el ejemplo 2 (véase la figura 1).

Se confirmó la formación de la nanopartícula (SAMIrRNA) que consiste en monoSAMIrRNA correspondiente analizando el tamaño de nanopartículas y el valor de concentración micelar crítica (CMC) de acuerdo con el número de repetición de monómeros de material hidrófilo de monoSAMIrRNA, y microscopio electrónico de transmisión (TEM).

Ejemplo 3-1. Medición de concentración micelar crítica (CMC) de nanopartículas que consisten en monoSAMIrRNA

Un material anfífilo que contiene ambos grupos hidrófobos y grupos hidrófilos en una única molécula puede ser un tensioactivo, en el que cuando el tensioactivo se disuelve en una disolución acuosa, los grupos hidrófobos de los mismos se mueven hacia la parte central para evitar que los grupos hidrófobos se pongan en contacto con agua y grupos hidrófilos de los mismos se mueven hacia el exterior para formar una micela. Aquí, una concentración en la que se forma inicialmente la micela se denomina concentración micelar crítica (CMC). Un método de medición de CMC que utiliza un pigmento fluorescente se basa en la propiedad del pigmento fluorescente en el que la pendiente de la curva de gráfico de la intensidad de fluorescencia se cambia rápidamente antes/después de que se forma la micela. Con el fin de medir la CMC de la nanopartícula que consisten en monoSAMIrRNA, DPH 0,04 mM (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno, Sigma, EE.UU.) se preparó como el pigmento fluorescente. 1 nmol/ μ l de monoSAMIrRNA (n = 1) se diluyó a partir de una concentración de 0,0977 μ g/ml hasta el máximo de 50 μ g/ml con DPBS para cada etapa para preparar muestras de monoSAMIrRNA (n=1) que tienen un volumen total de 180 μ l. 20 μ l de DPH 0,04mM y metanol que es un solvente de DPH para un grupo de control se añadieron a las muestras preparadas, respectivamente, y se mezclaron bien, y se trataron mediante dispersor ultrasónico (Wiseclean: Daihan, Corea) de manera que un tamaño de la nanopartícula se homogeneiza (700 W; amplitud: 20%). Las muestras homogeneizadas se hicieron reaccionar a temperatura ambiente sin luz durante alrededor de 24 horas, y se midieron los valores de fluorescencia (excitación: 355 nm, emisión: 428 nm, leer la parte superior). Con la finalidad de confirmar valores fluorescentes relativos entre los valores de fluorescencia medidos, el valor de fluorescencia de la muestra que contiene DPH, se midió el valor de fluorescencia de la muestra que contiene solo el metanol (eje Y) a la misma concentración y muestra como un gráfico con respecto al valor logarítmico de la concentración tratada de monoSAMIrRNA (n=1) (eje X). MonoSAMIrRNA (n = 2) y monoSAMIrRNA (n = 3) se midieron mediante el mismo método según lo descrito anteriormente.

El valor de fluorescencia medido para cada concentración se incrementó rápidamente mientras se mueve desde una sección de baja concentración a una sección de alta concentración, en el que la concentración en el punto aumentado rápidamente es la concentración de CMC. Por lo tanto, al elaborar las líneas de tendencia dividiendo la sección de baja concentración en la que no se incrementa la cantidad de fluorescencia y la sección de alta concentración en la que la cantidad de fluorescencia se incrementa en varias secciones, un valor X en una intersección de las dos líneas de tendencia es la concentración de CMC. Se observó que la CMC medida de la nanopartícula que consiste en monoSAMIrRNA (n = 1) fue de 0,83 μ g/ml, la cual era relativamente alta, y la CMC medida de la nanopartícula que consiste en monoSAMIrRNA (n = 2) fue de 0,33 μ g/ml, la cual fue significativamente baja. Se observó que la CMC medida de la nanopartícula que consiste en monoSAMIrRNA (n = 3) fue de 0,58 μ g/ml, y la CMC medida de la nanopartícula que consisten en monoSAMIrRNA (n = 4) fue de 0,44 μ g/ml (figura 15). Por consiguiente, se confirmó que la micela puede formarse bien por la nanopartícula que consiste en monoSAMIrRNA incluso a una concentración significativamente baja.

Ejemplo 3-2. Preparación de nanopartículas que consisten en monoSAMIrRNA

Con el fin de preparar nanopartículas homogeneizadas, la monoSAMIrRNA (n = 1) se disolvió en 1,5 ml de DPBS (disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco) a una concentración de 50 μ g/ml, y la mezcla obtenida se secó por congelación en condiciones de -75 °C y 5mTorr durante 48 horas. MonoSAMIrRNA (n = 2), monoSAMIrRNA (n = 3) y monoSAMIrRNA (n = 4) se midieron mediante el mismo método según lo descrito anteriormente.

Ejemplo 3-3. Medición de tamaño e índice de polidispersidad (PDI) de nanopartículas que consisten en monoSAMIrRNA

Se midió un tamaño de la nanopartícula mediante medición de potencial zeta. Específicamente, un tamaño de la nanopartícula homogeneizada producida mediante el ejemplo 3-2 se midió mediante medición potencial zeta (Nano-ZS, Malvern, Inglaterra), en condiciones en las que un índice de refracción para el material fue de 1,459, un índice de absorción fue de 0,001, una temperatura de un disolvente: DPBS fue de 25 °C y la viscosidad correspondiente y el índice de refracción fueron de 1,0200 y 1,335, respectivamente. Una vez que la medición se llevó a cabo por una medida del tamaño incluyendo 15 repeticiones y luego se repitió seis veces. MonoSAMIrRNA (n=1), monoSAMIrRNA (n=2), monoSAMIrRNA (n=3), y monoSAMIrRNA (n= 4) se midieron mediante el mismo método según lo descrito

anteriormente.

Se confirmó que el tamaño de la nanopartícula que consiste en monoSAMiRNA (n = 1) fue de 111 nm y el PDI de la nanopartícula que consiste en monoSAMiRNA (n = 1) fue de 0,19. Se confirmó que el tamaño de la nanopartícula que consisten en monoSAMiRNA (n = 2) fue de 86 nm y el PDI de la misma fue de 0,25, un tamaño de la nanopartícula que consisten en monoSAMiRNA (n=3) fue de aproximadamente 80 nm y el PDI de la misma fue de 0,30, y un tamaño de la nanopartícula que consisten en monoSAMiRNA (n=4) fue de 83nm y el PDI de la misma fue de 0,26 (figura 16). Como se reduce el valor PDI, las partículas correspondientes se convierten distribuidas uniformemente, y, por lo tanto, podría apreciarse que la nanopartícula de la presente invención tiene un tamaño significativamente uniforme.

Ejemplo 3-4. Observación de nanopartículas que consisten en monoSAMiRNA por TEM

La nanopartícula que consisten en monoSAMiRNA fue observada por TEM con el fin de confirmar la forma de los mismos. En concreto, el S-SAMiRNA se disolvió en DPBS a fin de tener la concentración final de 100 µg/ml y tratado por dispersor ultrasónico (Wiseclean: Daihan, Corea) de manera que un tamaño de nanopartícula se homogeneiza (700 W; amplitud: 20%). La nanopartícula que consiste en S-SAMiRNA se observó con un material que tiene una alta densidad de electrones a través de un método de tinción negativa. Se confirmó que la nanopartícula observada por TEM tenía un tamaño similar al de la nanopartícula medida en el ejemplo 3-2.

Ejemplo 4. Inhibición de expresión de gen diana en línea celular de tumor usando nanopartículas que consisten en monoSAMiRNA

El aspecto de expresión del gen survivina de la línea de células tumorales transfectada se analizó mediante el uso de la nanopartícula que consiste en monoSAMiRNA preparada mediante el ejemplo 3-2.

Ejemplo 4-1. Cultivo de línea de célula tumoral

La célula de cáncer de cuello uterino humano (HeLa) adquirida de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) se cultivó en medio de cultivo EMEM (medio esencial mínimo de Eagle formulado de ATCC, EE.UU.) que contiene un 10% (v/v) de suero fetal bovino, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina, en condiciones de 37 °C y un 5% (v/v) de CO₂.

Ejemplo 4-2. Transformación de línea de células tumorales usando nanopartículas que consisten en monoSAMiRNA

Línea celular de 1×10⁵ de fibroblastos cultivados mediante el ejemplo 4-1 se cultivó en medio EMEM durante 18 horas en placa de 12 pocillos en condiciones de 37 °C y un 5% (v/v) de CO₂, y se retiró el medio, y la misma cantidad de medio Opti-MEM (Gibco, EE.UU.) para cada pocillo se dispensó. 100 µl de medio Opti-MEM y SAMiRNA y monoSAMiRNA producido por el ejemplo 3-2 se añadieron a DPBS en una concentración de 50 µg/ml, y la mezcla obtenida se secó por congelación en condiciones de -75 °C y 5 mTorr durante 48 horas por el mismo método que en el ejemplo 3-1, para producir nanopartículas homogeneizadas. Entonces, cada pocillo de la línea de célula tumoral en el que se dispensa la Opti-MEM se trató con una disolución de transfección a una concentración de 200 nM, y se cultivó en condiciones de 37 °C y un 5% (v/v) de CO₂ durante un total de 48 horas.

Ejemplo 4-3. Análisis cuantitativo relativo de ARNm del gen de Survivina

Se sintetizó ADNc mediante la extracción del ARN total de la línea de células transfectadas en el ejemplo 4-2 anterior, y una cantidad de expresión de ARNm Survivina se cuantificó relativamente mediante PCR en tiempo real de acuerdo con un método dado a conocer en la publicación expuesta a consulta por el público de patente coreana n.º 10-2009-0042297 (véase la figura 17). Sur584 significa SAMiRNA que tiene la secuencia de oligo ARN bicatenario (SEQ ID NO: 1) específico para el gen diana Survivina para cada estructura de SAMiRNA, y CONT significa SAMiRNA que incluye la secuencia de grupo de control (SEQ ID NO: 2) que no afecta a la expresión del gen diana. Un grado de inhibición de expresión de ARNm del gen diana se calculó con la cantidad de expresión del gen diana de una muestra tratada con Sur584 con respecto a la cantidad de expresión del gen diana de una muestra tratada con CONT través de la cuantificación comparativa. Todo el monoSAMiARN (n = 1 a 4), incluyendo oligo ARN bicatenario específico de survivina tuvo un efecto de inhibición de expresión de gen diana, y se observó que a partir de monoSAMiRNA (n=2) en el que los bloques de material hidrófilo son dos o más, se mantuvo el alto efecto de inhibición de la expresión de gen diana (alrededor del 75% o más de inhibición de la expresión).

Ejemplo 5 Preparación de estructura de oligo bicatenario en la que el grupo amino y/o grupo histidina se introduce en material hidrófilo

Ejemplo 5.1. Preparación de SAMiRNA que incluye etilenglicol como monómero de material hidrófilo

En un caso de la estructura de oligo bicatenario que incluye etilenglicol, en particular, hexametilenglicol como monómero de material hidrófilo, y tetradocosano C₂₄ como material hidrófobo en la presente invención, la estructura

de oligo bicatenario puede representarse por la siguiente fórmula estructural (22):

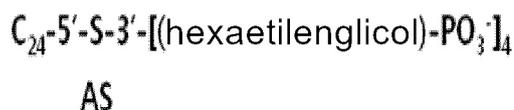


Fórmula estructural (22)

- 5 En la fórmula estructural (22), C₂₄ es tetradocosano que es un material hidrófobo, y n es una unidad de repetición de hexaetilenglicol y es el mismo que se define en la fórmula estructural (1) o (2).

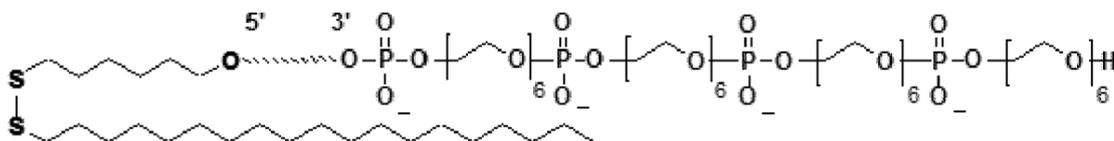
En el presente ejemplo, se preparó una estructura de oligo ARN bicatenario ([hexaetilenglicol]₄-SAMiRNA) representada por la siguiente fórmula estructural (23) siguiente, en la que n es 4:

10



Fórmula estructural (23)

La fórmula estructural (23) se representa específicamente mediante la siguiente fórmula estructural (24):



15 Fórmula estructural (24)

En las fórmulas estructurales (23) y (24), S es una cadena de sentido de ARNip; AS es una cadena de antisentido de ARNip; hexaetilenglicol es un material hidrófilo; C₂₄ es un material hidrófobo y tetradocosano que incluye un enlace disulfuro; y 5' y 3' significan directividades del extremo de oligo ARN bicatenario.

20

La cadena de sentido de ARNip de las fórmulas estructurales (23) y (24) se produjeron mediante la síntesis de n hexaetilenglicoles que tienen una forma de β-cianoetilfosforamidita, basado en 3' Uny-CPG producido mediante el ejemplo 1 de la publicación de patente coreana abierta a consulta por el público n.º 10-2012-0119212, como soporte, y la síntesis de una cadena de sentido de una estructura de material de oligo ARN-hidrófilo a la que está unido hexaetilenglicol al extremo 3' mediante el método anteriormente descrito en el que un enlace fosfodiéster que forma una estructura de cadena principal de ARN está enlazada utilizando el ARN β-cianoetilo fosforamidita, y uniendo el tetradocosano que incluye un enlace disulfuro al extremo 5', produciendo de este modo la cadena de sentido de la estructura de polímero de ARN deseada. Para una cadena de antisentido en la que se realiza la hibridación con la cadena de sentido, la cadena de antisentido que tiene una secuencia complementaria a la cadena de sentido se produjo mediante la reacción descrita anteriormente.

30

Quando se completó la síntesis, la estructura de polímero de ARN y cadena simple de ARN sintetizada mediante tratamiento del 28% (v/v) de amoníaco en baño de agua a 60 °C se separaron de CPG y restos de protección se retiraron del mismo mediante una reacción de desprotección, respectivamente. La estructura de polímero de ARN y la cadena simple de ARN de cada uno de los cuales se retiró el resto de protección, se trataron con N-metilpirrolidona, trietilamina y trietilaminatrihidrofluoruro en una razón en volumen de 10:3:4, en un horno a 70 °C, para retirar 2' TBDMS (terc-butildimetilsililo).

35

El ARN del producto de reacción se separó y se purificó mediante HPLC LC918 (Industria Analítica de Japón, Japón) equipado con columna Daisogel C18 (Daiso, Japón), y se confirmó si o no el ARN purificado coincide con la secuencia de base diana mediante el espectrómetro de masas MALDI-TOF (Shimadzu, Japón). Entonces, con el fin de preparar cada estructura de oligo ARN bicatenario, la cadena de sentido y la cadena de antisentido en una cantidad equivalente se mezclaron entre sí y se pusieron en un tampón de hibridación 1X (HEPES 30 mM, acetato de potasio 100 mM, acetato de magnesio 2 mM (pH 7,0 a 7,5)), seguido de la reacción en un baño de agua de temperatura constante a 90 °C durante 3 minutos, y se hizo reaccionar de nuevo a 37 °C, preparando de este modo cada estructura de oligo ARN bicatenario que incluye ARNip que tiene la secuencia de Survivina como la cadena de sentido. Se confirmó mediante electroforesis que se hibridó la estructura de oligo ARN bicatenario producido.

45

Ejemplo 5.2. Preparación de SAMiRNA que incluye etilenglicol en el que se introduce un grupo amino, como monómero de material hidrófilo

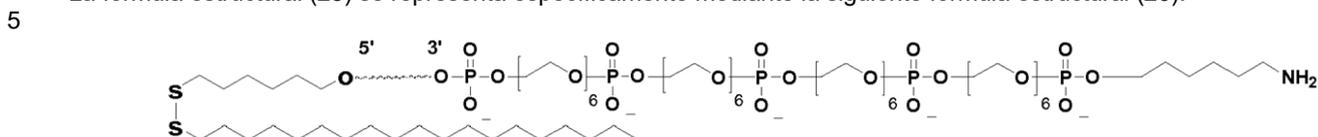
50

Se preparó una estructura de oligo ARN bicatenario representada por la siguiente fórmula estructural (25) en la que un grupo amino se introduce en el material hidrófilo.



Fórmula estructural (25)

La fórmula estructural (25) se representa específicamente mediante la siguiente fórmula estructural (26):



Fórmula estructural (26)

En las fórmulas estructurales (25) y (26), S es una cadena de sentido de ARNip; AS es una cadena de antisentido de ARNip; hexaetilenglicol es un material hidrófilo; C₆ es un enlazador con 6 átomos de carbono que conecta [etilenglicol]₄ y Amina, C₂₄ es un material hidrófobo y tetradocosano que incluye un enlace disulfuro; y 5' y 3' significan directividades del extremo de oligo ARN bicatenario.

Además, el bloque de material hidrófilo se conecta a un grupo de fosfato en el extremo 3' de la cadena simple de ARNip.

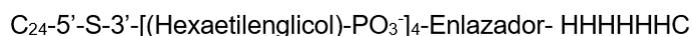
La cadena simple de ARNip de las fórmulas estructurales (25) y (26) se produjo mediante la síntesis de 4 hexaetilenglicoles que tienen una forma de β-cianoetil fosforamidita, basado en CPG que incluye derivado de succinimida 3', como soporte, y la síntesis de una cadena de sentido de una estructura de material de oligo ARN-hidrófilo a la que está unido hexaetilenglicol al extremo 3' por el método anteriormente descrito en el que un enlace fosfodiéster que forma una estructura de cadena principal de ARN está vinculado mediante el uso de β-cianoetil fosforamidita ARN, y de la unión de tetradocosano que incluye un enlace disulfuro al extremo 5', produciendo de este modo la cadena de sentido de la estructura de polímero de ARN deseada. Para una cadena de antisentido en la que la hibridación se realiza con la cadena de sentido, teniendo la cadena de antisentido una secuencia complementaria a la cadena de sentido se produjo por la reacción descrita anteriormente.

Cuando se completó la síntesis, la estructura de cadena doble de ARN polímero de ARN sintetizados mediante el tratamiento del 28% (v/v) de amoniaco en baño de agua a 60 °C se separaron de CPG y los restos de protección se retiraron del mismo mediante una reacción de desprotección, respectivamente. La cadena simple de ARN y la estructura de polímero de ARN de cada uno de los cuales se retiró el resto de protección, se trataron con N-metilpirolidona, trietilamina y trietilaminatridrofluoruro en una razón en volumen de 10:3:4, en un horno a 70 °C, para retirar 2' TBDMS (terc-butildimetilsililo).

El ARN del producto de reacción se separó y se purificó por HPLC LC918 (Industria analítica de Japón, Japón) equipado con columna de Daisogel C18 (Daiso, Japón), y se confirmó si o no el ARN purificado coincide con la secuencia de base diana mediante el espectrómetro de masas MALDI-TOF (Shimadzu, Japón). Entonces, con el fin de preparar cada estructura de oligo ARN bicatenario, la cadena de sentido y la cadena de antisentido en una cantidad equivalente se mezclaron entre sí y poner en tampón de hibridación 1X (HEPES 30 mM, acetato de potasio 100 mM, acetato de magnesio 2 mM (pH 7,0 a 7,5)), seguido de la reacción en un baño de agua de temperatura constante a 90 °C durante 3 minutos, y se hizo reaccionar de nuevo a 37 °C, preparando de este modo cada estructura de oligo ARN bicatenario que incluye ARNip que tiene secuencia de survivina como la cadena de sentido (en lo sucesivo, denominado SAMiRNA-survivina, respectivamente). Se confirmó mediante electroforesis que se hibridó la estructura de oligo ARN bicatenaria producida.

Ejemplo 5.3. Preparación de SAMiRNA incluyendo etilenglicol en el que se introduce el grupo de polihistidina, como monómero de material hidrófilo

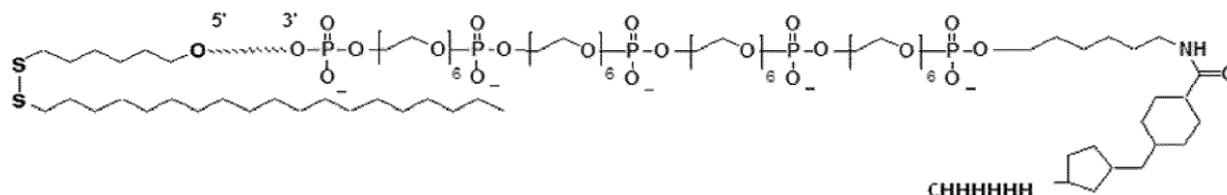
Se preparó una estructura de oligo ARN bicatenaria representada por la siguiente fórmula estructural (27) en la que se introduce péptido en el material hidrófilo.



Fórmula estructural (27)

En la fórmula estructural (27), H es histidina y C es cisteína.

La fórmula estructural (27) se representa específicamente mediante la siguiente fórmula estructural (28):



Fórmula estructural (28)

- 5 En las fórmulas estructurales (27) y (28), S es una cadena de sentido de ARNip; AS es una cadena de antisentido de ARNip; [Etilenglicol]₄ es un material hidrófilo; un enlazador es un enlace entre el péptido y SAMiRNA, péptido es un péptido que consiste en la secuencia de HHHHHHC; C₂₄ es un material hidrófobo y tetradocosano que incluyen un enlace disulfuro; y 5' y 3' significan directividades del extremo de oligo ARN bicatenario.
- 10 Además, el bloque de material hidrófilo se conecta a un grupo fosfato en el extremo 3' de la cadena de sentido de ARNip.

La cadena de sentido de ARNip en las fórmulas estructurales (27) y (28) se preparó mediante la conexión de un enlazador que tiene un grupo funcional (por ejemplo: NHSéster) unido a aminas y un grupo funcional (por ejemplo: maleimida) unido a tiol (-SH) de péptido con el oligo representado por las fórmulas estructurales (25) y (26) del ejemplo 5-2. Específicamente, el enlazador se une al oligo que tiene la estructura de fórmulas estructurales (25) y (26), y entonces se purificó mediante HPLC o resina. El péptido se unió al oligo purificado, y se purificó mediante HPLC, preparando de este modo la cadena de sentido de ARNip. Para una cadena de antisentido en la que la hibridación se realiza con la cadena de sentido, la cadena de antisentido que tiene una secuencia complementaria a la cadena de sentido se produjo mediante la reacción descrita anteriormente. El ARN del producto de reacción se separó y se purificó por HPLC LC918 (Industria analítica de Japón, Japón) equipado con columna Daisogel C18 (Daiso, Japón), y se confirmó si o no el ARN purificado coincide con la secuencia de base diana mediante el espectrómetro de masas MALDI-TOF (Shimadzu, Japón). Entonces, con el fin de preparar cada estructura de oligo ARN bicatenario, la cadena de sentido y la cadena de antisentido en una cantidad equivalente se mezclaron entre sí y se pusieron en tampón de hibridación 1X (HEPES 30 mM, acetato de potasio 100 mM, acetato de magnesio 2 mM (pH 7,0 a 7,5)), seguido de la reacción en un baño de agua de temperatura constante a 90 °C durante 3 minutos, y se hizo reaccionar de nuevo a 37 °C, preparando de este modo cada estructura de oligo ARN bicatenario que incluye ARNip que tiene secuencia de survivina como la cadena de sentido (en lo sucesivo, denominado SAMiRNA-Survivina, respectivamente). Se confirmó mediante electroforesis que se hibridó la estructura de oligo ARN bicatenario producida.

Ejemplo 6. Inhibición de expresión de gen diana en la línea celular HeLa por nanopartículas formadas de la estructura de polímero de oligo bicatenario (hexaetilenglicol-SAMiRNA)

35 Una línea celular de cáncer de cuello uterino (HeLa) se transformó mediante el uso de nanopartículas formadas de hexaetilenglicol-SAMiRNA que incluye secuencias de ARNip que pueden reducir la cantidad de expresión de Survivina, y el aspecto de expresión del gen diana se analizó en la línea celular de cáncer cervical transformada (HeLa) a nivel de ARN.

40 Ejemplo 6-1. Cultivo de línea celular de cáncer cervical humano

La línea celular humana de cáncer cervical humano (HeLa), obtenida de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) se cultivó en las mismas condiciones que en el ejemplo 5-1.

45 Ejemplo 6-2. Transfección de hexaetilenglicol-SAMiRNA en el que se introduce el grupo amino, en la línea celular de cáncer cervical humano.

0,8 × 10⁵ de línea celular de cáncer de cuello uterino (HeLa) cultivadas mediante el ejemplo 6-1 se cultivó en medio EMEM durante 18 horas en placa de 12 pocillos en condiciones de 37 °C y 5% (v/v) de CO₂, y se retiró el medio, y se dispensó la misma cantidad de medio Opti-MEM (GIBCO, EE.UU.) para cada pocillo. La mezcla obtenida se secó por congelación a condiciones de -75 °C y 5mTorr durante 48 horas mediante el mismo método que en el ejemplo 5-1, para producir nanopartículas uniformes. Se añadió hexaetilenglicol -SAMiRNA preparado mediante el ejemplo 3-2 y se disolvió en DPBS a una concentración de 50 µg/ml, y se trató en medio Opti-MEM (1 ml) según concentraciones de 50, 100 y 200 nM. Opti-MEM que incluye hexaetilenglicol-SAMiRNA se dispensó y se trató en cada pocillo de línea celular tumoral de acuerdo con la concentración, y el producto obtenido se cultivó en condiciones de 37 °C y 5% (v / v) de CO₂, durante un total de 24 horas y 48 horas.

Ejemplo 6-3. Análisis cuantitativo relativo de ARNm de gen diana

5 Se produjo ADNc mediante la extracción de ARN total de la línea de células transfectadas mediante el ejemplo 6-2 a través del mismo método que en el ejemplo 4-3, y una cantidad de expresión de ARNm del gen diana se sometió a cuantificación relativa mediante PCR en tiempo real. La cantidad de inhibición de la expresión de genes diana de acuerdo con el tratamiento del hexaetilenglicol-SAMiRNA en la que se introdujo el grupo amino, se observó para confirmar claramente la eficacia de hexaetilenglicol-SAMiRNA en el que se introdujo el grupo amino, en comparación con el grupo de control, hexaetilenglicol-SAMiRNA (figura 18).

10 **Efectos beneficiosos**

15 La estructura de oligonucleótidos según la presente invención puede tener todas de las mismas porciones de material hidrófilo, de manera que se puedan mejorar notablemente problemas tales como control de calidad, etc., causados por característica de polidispersidad que se produce cuando un material hidrófilo unido al oligonucleótido es un polímero sintético. Además, en comparación con el proceso de purificación existente que utiliza materiales hidrófilos de polidispersidad, el método para preparar la estructura de oligonucleótidos según la presente invención puede ser simple, puede reducir el costo de síntesis, y puede realizar fácilmente análisis de materiales de la estructura de oligonucleótidos. Además, el tamaño de nanopartículas puede regularse mediante el control del número de repetición de bloques de material hidrófilo y monómeros de material hidrófilo en cada bloque de material hidrófilo.

25 En particular, cuando el ligando está unido adicionalmente al receptor que promueve la internalización de célula diana a través de endocitosis mediada por receptor (RME) en la estructura de oligonucleótidos según la presente invención, la administración en la célula diana se realiza de manera más eficaz. Además, cuando el ligando es azúcar, junto con el efecto de orientación de las nanopartículas, la hidrofiliidad que se reduce dependiendo del número de repetición de los bloques de material hidrófilo, puede complementarse para mejorar la administración intracelular de los oligonucleótidos y para mejorar la eficacia para el control de la expresión del gen de oligonucleótido.

30 Además, después de la estructura de oligonucleótidos se absorbe en la célula, el oligonucleótido puede escaparse fácilmente desde el endosoma, y puede tener un efecto de inhibición de la descomposición por lisosoma, de manera que mayor efecto del tratamiento puede obtenerse mediante la introducción del grupo amino o los grupos polihistidina en el bloque de material hidrófilo.

REIVINDICACIONES

1. Estructura de oligonucleótidos que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula estructural (1) o fórmula estructural (2).



10 en la que A es un monómero de material hidrófilo, B es un material hidrófobo, J es un enlazador para la conexión entre m monómeros de material hidrófilo, o un enlazador para la conexión entre m monómeros de material hidrófilo con oligonucleótidos, X e Y son cada uno de manera independiente un enlace covalente simple o un enlace covalente mediado por enlazador, R es un oligonucleótido monocatenario o bicatenario, m es un número entero de 1 a 15, y n es un número entero de 1 a 10,

15 Q es (L_i-Z_j) o $P-J_1-J_2$,

L es un ligando unido de manera específica a un receptor que promueve la internalización de célula diana a través de endocitosis mediada por receptor (RME),

20 Z es un enlazador que media un enlace covalente o un enlace entre el monómero de material hidrófilo en un bloque de material hidrófilo y el ligando,

25 i representa un número entero de 0 a 5, preferiblemente, un número entero de 0 a 3, y j significa 0 o 1, siempre y cuando i sea 0, J es necesariamente 0,

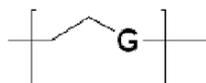
P significa un grupo amino o un grupo de polihistidina, y

30 J_1 y J_2 son enlazadores de manera independiente que median un enlace covalente simple, o un enlace entre el grupo amino o el grupo de polihistidina con el material hidrófilo.

2. Estructura de oligonucleótidos según la reivindicación 1, en la que R es un oligonucleótido bicatenario, y la cadena de sentido o la cadena de antisentido tiene de 19 a 31 nucleótidos, preferiblemente un grupo fosfato se une al extremo 5' de la cadena de antisentido de oligonucleótidos bicatenarios, preferiblemente el grupo fosfato unido al extremo 5' de la cadena de antisentido es de uno a tres.

3. Estructura de oligonucleótidos según la reivindicación 1, en la que el material hidrófobo tiene un peso molecular de 250 a 1.000, preferiblemente el material hidrófobo es uno seleccionado del grupo que consiste en un derivado de esteroide, un derivado de glicérido, éter de glicerol, glicol de polipropileno, hidrocarburo insaturado o saturado de C_{12} a C_{50} , diacilfosfatidilcolina, ácido graso, fosfolípido y lipopoliamina, preferiblemente el derivado de esteroide se selecciona del grupo que consiste en colesterol, colestanol, ácido cólico, formiato de colesteroilo, formiato de colestanoilo, y amina de colesteroilo, preferiblemente el derivado de glicérido se selecciona del grupo que consiste en mono-, di- y triglicérido.

4. Estructura de oligonucleótidos según la reivindicación 1, en la que el monómero de material hidrófilo tiene una estructura representada por el siguiente compuesto (1):



Compuesto (1),

50 en la que G se selecciona del grupo que consiste en CH_2 , O, S y NH.

5. Estructura de oligonucleótidos según la reivindicación 1, en la que el enlazador (J) se selecciona del grupo que consiste en PO_3^- , SO_3 y CO_2 .

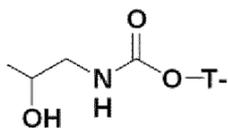
6. Estructura de oligonucleótidos según la reivindicación 1, en la que X, Y y Z son un enlace no degradable o un enlace degradable respectivamente, preferiblemente el enlace no degradable es un enlace amida o un enlace de fosforilación, preferiblemente el enlace degradable es un enlace de disulfuro, un enlace de ácido degradable, un enlace éster, un enlace anhídrido, un enlace biodegradable o un enlace enzimáticamente degradable.

7. Estructura de oligonucleótidos según la reivindicación 1, en la que Q es (L_i-Z_j) , Z es un enlazador que media

un enlace entre el monómero de material hidrófilo en un bloque de material hidrófilo y el ligando, y el enlazador Z comprende hexaetilenglicol.

8. Estructura de oligonucleótidos según la reivindicación 7, en la que el enlazador Z es el compuesto (4):

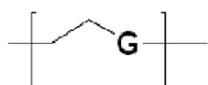
5



Compuesto (4),

en la que T se refiere a de 1 a 15 unidades de compuesto (1) repetitivo representado a continuación, y G se selecciona del grupo que consiste en CH₂, O, S y NH.

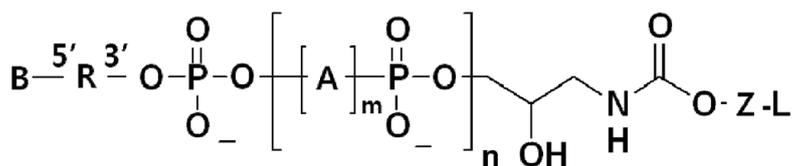
10



Compuesto (1)

9. Estructura de oligonucleótidos según la reivindicación 1, en la que Q es (L_i-Z_j), y tiene una estructura representada por la fórmula estructural (19) a continuación:

15



Fórmula estructural (19),

en la que A, B, R, m, n, Z y L son las mismas tal como se define en la fórmula estructural (2) de la reivindicación 1.

20

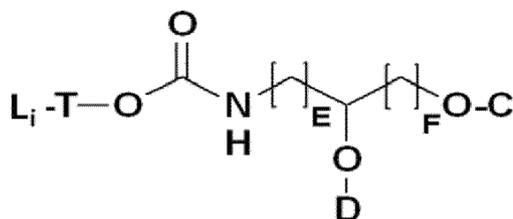
10. Estructura de oligonucleótidos según la reivindicación 1, en la que Q es (L_i-Z_j), y el ligando (L) se selecciona del grupo que consiste en carbohidrato, péptido y anticuerpo, preferiblemente carbohidrato se selecciona del grupo que consiste en hexoamina, monosacárido, disacárido y polisacárido.

25

11. Estructura de oligonucleótidos según la reivindicación 1, en la que Q es P-J₁-J₂, y P es uno seleccionado del grupo que consiste en grupos amino primario a terciario o grupos de polihistidina que comprende de 5 a 8 histidinas, preferiblemente J₁ y J₂ se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en un enlace covalente simple, alquilo de C₂₋₁₂, alqueno, alquino, PO₃⁻, SO₃ y CO₂.

30

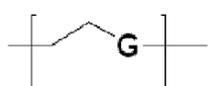
12. Soporte sólido representado mediante la fórmula estructural (20) a continuación:



Fórmula estructural (20),

en la que L es un ligando unido de manera específica al receptor que promueve la internalización de célula diana a través de endocitosis mediada por receptor (RME), T es un compuesto en el que el compuesto (1) se repite de 1 a 15 veces (G se selecciona del grupo que consiste en CH₂, O, S y NH en el compuesto (1)),

35

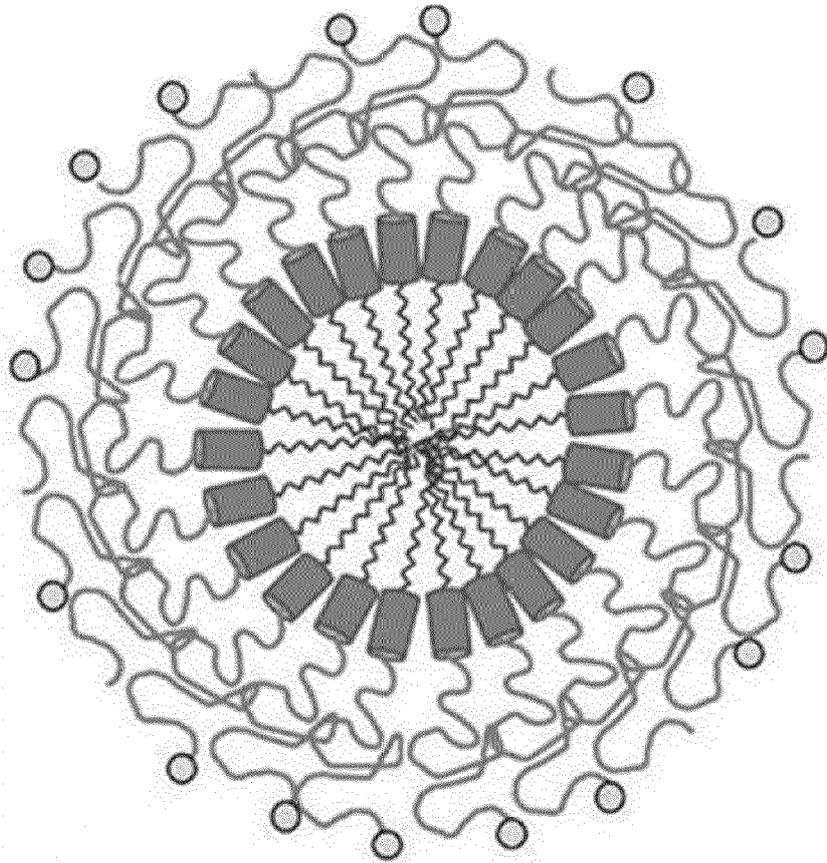


Compuesto (1),

uno de C y D se refiere a soporte sólido, otro de C y D se refiere a dimetoxitritilo, i es un número entero de 0 a 3, y E y F son de manera independiente de 1 a 10.

- 5 13. Método de preparación de estructura de oligonucleótidos monocatenaria o bicatenaria según la reivindicación 1 usando un soporte sólido según la reivindicación 12.
14. Método según la reivindicación 13, que comprende:
- 10 (1) unir de manera covalente un bloque de material hidrófilo al soporte sólido representado por la fórmula estructural (20) n-veces de manera repetida;
- (2) sintetizar un oligonucleótido monocatenario basado en el soporte sólido al que se une el bloque de material hidrófilo;
- 15 (3) unir de manera covalente un material hidrófobo al extremo 5' de oligonucleótido al que se une el bloque de material hidrófilo; y
- (4) separar la estructura de oligonucleótidos del soporte sólido, o que comprende:
- 20 (1) unir de manera covalente un bloque de material hidrófilo al soporte sólido representado por la fórmula estructural (20) n-veces de manera repetida;
- (2) sintetizar un ARN monocatenario basado en el soporte sólido al que se une el bloque de material hidrófilo;
- 25 (3) unir de manera covalente un material hidrófobo al extremo 5' de ARN al que se une el bloque de material hidrófilo;
- (4) separar la estructura de polímero de ARN y un ARN monocatenario que tiene una secuencia complementaria a la misma del soporte sólido; y
- 30 (5) formar el oligonucleótido bicatenario mediante hibridación de la estructura de polímero de ARN y el ARN monocatenario que tiene una secuencia complementaria a la misma, preferiblemente el oligonucleótido monocatenario complementario al oligonucleótido monocatenario de la etapa (2) tiene un grupo fosfato, unido al extremo 5' del oligonucleótido monocatenario.
- 35 15. Nanopartícula(s) que comprende(n) la estructura de oligonucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, preferiblemente la(s) nanopartícula(s) está(n) liofilizada(s).
- 40 16. Composición farmacéutica que comprende la estructura de oligonucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o la(s) nanopartícula(s) según la reivindicación 15.
17. Estructura de oligonucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en el control de una expresión de un gen *in vitro* o *in vivo*.
- 45 18. Nanopartícula(s) según la reivindicación 15 para su uso en el control de una expresión de un gen *in vitro* o *in vivo*.
- 50

Fig. 1



; Estructura de oligonucleótido

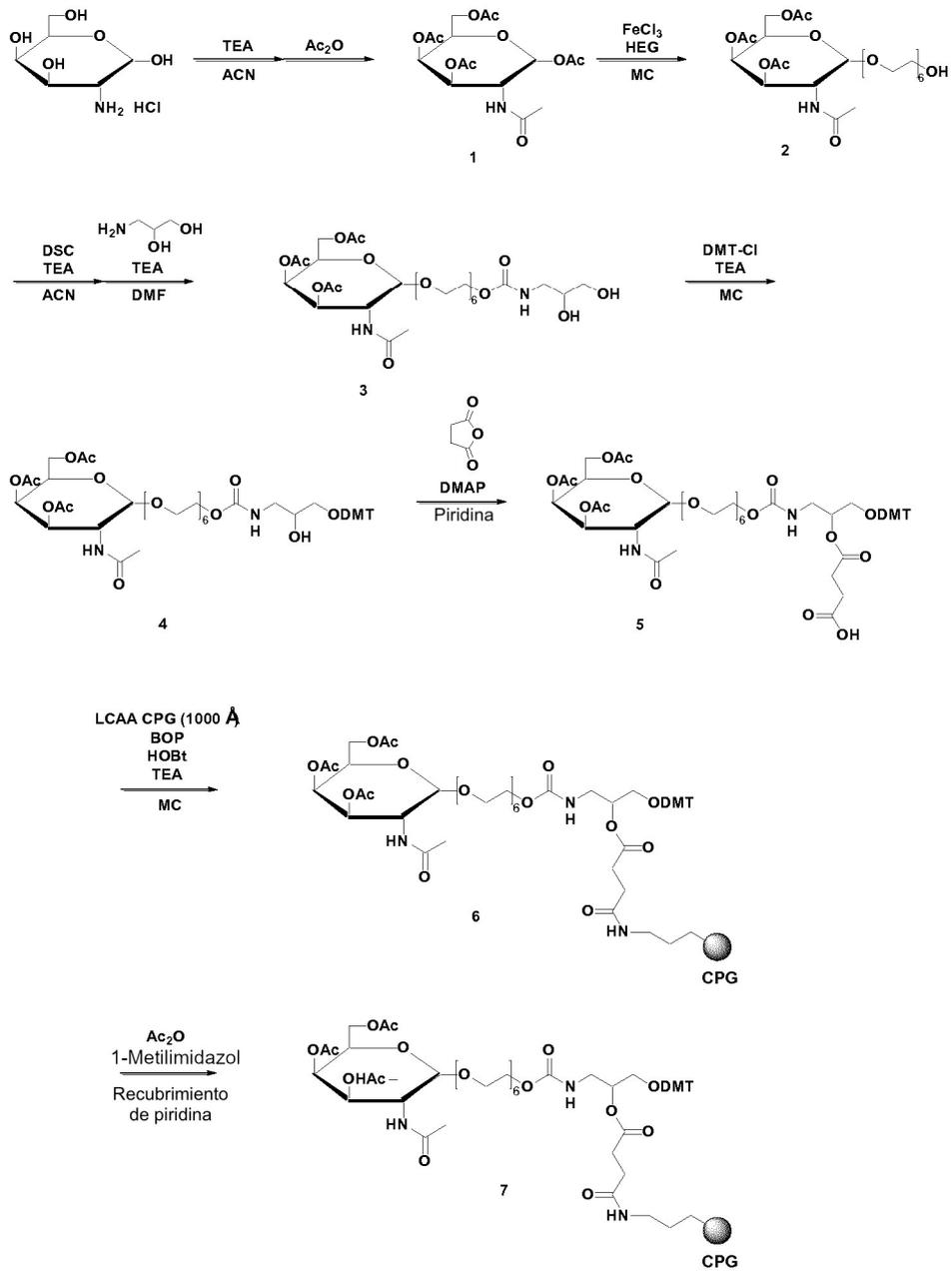
; Material hidrófobo

; Oligonucleótido

; Material hidrófilo

; Ligando orientado a diana

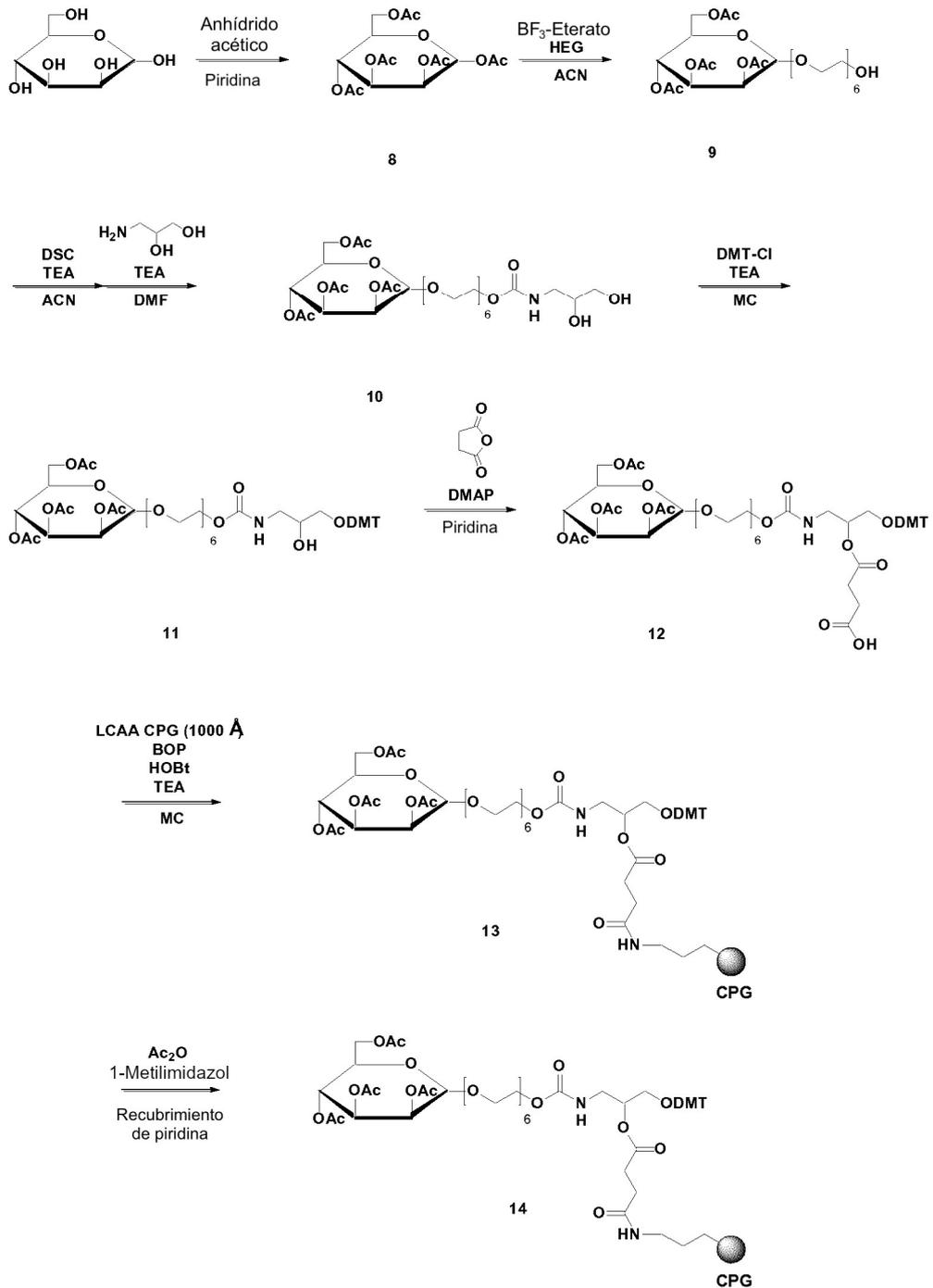
Fig. 2



HEG = Hexaetilenglicol

DSC = Carbonato de N,N'-disuccinimido

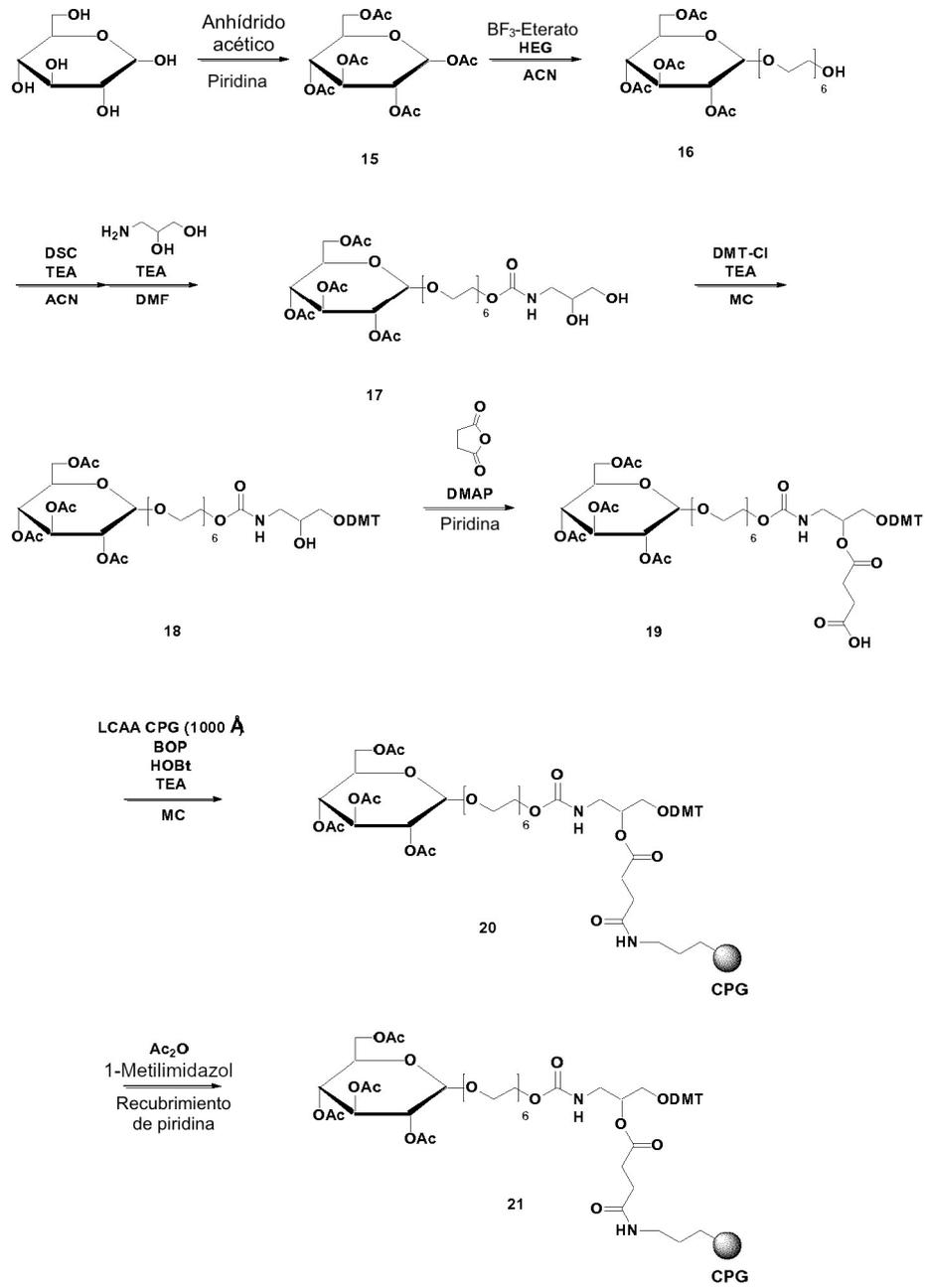
Fig. 3



HEG = Hexaetilenglicol

DSC = Carbonato de N,N'-disuccinimidilo

Fig. 4



HEG = Hexaetilenglicol

DSC = Carbonato de N,N'-disuccinimidilo

Fig. 5

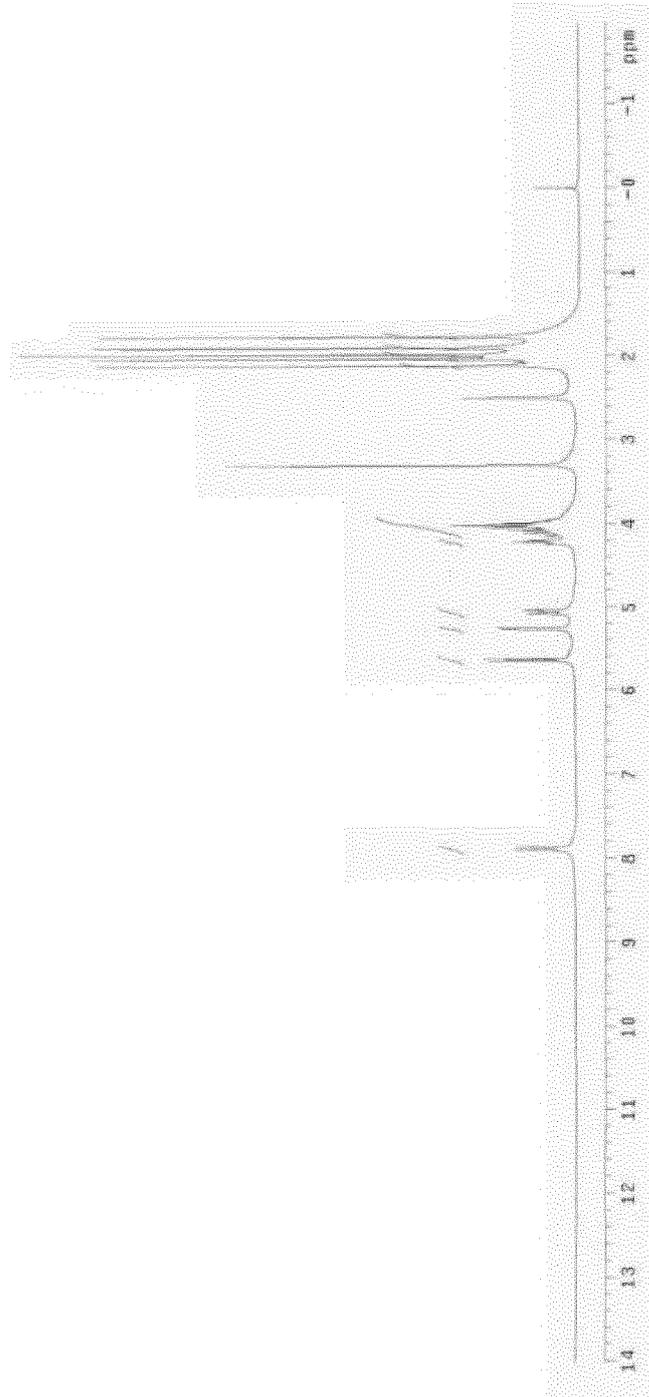
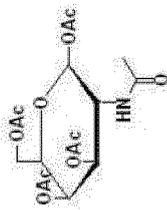


Fig. 6



Fig. 7

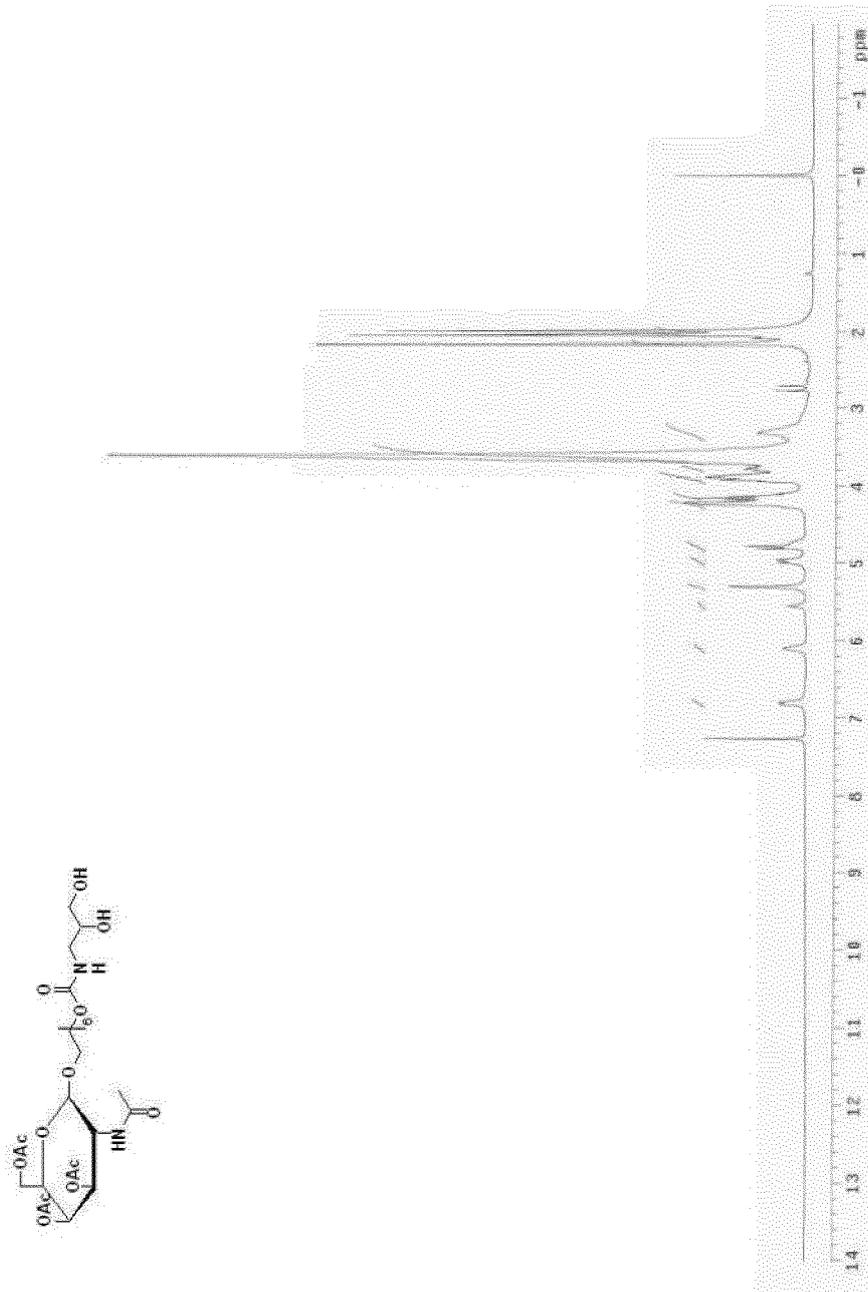


Fig. 8

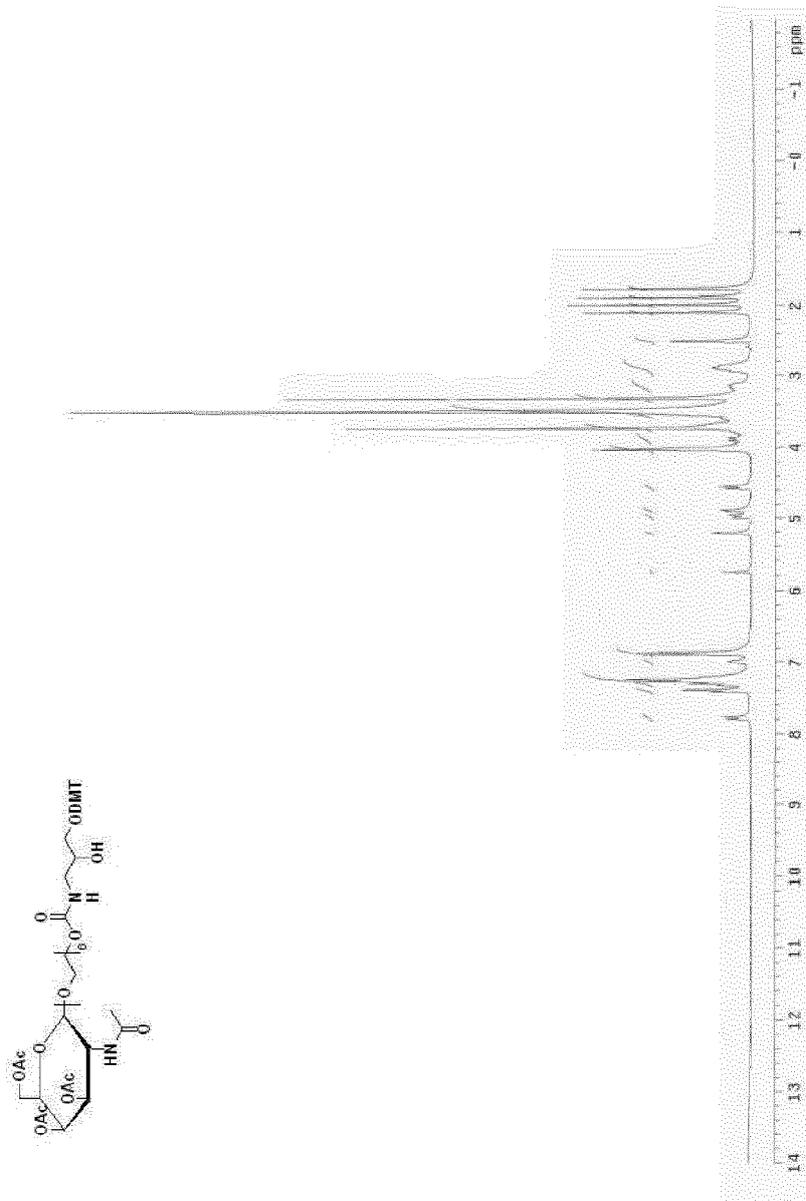


Fig. 9

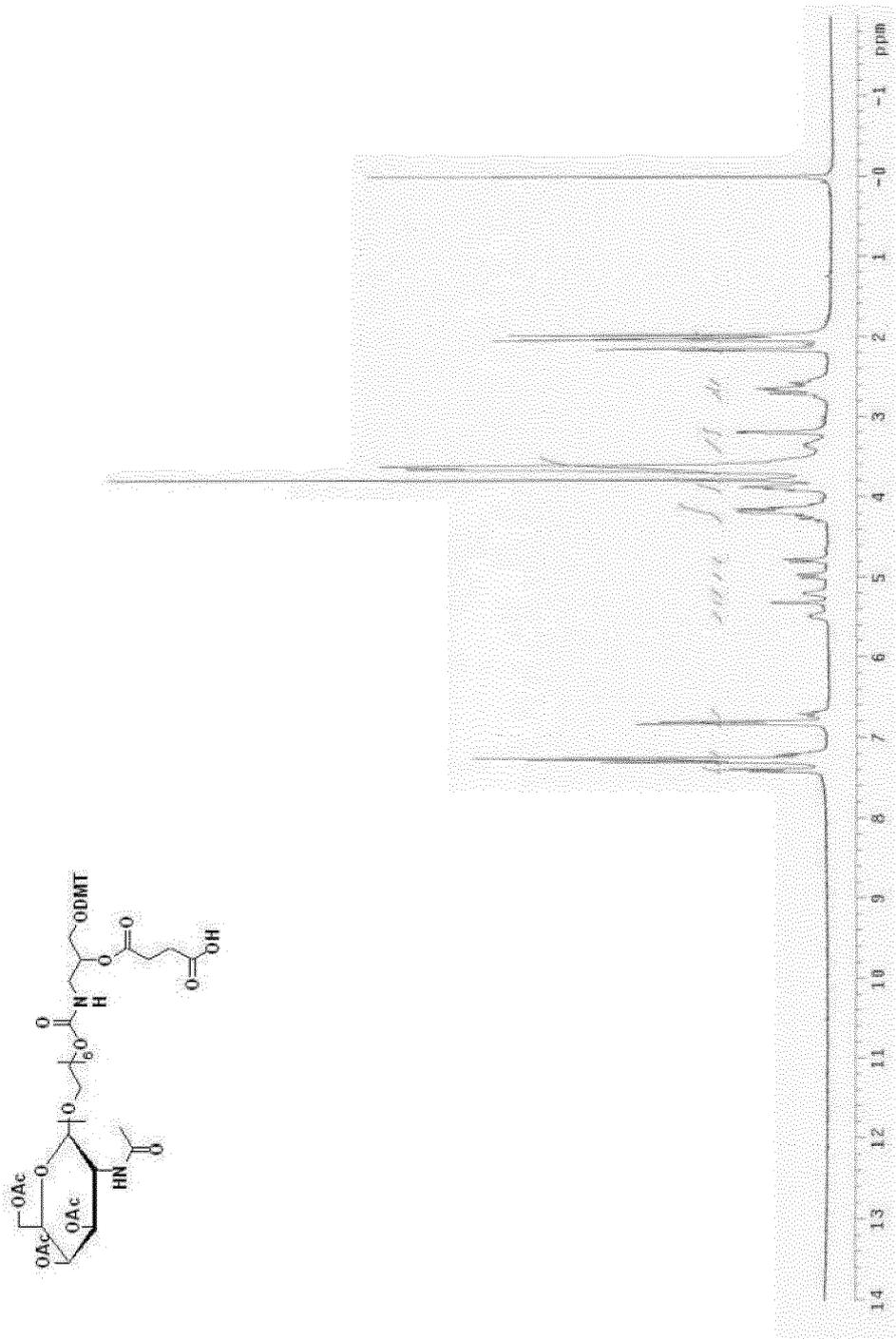
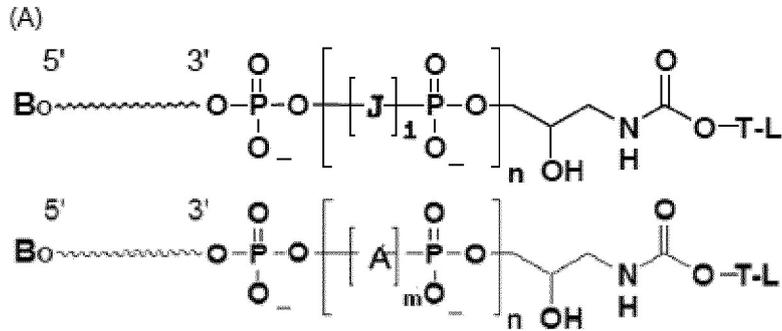
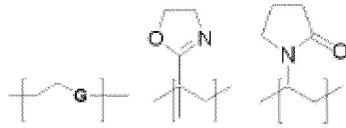


Fig. 10



J o T se selecciona respectivamente del grupo que consiste en



(G se selecciona del grupo que consiste en C, O, S y NH); i representa número repetitivo de J (0 a 10); n representa un número repetitivo de monómero de material hidrófilo (0 a 10); L es un ligando; ~~~~~ es oligonucleótido; B es material hidrófobo, preferiblemente tiene una estructura representada a continuación.

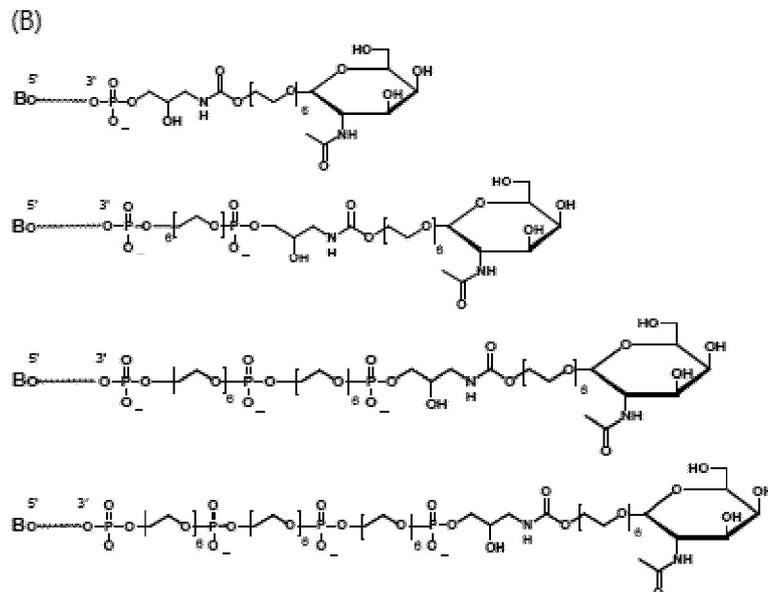
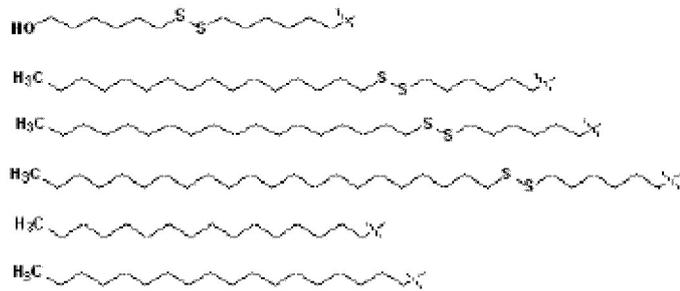


Fig. 12

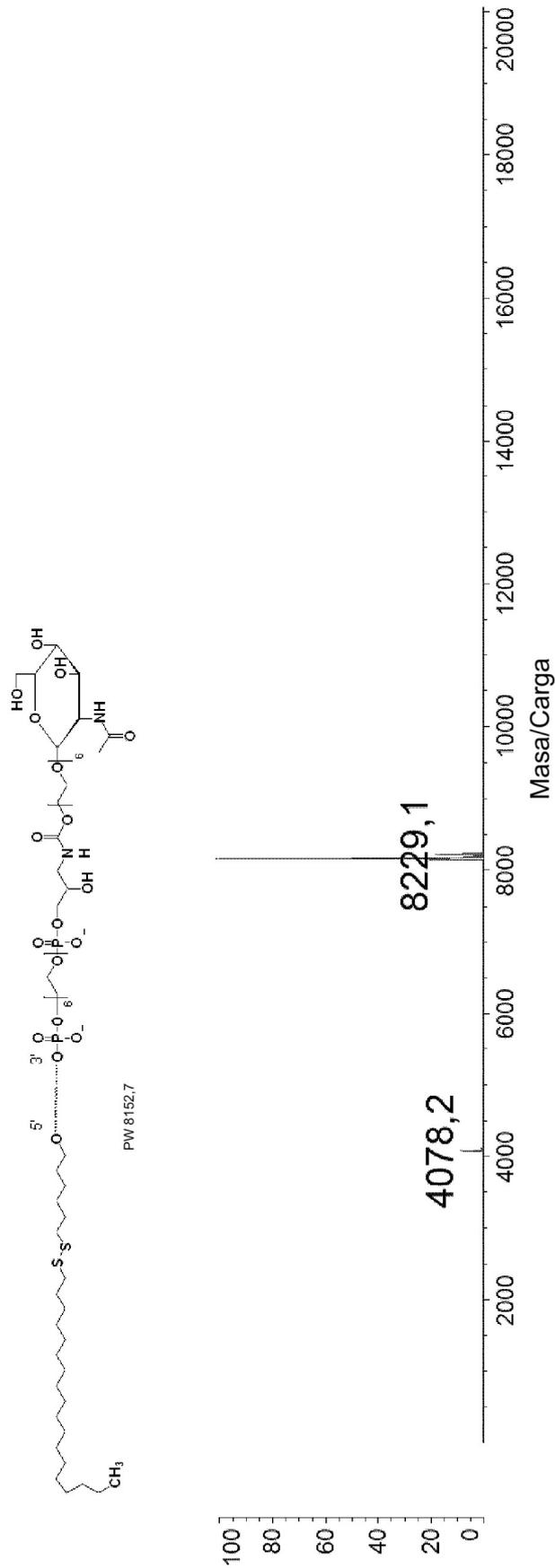


Fig. 15

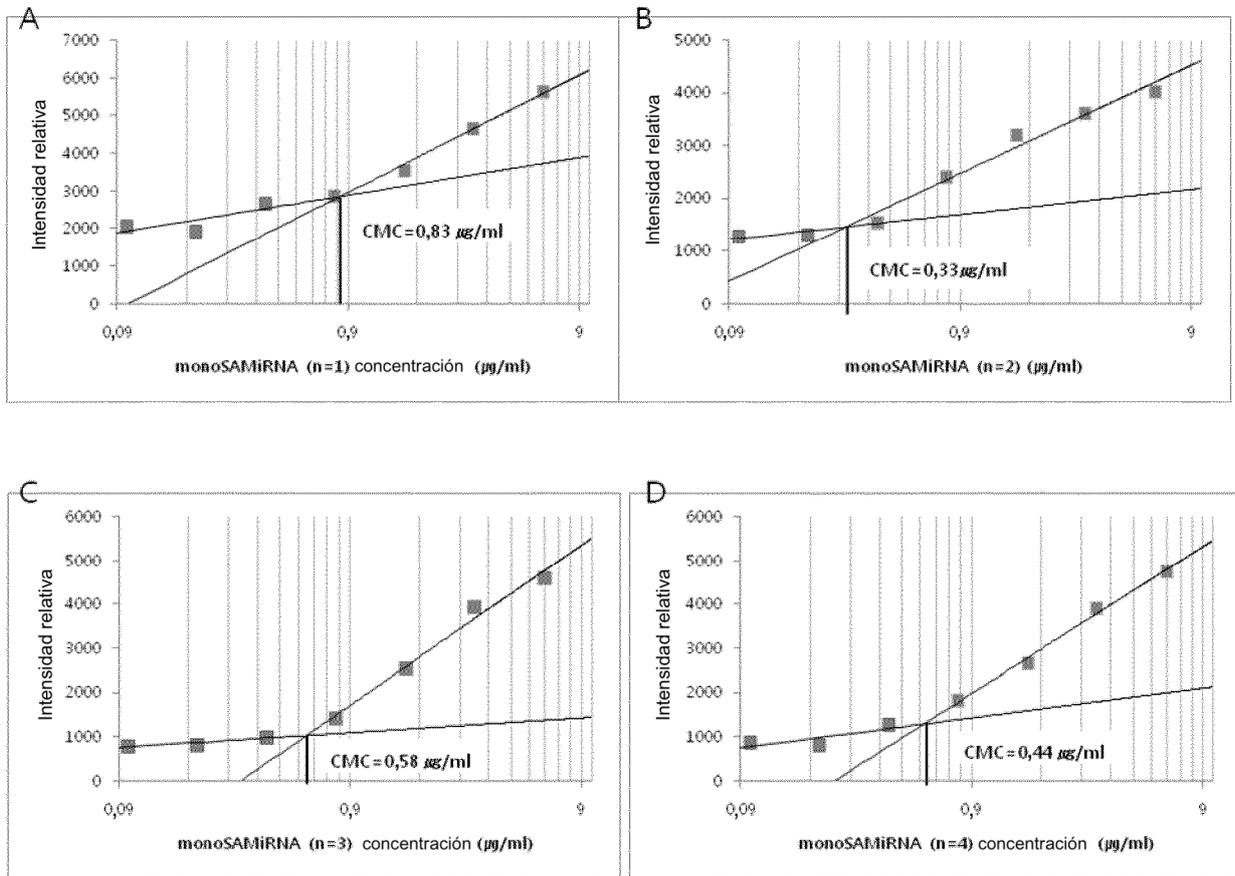


Fig. 16

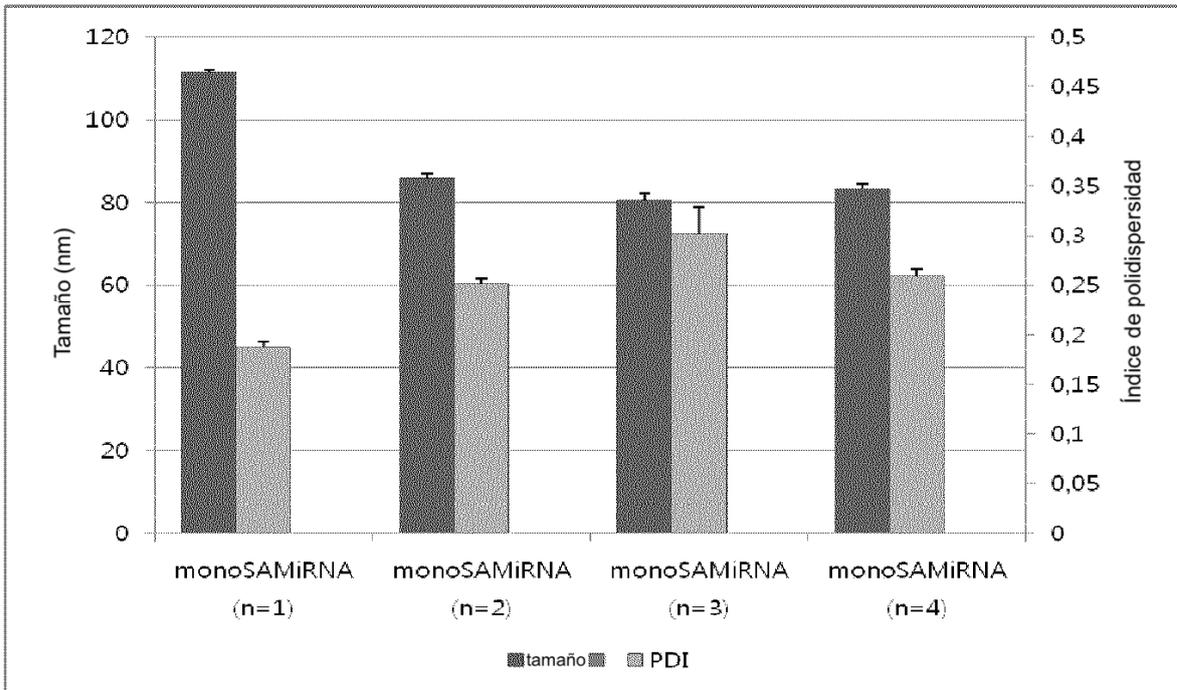


Fig. 17

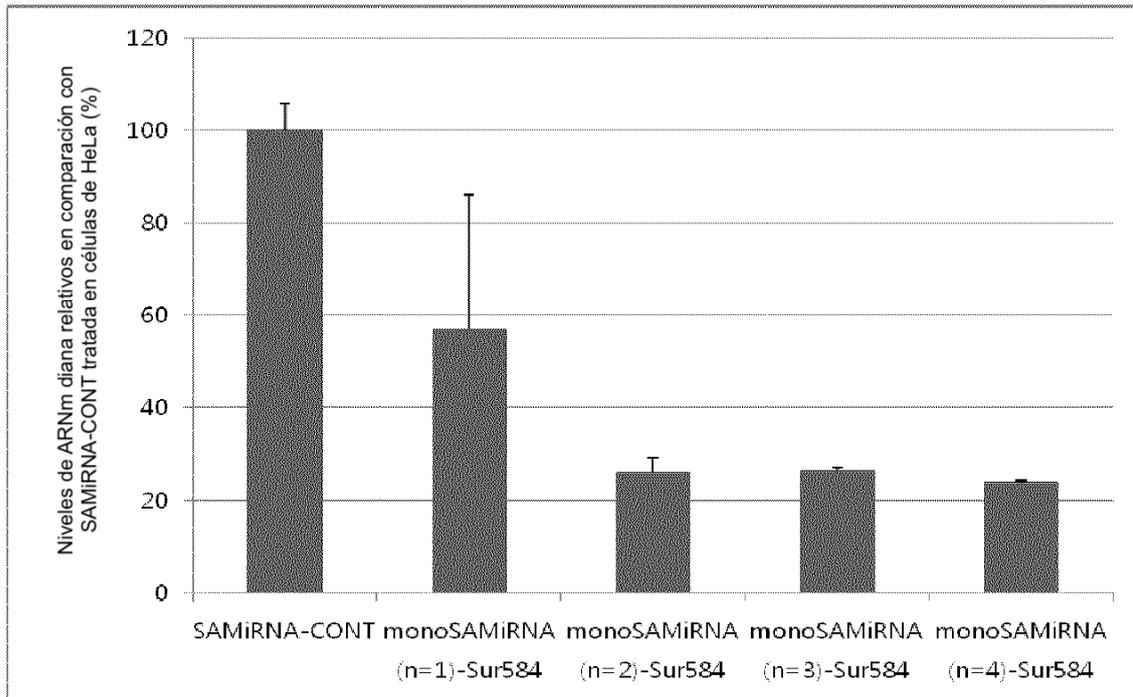


Fig. 18

