

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a ARNip que tiene una acción de interferencia de ARN y/o una acción de supresión de la expresión génica en ARNm que codifica para el receptor de transferrina 2 (TfR2), uso del ARNip, un método para suprimir la expresión génica de TfR2 usando el ARNip, un fármaco médico que comprende el ARNip y similares.

ANTECEDENTES

El ARNip contra el ARNm que codifica para una proteína TfR2 puede suprimir la expresión de ARNm de TfR2 y suprimir la producción de hepcidina que desempeña un papel clave en el metabolismo del hierro. Como resultado, el metabolismo del hierro en un organismo vivo puede activarse para promover la biodisponibilidad del hierro en las células precursoras eritroides, lo que permite el tratamiento de la anemia. Se está estudiando el uso de ARNip para suprimir la expresión de ARNm de TfR2, con la diana de suprimir la producción de hepcidina.

La hepcidina es una hormona peptídica que consta de 25 aminoácidos y se produce principalmente en el hígado y se secreta en la sangre. La hepcidina juega un papel clave en el metabolismo del hierro en los organismos vivos. Se conoce que la hepcidina suprime la absorción de hierro del tracto intestinal y la liberación de hierro de los macrófagos al unirse al transportador de hierro Ferroportina (SLC40A1) y promover la proteólisis de Ferroportina, y por lo tanto controla negativamente el metabolismo del hierro. Se ha informado que un aumento en la concentración de hepcidina en la sangre limita la biodisponibilidad de hierro en las células precursoras eritroides al suprimir el metabolismo del hierro y, por lo tanto, contribuye a diversas enfermedades anémicas (Literatura No de Patente 1).

Los ejemplos de enfermedades anémicas en las que hay un aumento de hepcidina en la sangre incluyen anemia asociada con enfermedad renal crónica, anemia asociada con cáncer, anemia inducida por quimioterapia, anemia por deficiencia de hierro resistente al hierro (IRIDA), anemia asociada con inflamación crónica (anemia de enfermedad crónica (ACD)) tal como reumatismo articular o enfermedad de Castleman, anemia de Diamond-Blackfan, anemia aplásica, β talasemia, enfermedad de células falciformes, hemoglobinuria paroxística nocturna, anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia asociada con síndrome

mielodisplásico, leucemia mielomonocítica crónica y anemia asociada con mielofibrosis. En pacientes con mielofibrosis, la concentración de hepcidina en la sangre puede aumentar en correlación con la carga de hierro asociada con la transfusión de eritrocitos y un aumento crónico de citocinas inflamatorias (Literatura No de Patente 2). Sin embargo, en el caso de la anemia que está provocada principalmente por una capacidad insuficiente para producir eritrocitos por sí misma debido a la disfunción hematopoyética en la médula ósea, tal como mielofibrosis, la contribución de la utilización defectuosa de hierro asociada con un aumento en la hepcidina en la sangre a una condición patológica puede ser baja, y hasta ahora no se ha informado un efecto terapéutico de la supresión de la producción de hepcidina en la anemia. En la actualidad, se pueden usar medicamentos tal como ESA (agente estimulante de la eritropoyesis) para tratar la anemia asociada con la disfunción de la médula ósea, como la mielofibrosis, pero tienen un efecto limitado.

La Literatura de Patente 1 describe que la administración de AD-52590 como ARNip de TfR2 a un mono dio por resultado una disminución en la expresión de ARNm de TfR2 en el hígado, una disminución en la expresión de ARNm de hepcidina, una disminución en la concentración de hepcidina en la sangre y un aumento en la concentración de hierro en la sangre. La Literatura de Patente 1 también describe que la administración de AD-47882 a una rata que tiene una condición patológica de anemia asociada con inflamación dio como resultado una disminución en la expresión de ARNm de TfR2 en el hígado, una disminución en la concentración de hepcidina en la sangre, un aumento en la concentración de hierro en la sangre y un aumento en los niveles de hemoglobina. Sin embargo, la Literatura de Patente 1 muestra los resultados de administrar ARNip encapsulado en nanopartículas lipídicas (LNP). La vía de administración se limita a una vía intravenosa. El efecto terapéutico del ARNip de TfR2 descrito en la Literatura de Patente 1 se limita a un efecto terapéutico sobre la anemia asociada con la inflamación. No se describen los efectos terapéuticos sobre otras anemias, tal como la anemia asociada con la pérdida de la función de la médula ósea.

Los métodos para inhibir la expresión de un gen diana en células, tejidos o individuos incluyen métodos en los que se introduce ARN de doble hebra en las células, tejidos o individuos. La introducción de ARN de doble hebra degrada el ARNm homólogo a la secuencia del ARN de doble hebra e inhibe la expresión de un gen diana. Este efecto se denomina "interferencia de ARN" o "iARN". Se ha informado que el ARN de doble hebra que tiene un saliente con dos nucleótidos en el extremo 3', y una hebra homosenrido y una hebra antisenido, cada una con 21 nucleótidos (ARN de interferencia pequeño: ARNip), tiene una acción de interferencia de ARN en células cultivadas de un vertebrado (ver, por ejemplo, la

Literatura No Relacionada con Patentes 3).

El ARNip es útil para la identificación de una función génica, el cribado de una cepa celular adecuada para la producción de una sustancia útil, el control de un gen implicado en una enfermedad y similares, pero se degrada fácilmente por una ribonucleasa y, por lo tanto, tiene las desventajas de que es difícil mantener la actividad en el cuerpo y el costo de la síntesis es alto. Por esta razón, se han intentado varias modificaciones químicas para el desarrollo de un oligonucleótido que tiene una alta estabilidad contra una ribonucleasa, se puede producir a bajo costo y conserva la actividad de ARNi.

Se sabe que un enlace fosforotioato (PS) obtenido mediante el reemplazo de un átomo de oxígeno no puente de un grupo fosfato de un enlace fosfodiéster en un oligonucleótido por un átomo de azufre tiene resistencia a una nucleasa. Sin embargo, se ha informado que no se prefiere un mayor número de enlaces PS en un oligonucleótido porque el ARN de doble hebra se desestabiliza termodinámicamente y se une de forma no específica a la proteína (ver, por ejemplo, Literatura No de Patente 4).

Además, el ARNip que tiene, como nucleósidos, nucleósidos modificados con azúcar tal como ADN, 2'-O-metilnucleósidos, 2'-desoxi-2'fluoronucleósidos o nucleósidos puenteados con 2'-O,4'-C se describe, por ejemplo, en las Literaturas de Patente 2, 3 y 4.

También se han hecho intentos para obtener ARNip estable reemplazando ARN natural con ARN modificado. Por ejemplo, se han informado muchos derivados en los que el grupo 2'-OH del ARN se alquila para obtener un 2'-O-alquilnucleósido que no forma un sustrato para la RNasa. El 2'-O-metilnucleótido, que es un nucleótido modificado de origen natural que también se encuentra en el ARNt, se ha estudiado desde los primeros días de los estudios antisentido (ver, por ejemplo, Literatura No de Patente 5).

Se ha informado que el reemplazo de todos los ARN de una o ambas de la hebra homosentido y la hebra antisentido de ARNip por un 2'-O-metilnucleótido reduce o elimina completamente la actividad de iARN (ver, por ejemplo, las Literaturas No de Patente 6, 7, 8 y 9). Se ha informado que la introducción de tres 2'-O-metilnucleótidos en una fila no disminuye la actividad en el caso de la introducción en la hebra homosentido, pero disminuye la actividad en el caso de la introducción en la hebra antisentido, y particularmente disminuye significativamente la actividad en el caso de la introducción en el extremo 5' de la hebra homosentido (ver, por ejemplo, la Literatura No de Patente 10).

Un oligonucleótido con 2'-desoxi-2'-fluoronucleótido (ARN 2'-F o 2'-F), que es un ARN modificado sintetizado artificialmente, forma preferentemente la misma conformación N que un ribonucleótido y tiene mayor afinidad por el ARN, pero cuando el oligonucleótido tiene un enlace fosfodiéster, no tiene resistencia a la nucleasa y, por lo tanto, se requiere el reemplazo con un enlace fosforotioato para impartir resistencia a la nucleasa (ver, por ejemplo, la Literatura No de Patente 11).

ENA (ácido nucleico con puente de 2'-O,4'-C-etileno) es un ácido nucleico modificado que tiene estabilidad contra una nucleasa, pero se ha informado que la introducción de ENA en los dos nucleótidos de un sitio saliente en el extremo 3' de una o ambas de la hebra homosen- tido y la hebra antisentido de ARNip disminuye la actividad de iARN (ver, por ejemplo, la Literatura No de Patente 12).

Ha habido muchos informes sobre ARNip en los que se combinan una pluralidad de ácidos nucleicos modificados. Por ejemplo, se ha informado que un 2'-O-metilnucleótido y 2'-F se introducen en cualquier otra hebra homosen- tido y hebra antisentido de ARNip, y se puede obtener actividad de iARN equivalente o mayor que la de ARNip no modificado, y se puede mantener de forma relativamente estable en el suero (ver, por ejemplo, Literatura No de Patente 13).

Se han informado oligonucleótidos de doble hebra en los que se combinan ADN, 2'-O-metil ARN y 2'-F, en particular, ARNip en el que el 14° residuo del extremo 5'en la hebra antisentido es 2'-F (ver, por ejemplo, las Literaturas de Patente 5 y 6). Se han informado oligonucleótidos de doble hebra en los que se combinan ADN, ARN 2'-O-metilo, ARN 2'-F y LNA (ácido nucleico con puente de 2'-O,4'-C-metileno), en particular, la actividad de ARNip en el que el 2° o 14° residuo del extremo 5'en la hebra antisentido es 2'-F, ADN o LNA (ver, por ejemplo, las Literaturas de Patentes 5 y 7).

LISTA DE CITAS

Literaturas de patente

Literatura de patente 1: Publicación de Patente Internacional Num. WO 2012/177921

Literatura de patente 2: Patente de Estados Unidos Núm. 9,399,775

Literatura de patente 3: Patente de Estados Unidos Núm. 9,796,974

Literatura de patente 4: Patente de Estados Unidos Núm. 10,612,024

Literatura de patente 5: Publicación de Patente Internacional Num. WO 2012/058210

Literatura de patente 6: Publicación de Patente Internacional Núm. WO 2013/074974, Patente de Estados Unidos Núm. 9,399,775, y Patente de Estados Unidos Núm. 9,796,974

5 Literatura de patente 7: Publicación de Patente Internacional Núm. WO 2016/028649, y Patente de Estados Unidos Num. 10,612,024

Literaturas no relacionada con patente

Literatura no relacionada con patente 1: Productos farmacéuticos 2019, 12, 170

Literatura no relacionada con patente 2: Am. J. Hematol. 88:312-316, 2013.

Literatura no relacionada con patente 3: Nature, 2001, Vol. 411, p. 494-498

10 Literatura no relacionada con patente 4: Antisense Nucleic Acid Drug Development, 2000, Vol. 10, p. 117-121

Literatura no relacionada con patente 5: Nucleic Acids Research, 1987, Vol. 15, p.6131-6148

Literatura no relacionada con patente 6: EMBO Journal, 2001, Vol. 20, p. 6877-6888

15 Literatura no relacionada con patente 7: RNA, Vol. 9, 2003, p. 1034-1048

Literatura no relacionada con patente 8: Biochemistry, 2003, Vol. 42, p. 7967-7975

Literatura no relacionada con patente 9: Nucleic Acids Research, 2003, Vol. 31, p. 2705-2716

20 Literatura no relacionada con patente 10: Journal of Medical Chemistry, 2005, Vol. 48, p. 4247-4253

Literatura no relacionada con patente 11: Journal of Medical Chemistry, 1993, Vol. 36, p. 831-841

Literatura no relacionada con patente 12: Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 2002, vol. 12, págs. 301-309

25 Literatura no relacionada con patente 13: Journal of Medicinal Chemistry., 2005, Vol.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Problema técnico

5 Se desea ARNip de TfR2 con alta actividad farmacológica, que sea capaz de prevenir, mejorar y/o tratar la anemia. Se desea que el ARNip de TfR2 tenga baja toxicidad para las células y excelentes propiedades de estabilidad y administración de fármacos en la sangre.

10 Cuando hay un aumento en la hepcidina en la anemia asociada con la inflamación crónica, se puede obtener un efecto terapéutico al suprimir la producción de hepcidina en la sangre, y la anemia es provocada principalmente por la utilización defectuosa de hierro debido a un aumento en la hepcidina en lugar de la producción anormal de eritrocitos. Sin embargo, para la anemia asociada con la disfunción de la médula ósea, tal como la mielofibrosis, la causa a menudo es una disminución en la producción de eritrocitos y, por lo tanto, incluso cuando hay un aumento en la hepcidina, no se puede esperar que se pueda obtener un efecto terapéutico suprimiendo la producción de hepcidina, y no hay ningún informe que lo indique.

15 Por lo tanto, en particular, se desea un nuevo fármaco efectivo para tratar la anemia asociada con la disfunción de la médula ósea, tal como la mielofibrosis. Los estudios de los presentes inventores han demostrado que la secuencia diana del ARNip de TfR2 en la Literatura de Patente 1 tiene citotoxicidad específica de secuencia y, por lo tanto, existe una preocupación de seguridad en el ARNip de la técnica convencional.

20 Un objeto de la presente invención es proporcionar un ARNip nuevo que tiene una acción de interferencia de ARN y/o una acción de supresión de la expresión génica en el ARNm que codifica para TfR2 (estas acciones a veces se denominan acción de inactivación). Otro objeto de la presente invención es proporcionar ARNip de TfR2 nuevo que tiene propiedades mejoradas de citotoxicidad, estabilidad y/o administración de fármacos. Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar una nueva composición farmacéutica

25 para tratar o prevenir una enfermedad que se puede tratar o prevenir mediante la supresión de la expresión del ARNm de TfR2.

Solución al problema

30 Los presentes inventores han realizado estudios diligentes y descubrieron que el ARNip de TfR2 cuya secuencia diana es una secuencia de nucleótidos en una posición específica en el ARNm de TfR2 tiene una acción de interferencia de ARN y/o una acción de

supresión de la expresión génica, y la secuencia diana en la presente invención no tiene citotoxicidad para las células que se observa en la secuencia diana en la Literatura de Patente 1. Además, los presentes inventores han descubierto que el ARNip que tiene un oligonucleótido en el que el ADN, ARN, 2'-O-metil ARN, ARN 2'-F, LNA, ENA y 3'-O-metil ARN se combinan adecuadamente tiene una acción de interferencia de ARN y/o una acción de supresión de la expresión génica, y es estable en un organismo vivo. Además, los presentes inventores han descubierto que las propiedades de administración de fármacos se mejoran mediante la adición de una unidad para administración tal como GalNAc a ARNip. Además, los presentes inventores han descubierto que al suprimir la expresión del ARNm de TfR2 usando ARNip de TfR2, los síntomas anémicos mejoran no solo en un modelo en ratón de anemia asociada con inflamación, sino también en un modelo en ratón de anemia asociada con pérdida de la función de la médula ósea. De esta manera, se ha completado la presente invención.

Es decir, la presente invención proporciona lo siguiente:

[1] Un oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la siguiente región de hebra antisentido (A) y región de hebra homosenrido (B), y que tiene una acción de inactivación en el ARNm del receptor de transferrina 2:

(A) una región de hebra antisentido que tiene una longitud de 18 a 31 bases y consiste en una secuencia coincidente con la diana sustancialmente complementaria a una secuencia diana que consiste en 18 a 21 bases consecutivas en una región entre las posiciones de nucleótidos 2845 y 2867 o una región entre las posiciones de nucleótidos 1534 y 1556 en la SEQ ID NO: 1, en el que un nucleósido en el extremo 5' de la secuencia de emparejamiento diana es un nucleósido sustancialmente complementario a un nucleósido en el extremo 3' de la secuencia diana, un nucleósido que tiene adenina o un nucleósido que tiene uracilo, y una estructura saliente de 5 o menos bases puede estar presente en el extremo 5' y/o el extremo 3' de la secuencia de emparejamiento diana; y

(B) una región de hebra homosenrido que tiene de 18 a 31 bases de longitud y contiene una secuencia de nucleótidos sustancialmente complementaria a la secuencia coincidente con la diana de la región de hebra antisentido, en la que una estructura saliente de 5 o menos bases está opcionalmente presente en el extremo 5'y/o el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos.

[2] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de de acuerdo

con [1], en donde la secuencia diana es una secuencia de nucleótidos que consiste en 19 bases de las posiciones de nucleótidos 2847 a 2865 o de las posiciones de nucleótidos 1536 a 1554 en SEQ ID NO: 1.

5 [3] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [1] o [2], en donde el nucleósido en el extremo 5' de la secuencia coincidente diana de la región de hebra antisentido es un nucleósido que tiene adenina o uracilo.

10 [4] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [1] a [3], en donde la secuencia coincidente diana de la región de hebra antisentido es una secuencia de nucleótidos completamente complementaria a la secuencia diana que consiste en 19 bases de las posiciones de nucleótidos 2847 a 2865 o de las posiciones de nucleótidos 1536 a 1554 en la SEQ ID NO: 1.

[5] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [1] a [4], en donde al menos uno de los azúcares y/o enlaces fosfodiéster que forman el oligonucleótido se modifica.

15 [6] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [5], en donde el azúcar que forma el oligonucleótido es D-ribofuranosa, y la modificación del azúcar es la modificación de un grupo hidroxilo en la posición 2' de D-ribofuranosa.

20 [7] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [6], en donde la modificación del azúcar es 2'-desoxidación, 2'-O-alquilación, 2'-O-alcoxialquilación, 2'-halogenación y/o 2'-O,4'-C-alquilenación de D-ribofuranosa.

[8] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [7], en donde la 2'-O-alquilación es 2'-O-metilación, la 2'-O-alcoxialquilación es 2'-O-metoxietilación, la 2'-halogenación es 2'-fluoración y la 2'-O,4'-C-alquilenación es 2'-O,4'-C-metilenación y/o 2'-O,4'-C-etilenación.

25 [9] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [5] a [8], en donde el enlace fosfodiéster se modifica en fosforotioato.

[10] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [5] a [9], en donde la D-ribofuranosa en el nucleósido en el extremo 3' de la región de hebra homosentido y/o la región de hebra antisentido está 3'-O-alquilada.

30 [11] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo

con [10], en donde la 3'-O-alkilación es 3'-O-metilación.

5 [12] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [1] a [11], en donde una estructura saliente de 3 o menos bases está presente en el extremo 5' y/o el extremo 3' de la región de hebra homosentido y/o la región de hebra antisentido.

[13] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [12], en donde la estructura saliente tiene 2 bases.

10 [14] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [13], en donde la estructura saliente es nucleósidos que contienen dos timinas consecutivas, o nucleósidos que contienen dos uracilos consecutivos.

[15] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [14], en donde la estructura saliente es dos U(M) consecutivas presentes en el extremo 3' de la región de hebra antisentido.

15 [16] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [1], en donde la región de hebra homosentido consiste en un oligonucleótido representado por la siguiente fórmula (I), la región de hebra antisentido consiste en un oligonucleótido representado por la siguiente fórmula (II), y que tiene las siguientes características (a) a (g),:

región de hebra de homosentido: 5' S₀₅-S_a-S₁₉-S₁₈-S₁₇-S₁₆-S₁₅-S₁₄-S₁₃-S₁₂-S₁₁-S₁₀-S₉-S₈-S₇-S₆-S₅-S₄-S₃-S₂-S₁-S₀₃ 3' (I)

20 región de hebra antisentido: 5' A₀₅-A₁-A₂-A₃-A₄-A₅-A₆-A₇-A₈-A₉-A₁₀-A₁₁-A₁₂-A₁₃-A₁₄-A₁₅-A₁₆-A₁₇-A₁₈-A₁₉-A_a-A₀₃ 3' (II)

25 (a) S₁ es un nucleósido modificado en 3', S₂ a S₁₉ representan cada uno un nucleósido, y son cada uno independientemente un ARN 2'-OMe, un ARN 2'-F o un ADN, S_a representa de 0 a 3 nucleósidos, donde los nucleósidos representan cada uno independientemente ARN 2'-OMe, ARN 2'-F o ADN, S₀₃ y S₀₅ representan cada uno independientemente de 0 a 3 nucleósidos, donde los nucleósidos representan cada uno independientemente ARN 2'-OMe, ARN 2'-F, ADN o un nucleósido modificado por puente 2'-O,4'-C, y cada enlace entre nucleósidos representa un enlace fosfodiéster que puede modificarse químicamente;

30 (b) A₁₁, A₁₂, A₁₃, A₁₄ y A₁₅ representan cada uno un nucleósido, uno de A₁₁, A₁₂, A₁₃, A₁₄ y A₁₅ es ADN, ARN, un nucleósido modificado por puente 2'-O,4'-C o ARN 2'-MOE, los otros

son ARN 2'-OMe o ARN 2'-F, A_1 a A_{10} y A_{16} a A_{19} representan cada uno un nucleósido, y cada uno representa independientemente ARN 2'-OMe, ARN 2'-F o ADN, A a representa de 0 a 3 nucleósidos, donde los nucleósidos representan cada uno independientemente ARN 2'-OMe, ARN 2'-F o ADN, A_{03} y A_{05} representan cada uno independientemente de 0 a 3 nucleósidos, donde los nucleósidos representan cada uno independientemente ARN 2'-OMe, ARN 2'-F, ADN o un nucleósido modificado por puente 2'-O,4'-C, y cada enlace entre nucleósidos representa un enlace fosfodiéster que puede estar modificado químicamente;

(c) la secuencia de nucleótidos entre A_2 y A a consiste en una secuencia de nucleótidos sustancialmente complementaria a una secuencia diana, A_1 es un nucleósido que tiene una base complementaria a un nucleósido correspondiente de la secuencia diana, un nucleósido que tiene adenina, un nucleósido que tiene timina o un nucleósido que tiene uracilo, y cuando A_{03} y A_{05} están presentes, las secuencias de nucleótidos de los mismos son cada una independientemente una secuencia de nucleótidos seleccionada independientemente de un nucleósido correspondiente de la secuencia diana;

(d) la secuencia de nucleótidos entre S_1 y S_a y la secuencia de nucleótidos entre A_1 y A a son secuencias de nucleótidos sustancialmente complementarias entre sí, y forman una estructura de doble hebra;

(e) cuando tanto S_{05} como A_{03} están presentes, S_{05} y A_{03} son secuencias de nucleótidos no complementarias entre sí;

(f) cuando tanto S_{03} como A_{05} están presentes, S_{03} y A_{05} son secuencias de nucleótidos no complementarias entre sí; y

(g) la región de hebra homosentido y/o la región de hebra antisentido pueden modificarse químicamente en la posición 5' del nucleósido en el extremo 5' y/o la posición 3' del nucleósido en el extremo 3', o la posición 2' del mismo en el caso donde el nucleósido en el extremo 3' sea un nucleósido modificado en 3'.

[17] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [16], en donde en la fórmula (II), S_1 es ARN 3'-OMe.

[18] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [16] o [17], en donde el nucleósido modificado por puente 2'-O,4'-C es LNA o ENA.

[19] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo

con cualquiera de [16] a [18], en donde en la fórmula (II), dos o más de A_{11} , A_{12} , A_{13} , A_{14} y A_{15} son iguales o diferentes, y son ADN, ARN, un nucleósido modificado por puente 2'-O,4'-C o ARN 2'-MOE.

5 [20] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [19], en donde en la fórmula (II), A_{14} es ARN o un nucleósido modificado por puente 2'-O,4'-C.

[21] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [20], en donde en la fórmula (II), A_{13} es un nucleósido modificado por puente 2'-O,4'-C o ARN 2'-OMe, y A_{14} es ARN.

10 [22] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [21], en donde en la fórmula (II), A_{11} - A_{12} - A_{13} - A_{14} - A_{15} es uno de:

$A_{11}(\text{ARN } 2'\text{-OMe})\text{-}A_{12}(\text{ARN } 2'\text{-OMe})\text{-}A_{13}(\text{ENA})\text{-}A_{14}(\text{ARN})\text{-}A_{15}(\text{ARN } 2'\text{-OMe}),$

$A_{11}(\text{ARN } 2'\text{-F})\text{-}A_{12}(\text{ARN } 2'\text{-OMe})\text{-}A_{13}(\text{ENA})\text{-}A_{14}(\text{ARN})\text{-}A_{15}(\text{ARN } 2'\text{-OMe}),$

$A_{11}(\text{ARN } 2'\text{-OMe})\text{-}A_{12}(\text{ARN } 2'\text{-F})\text{-}A_{13}(\text{ENA})\text{-}A_{14}(\text{ARN})\text{-}A_{15}(\text{ARN } 2'\text{-OMe}),$

15 $A_{11}(\text{ARN } 2'\text{-OMe})\text{-}A_{12}(\text{ARN } 2'\text{-OMe})\text{-}A_{13}(\text{LNA})\text{-}A_{14}(\text{ARN})\text{-}A_{15}(\text{ARN } 2'\text{-OMe}),$

$A_{11}(\text{ARN } 2'\text{-F})\text{-}A_{12}(\text{ARN } 2'\text{-OMe})\text{-}A_{13}(\text{LNA})\text{-}A_{14}(\text{ARN})\text{-}A_{15}(\text{ARN } 2'\text{-OMe}),$

$A_{11}(\text{ARN } 2'\text{-OMe})\text{-}A_{12}(\text{ARN } 2'\text{-F})\text{-}A_{13}(\text{LNA})\text{-}A_{14}(\text{ARN})\text{-}A_{15}(\text{ARN } 2'\text{-OMe}),$

$A_{11}(\text{ARN } 2'\text{-F})\text{-}A_{12}(\text{ARN } 2'\text{-OMe})\text{-}A_{13}(\text{ARN } 2'\text{-OMe})\text{-}A_{14}(\text{ARN})\text{-}A_{15}(\text{ARN } 2'\text{-OMe}),$ y,

$A_{11}(\text{ARN } 2'\text{-OMe})\text{-}A_{12}(\text{ARN } 2'\text{-F})\text{-}A_{13}(\text{ARN } 2'\text{-OMe})\text{-}A_{14}(\text{ARN})\text{-}A_{15}(\text{ARN } 2'\text{-OMe}).$

20 [23] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [20], en donde en la fórmula (II), A_{12} es ADN, y A_{14} es un nucleósido modificado por puente 2'-O,4'-C.

[24] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [23], en donde en la fórmula (II), A_{11} - A_{12} - A_{13} - A_{14} - A_{15} es uno de:

25 $A_{11}(\text{ARN } 2'\text{-F})\text{-}A_{12}(\text{ADN})\text{-}A_{13}(\text{ARN } 2'\text{-OMe})\text{-}A_{14}(\text{ENA})\text{-}A_{15}(\text{ARN } 2'\text{-OMe}),$

$A_{11}(\text{ARN } 2'\text{-OMe})\text{-}A_{12}(\text{ADN})\text{-}A_{13}(\text{ARN } 2'\text{-OMe})\text{-}A_{14}(\text{ENA})\text{-}A_{15}(\text{ARN } 2'\text{-OMe}),$

$A_{11}(\text{ARN } 2'\text{-F})\text{-}A_{12}(\text{ADN})\text{-}A_{13}(\text{ARN } 2'\text{-OMe})\text{-}A_{14}(\text{LNA})\text{-}A_{15}(\text{ARN } 2'\text{-OMe})$, y,

$A_{11}(\text{ARN } 2'\text{-OMe})\text{-}A_{12}(\text{ADN})\text{-}A_{13}(\text{ARN } 2'\text{-OMe})\text{-}A_{14}(\text{LNA})\text{-}A_{15}(\text{ARN } 2'\text{-OMe})$.

[25] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [16] a [24], en donde en la fórmula (II), A_2 , A_6 y A_{16} son ARN 2'-F.

5 [26] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [25], en donde en la fórmula (II), uno o dos nucleósidos seleccionados de A_8 , A_9 y A_{10} son ARN 2'-F, y los nucleósidos A_1 , A_3 a A_5 , A_7 , A_{17} a A_{19} y A_a son ARN 2'-OMe.

10 [27] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [26], en donde en la fórmula (II), A_2 , A_6 , A_8 , A_{10} y A_{16} son ARN 2'-F, y los nucleósidos A_1 , A_3 a A_5 , A_7 , A_9 , A_{17} a A_{19} y A_a son ARN 2'-OMe.

[28] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [16] a [27], en donde en la fórmula (I), S_{11} , S_{12} , S_{13} y S_{15} son ARN 2'-F.

[29] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [28], en donde en la fórmula (I), S_2 a S_{10} , S_{14} , S_{16} a S_{19} y S_a son ARN 2'-OMe.

15 [30] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [16] a [29], en donde cuando se usa ARN en la fórmula (II), un enlace entre el ARN y un nucleósido adyacente en 3' es un enlace fosforotioato.

20 [31] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [16] a [30], en donde en 2 a 5 nucleótidos de cada uno del extremo 5' y el extremo 3' del oligonucleótido, cada enlace entre nucleósidos es un enlace fosforotioato.

[32] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [16] a [31], en donde el número de nucleósidos en cada uno de S_{O3} , S_{O5} , A_{O5} y A_{O3} es 0 a 2.

25 [33] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [32], en donde el número de nucleósidos en S_{O3} es 0.

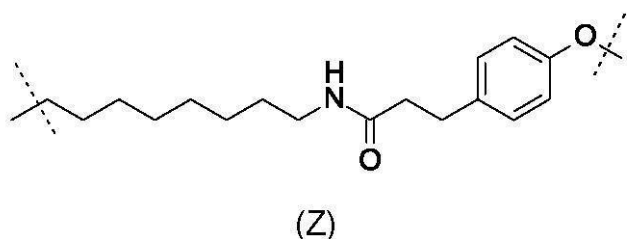
[34] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [33], en donde el número de nucleósidos en cada uno de S_{O3} , S_{O5} y A_{O5} es 0, y el número de nucleósidos en A_{O3} es 2.

[35] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [1] a [34], en donde la región de hebra antisentido y la región de hebra homosenrido forman un oligonucleótido de doble hebra como oligonucleótidos independientes.

5 [36] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [1] a [34], en donde el nucleósido en el extremo 5' de la región de hebra antisentido y el nucleósido en el extremo 3' de la región de hebra homosenrido están conectados por una estructura ligadora.

[37] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [36], en donde la estructura del ligador se representa por la siguiente fórmula:

10 [Fórmula química 1]

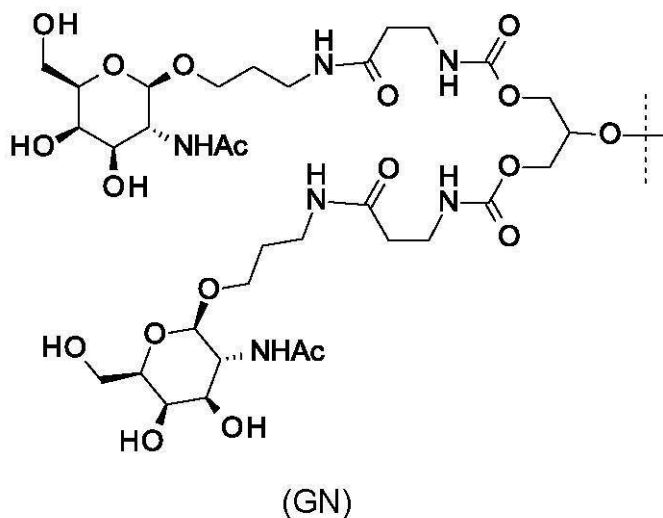


15 en donde la línea discontinua representa un punto de unión, y significa que el átomo de oxígeno unido al grupo fenilo forma un enlace fosfodiéster o un enlace fosforotioato con un grupo 5'-fosfato de un nucleótido en el extremo 5' de una región de hebra antisentido adyacente, y el grupo metileno en el otro extremo forma un enlace fosfodiéster o un enlace fosforotioato con un grupo 3'-fosfato (grupo fosfato en la posición 2' en el caso de un nucleótido modificado en la posición 3') de un nucleótido en el extremo 3' de una región de hebra homosenrido adyacente.

20 [38] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [1] a [37], en donde hay una modificación química con una unidad GalNAc en la posición 5' de un nucleósido en el extremo 5' del oligonucleótido y/o la posición 3' de un nucleósido en el extremo 3' del oligonucleótido, o la posición 2' del nucleósido en el extremo 3' del oligonucleótido en el caso donde el nucleósido en el extremo 3' es un nucleósido modificado en 3'.

25 [39] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [38], en donde la unidad GalNAc se representa por:

[Fórmula química 2]



5 en donde la línea discontinua representa un enlace fosfodiéster formado con un grupo fosfato en el extremo 5' y/o un grupo fosfato (grupo fosfato en la posición 2' en el caso de un nucleótido modificado en la posición 3') en el extremo 3' de un nucleótido adyacente.

10 [40] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [1], en donde la región de hebra homosentido que excluye la estructura protuberante tiene la siguiente fórmula (I-1), la región de hebra antisentido que excluye la estructura protuberante tiene cualquiera de las siguientes fórmulas (II-1) a (II-10), la región de hebra homosentido y la región de hebra antisentido forman un oligonucleótido de doble hebra como oligonucleótidos independientes, y la región de hebra homosentido y la región de hebra antisentido pueden contener cada una independientemente una estructura protuberante:

(fórmulas)

15 5' C(M)G(M)U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(3 M) 3' (I-1)

5' U(M)U(F)G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M) 3' (II-1)

20 5' U(M)U(F)G(M)A(F)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)

3' (II-2)

5'

U(M)U(F)G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(F)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)

3' (II-3)

5

5'

U(M)U(F)G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(F)G(M)

3' (II-4)

5'

U(M)U(F)G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)A(M)C(E)U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)

10 3' (II-5)

5'

U(M)U(F)G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(F)A(M)A(M)C(E)U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)

3' (II-6)

5'

15 U(M)U(F)G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(E)U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)

3' (II-7)

5'

U(M)U(F)G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(F)C(E)U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)

3' (II-8)

20

5'

U(M)U(F)G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)

) 3' (II-9)

5'

U(M)U(F)G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(F)C(M)U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)

25) 3' (II-10)

en donde para las bases de ácido nucleico, A representa adenina, U representa uracilo, T representa timina, G representa guanina, y C representa citosina (siempre que C represente 2'-O,4'-C-etileno puenteado-5-metilcitidina cuando C es ENA), y para los ácidos nucleicos, (R) representa ARN, (D) representa ADN, (M) representa ARN 2'-OMe, (3M) representa ARN 3'-OMe, (F) representa ARN 2'-F, y (E) representa ENA; y "^" significa que el enlace entre

nucleósidos es un enlace fosforotioato ($-P(=S)(OH)-$), y el enlace entre nucleósidos es un enlace fosfodiéster ($-P(=O)(OH)-$) si no se da ninguna indicación específica, pero dos enlaces entre nucleósidos en tres nucleósidos de cada uno de los extremos 5' y el extremo 3' de la región de hebra homosentido, y dos enlaces entre nucleósidos en tres nucleósidos del extremo 5' y tres enlaces entre nucleósidos en cuatro nucleósidos del extremo 3' de la región de hebra antisentido son enlaces fosforotioato, incluso si no se da ninguna indicación específica.

[41] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [40], en donde una estructura saliente de 3 o menos bases está presente en el extremo 5' y/o el extremo 3' de la región de hebra homosentido y/o la región de hebra antisentido.

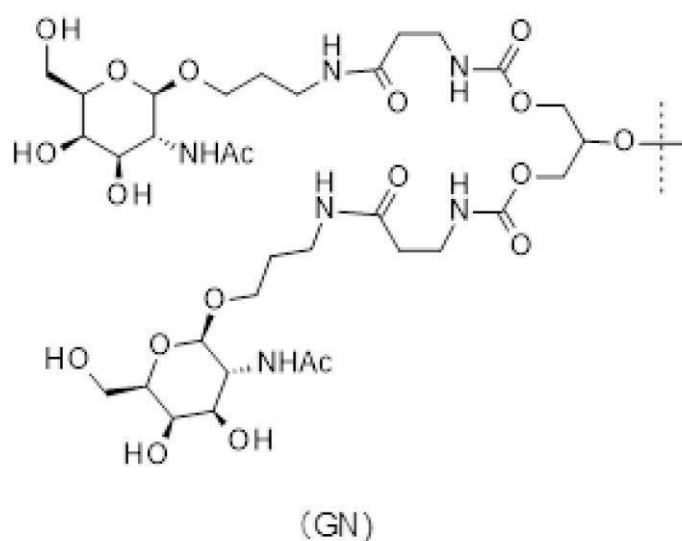
[42] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [41], en donde la estructura saliente tiene 2 bases.

[43] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [42], en donde la estructura saliente es nucleósidos que contienen dos timinas consecutivas, o nucleósidos que contienen dos uracilos consecutivos.

[44] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [43], en donde la estructura saliente es dos U(M) consecutivas adicionadas en el extremo 3' de la región de hebra antisentido.

[45] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [40] a [44], en donde el extremo 5' de la región de hebra homosentido se modifica químicamente con una unidad GalNAc representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula química 3]



en donde la línea discontinua representa un enlace fosfodiéster formado con un grupo fosfato 5' de un nucleótido en el extremo 5' de la región de hebra homosentido adyacente.

- [46] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [1], en donde la región de hebra homosentido tiene la siguiente fórmula (I-2), la región de hebra antisentido tiene cualquiera de las siguientes fórmulas (II-11) a (II-20), y la región de hebra homosentido y la región de hebra antisentido forman un oligonucleótido de doble hebra como oligonucleótidos independientes:

(fórmulas)

10 5'
GNC(M)[^]G(M)[^]U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)[^]A(M)[^]A(3M) 3' (I-2)

 5'
U(M)[^]U(F)[^]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(M)[^]G(M)[^]U(M)[^]U(M) 3' (II-11)

15

 5'
U(M)[^]U(F)[^]G(M)A(F)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(M)[^]G(M)[^]U(M)[^]U(M) 3' (II-12)

 5'
20 U(M)[^]U(F)[^]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(F)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(M)[^]G(M)

M)[^]U(M)[^]U(M) 3' (II-13)

5'

U(M)[^]U(F)[^]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(F)[^]G(M)[^]U(M)[^]U(M) 3' (II-14)

5

5'

U(M)[^]U(F)[^]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)A(M)C(E)U(R)[^]C(M)C(F)A(M)C(M)[^]G(M)[^]U(M)[^]U(M) 3' (II-15)

5'

10 U(M)[^]U(F)[^]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(F)A(M)A(M)C(E)U(R)[^]C(M)C(F)A(M)C(M)[^]G(M)[^]U(M)[^]U(M) 3' (II-16)

5'

U(M)[^]U(F)[^]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(E)U(R)[^]C(M)C(F)A(M)C(M)[^]G(M)[^]U(M)[^]U(M) 3' (II-17)

5'

15 U(M)[^]U(F)[^]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(F)C(E)U(R)[^]C(M)C(F)A(M)C(M)[^]G(M)[^]U(M)[^]U(M) 3' (II-18)

5'

U(M)[^]U(F)[^]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R)[^]C(M)C(F)A(M)C(M)[^]G(M)[^]U(M)[^]U(M) 3' (II-19)

20

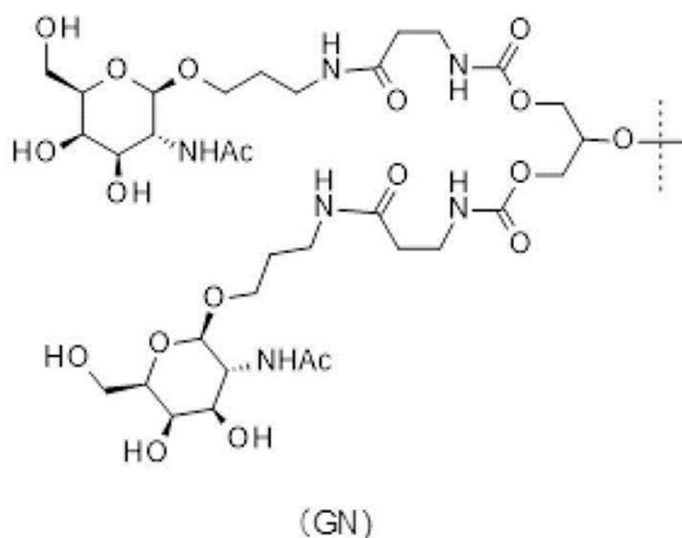
5'

U(M)[^]U(F)[^]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(F)C(M)U(R)[^]C(M)C(F)A(M)C(M)[^]G(M)[^]U(M)[^]U(M) 3' (II-20)

en donde "GN" representa una unidad de GalNAc representada por la siguiente fórmula:

25

[Fórmula química 4]



en donde la línea discontinua representa un enlace fosfodiéster formado con un grupo fosfato 5' de un nucleótido en el extremo 5' de la región de hebra homosentido adyacente; para nucleobases, A representa adenina, U representa uracilo, T representa timina, G
 5 representa guanina y C representa citosina (siempre que C represente 2'-O,4'-C-etileno puenteado-5-metilcitidina cuando C es ENA), y para ácidos nucleicos, (R) representa ARN, (D) representa ADN, (M) representa ARN 2'-OMe, (3M) representa ARN 3'-OMe, (F) representa ARN 2'-F, y (E) representa ENA; "" significa que el enlace entre los nucleósidos es un enlace fosforotioato (-P(=S)(OH)-), y el enlace entre los nucleósidos es un enlace
 10 fosfodiéster (-P(=O)(OH)-) si no se da una indicación específica; y cada uno de los residuos en la posición 3' del nucleótido en el extremo 3' de la región de la hebra homosentido, en la posición 5' del nucleótido en el extremo 5' de la región de la hebra antisentido y en la posición 3' del nucleótido en el extremo 3' de la hebra antisentido es un grupo hidroxilo.

[47] Una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido o una sal
 15 farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [1] a [46] como un ingrediente activo.

[408 La composición farmacéutica de acuerdo con [47], para tratar o prevenir una enfermedad que se puede tratar o prevenir mediante la supresión de la expresión de un receptor de transferrina 2.

20 [49] La composición farmacéutica de acuerdo con [48], para prevenir o tratar la anemia.

[50] La composición farmacéutica de acuerdo con [49], en donde la anemia es anemia

asociada con inflamación crónica o anemia asociada con disfunción de la médula ósea.

[51] La composición farmacéutica de acuerdo con [50], en donde la anemia asociada con inflamación crónica es anemia asociada con una enfermedad autoinmunitaria, anemia asociada con una enfermedad infecciosa, anemia asociada con enfermedad entérica
5 inflamatoria, anemia asociada con insuficiencia cardíaca, anemia asociada con enfermedad renal crónica, anemia cancerosa o anemia asociada con enfermedad de Castleman.

[52] La composición farmacéutica de acuerdo con [50], en donde la anemia asociada con la disfunción de la médula ósea es anemia asociada con mielofibrosis, anemia asociada con síndrome mielodisplásico, anemia asociada con leucemia mielomonocítica crónica o
10 anemia asociada con mielosupresión quimioterapéutica.

[53] La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de [47] a [52], que está destinada a un paciente que se somete a tratamiento con otro agente farmacológico.

[54] La composición farmacéutica de acuerdo con [53], en donde el otro agente farmacológico es un fármaco para tratar la anemia, un fármaco para tratar una enfermedad
15 que provoca anemia o un fármaco para tratar el trastorno por sobrecarga de hierro.

[55] La composición farmacéutica de acuerdo con [54], en donde el fármaco para tratar la anemia es una preparación de factor de estimulación eritropoyética, un inhibidor de HIFPHD (factor proil hidroxilasa inducible por hipoxia), un suplemento de hierro oral, un suplemento de hierro intravenoso, luspatercept o danazol.

[56] La composición farmacéutica de acuerdo con [55], en donde la preparación de factor de estimulación eritropoyética es epoetina alfa, epoetina beta, epoetina beta pegol, epoetina kappa o darbepoetina alfa.
20

[57] La composición farmacéutica de acuerdo con [55], en donde el inhibidor de HIFPHD (factor proil hidroxilasa inducible por hipoxia) es roxadustat, vadadustat, daprodustat, enarodustat o molidustat.
25

[58] La composición farmacéutica de acuerdo con [55], en donde el suplemento de hierro oral es citrato ferroso, citrato férrico, fumarato ferroso, pirofosfato férrico soluble o sulfuro de hierro seco.

[59] La composición farmacéutica de acuerdo con [55], en donde el suplemento de
30 hierro intravenoso es carboximaltosa férrica u óxido de hierro que contiene azúcar.

[60] La composición farmacéutica de acuerdo con [54], en donde el fármaco para tratar una enfermedad que provoca anemia es un fármaco para tratar la mielofibrosis, un fármaco para tratar el síndrome mielodisplásico, un fármaco para tratar la enfermedad renal crónica o un agente anticancerígeno.

5 [61] La composición farmacéutica de acuerdo con [60], en donde el fármaco para tratar la mielofibrosis es un inhibidor de JAK2.

[62] La composición farmacéutica de acuerdo con [61], en donde el inhibidor de JAK2 es ruxolitinib, fedratinib, pacritinib o momelotinib.

10 [63] La composición farmacéutica de acuerdo con [60], en donde el fármaco para tratar el síndrome mielodisplásico es azacitidina o lenalidomida.

[64] La composición farmacéutica de acuerdo con [60], en donde el fármaco para tratar la enfermedad renal crónica es un inhibidor de SGLT2 (cotransportador de glucosa de sodio 2), un inhibidor del sistema renina-angiotensina, un antagonista de calcio, un fármaco diurético, un fármaco para tratar la diabetes, un fármaco para tratar la hiperlipidemia, un esteroide o un
15 fármaco inmunosupresor.

[65] La composición farmacéutica de acuerdo con [64], en donde el inhibidor del sistema renina-angiotensina es un antagonista del receptor de angiotensina II o un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina.

20 [66] La composición farmacéutica de acuerdo con [60], en donde el agente anticanceroso es un fármaco quimioterapéutico.

[67] La composición farmacéutica de acuerdo con [66], en donde el fármaco quimioterapéutico es cisplatino, carboplatino, doxorubicina, paclitaxel o amrubicina.

[68] La composición farmacéutica de acuerdo con [54], en donde el fármaco para tratar el trastorno de sobrecarga de hierro es un agente quelante de hierro.

25 [69] La composición farmacéutica de acuerdo con [68], en donde el agente quelante de hierro es deferasirox, deferoxamina o deferiprona.

[70] Un método para tratar o prevenir la anemia, que comprende administrar una cantidad efectiva del oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [1] a [46] a un sujeto.

[71] Un método para tratar o prevenir la anemia, que comprende administrar la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de [47] a [69] a un sujeto.

[72] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [1] a [46], para usarse en el tratamiento o prevención de la anemia.

5 [73] El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [1] a [46], para usarse como un ingrediente activo de la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de [47] a [69].

10 [74] Uso del oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [1] a [46] en la producción de la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de [47] a [69].

Además, en un aspecto, la presente invención proporciona lo siguiente:

Una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de la anemia asociada con la disfunción de la médula ósea, que comprende, como ingrediente activo, un compuesto que tiene un efecto de inactivación del gen del receptor 2 de la transferrina.

15 [76] La composición farmacéutica de acuerdo con [75], en donde el compuesto es un oligonucleótido de ARNi.

Efectos ventajosos de la invención

20 El ARNi de la presente invención puede suprimir la expresión del ARNm de TfR2. El ARNi de la presente invención puede suprimir la expresión del ARNm de TfR2 en el hígado en un organismo vivo, y es capaz de prevenir, mejorar y/o tratar la anemia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 [Figura 1] La Figura 1 muestra patrones de modificación de ARNi de doble hebra. En la figura, el círculo negro representa ARN 2'-O-metilo, el círculo blanco representa ARN 2'-desoxi-2'-fluoro, el triángulo negro representa ADN, el triángulo blanco representa ARN 3'-O-metilo, el diamante blanco representa ENA, el diamante negro representa ARN, el círculo blanco con una barra vertical representa LNA, el círculo blanco con una barra horizontal representa ARN 2'-O-metoxietilo y la línea que conecta las marcas representa un enlace fosfodiéster, donde la línea que conecta las marcas representa un enlace fosforotioato cuando se etiqueta "S". En la figura, la hebra superior representa una hebra homosentido (o una

hebra pasajera), el extremo izquierdo de la hebra homosentido representa el extremo 5', y el extremo derecho de la hebra homosentido representa el extremo 3'. La hebra inferior representa una hebra antisentido (o una hebra guía), el extremo derecho de la hebra antisentido representa el extremo 5', y el extremo izquierdo de la hebra antisentido representa el extremo 3'. Cada ARNip está representado por NNN-xxx, y los números y letras escritos después de NNN-xxx indican una abreviatura de cada uno de los patrones de modificación mostrados en las Figuras 1 a 6.

[Figura 2] La Figura 2 muestra patrones de modificación de ARNip de doble hebra en el que A₁₄ de la hebra antisentido es ADN o ARN. Los símbolos, disposiciones, modificaciones y similares se muestran de la misma forma que en la Figura 1.

[Figura 3] La Figura 3 muestra patrones de modificación de ARNip de doble hebra en los que A₈ y A₉ de la hebra antisentido son ARN 2'-desoxi-2'-fluoro. Los símbolos, disposiciones, modificaciones y similares se muestran de la misma forma que en la Figura 1.

[Figura 4] La Figura 4 muestra patrones de modificación de ARNip de doble hebra en el que A₁₄ de la hebra antisentido es ENA. Los símbolos, disposiciones, modificaciones y similares se muestran de la misma forma que en la Figura 1.

[Figura 5] La Figura 5 muestra patrones de modificación de ARNip de doble hebra en los que A₈ y A₉ de la hebra antisentido son ARN 2'-desoxi-2'-fluoro y A₁₃ de la hebra antisentido es ENA. Los símbolos, disposiciones, modificaciones y similares se muestran de la misma forma que en la Figura 1.

[Figura 6] La Figura 6 muestra patrones de modificación de ARNip de doble hebra en los que A₈ de la hebra antisentido es ARN 2'-O-metilo y A₉ de la hebra antisentido es ARN 2'-desoxi-2'-fluoro. Los símbolos, disposiciones, modificaciones y similares se muestran de la misma forma que en la Figura 1.

[Figura 7] La Figura 7A muestra el cambio en la concentración de hierro en plasma después del tratamiento con partículas lipídicas de ácido nucleico que encapsulan ARNip de TfR2 en un modelo en ratón de anemia asociada con la pérdida de la función de la médula ósea. La Figura 7B muestra el cambio en la concentración de hepcidina en plasma después del tratamiento con ARNip de TfR2 encapsulado en LNP en un modelo en ratón de anemia asociada con la pérdida de la función de la médula ósea. La Figura 7C muestra el cambio en la concentración de hemoglobina (HGB) después del tratamiento con ARNip de TfR2

encapsulado en LNP en un modelo en ratón de anemia asociada con la pérdida de la función de la médula ósea. La Figura 7D muestra la cantidad media de hemoglobina corpuscular (MCH) después del tratamiento con ARNip de TfR2 encapsulado en LNP en un modelo en ratón de anemia asociada con la pérdida de la función de la médula ósea. La Figura 7E muestra el nivel de expresión de ARNm de Tfr2 en hígado (mTfr2) después del tratamiento con ARNip de TfR2 encapsulado en LNP en un modelo en ratón de anemia asociada con la pérdida de la función de la médula ósea. La Figura 7F muestra el nivel de expresión de ARNm de hepcidina hepática (mHepcidina) después del tratamiento con ARNip de TfR2 encapsulado en LNP en un modelo en ratón de anemia asociada con la pérdida de la función de la médula ósea.

[Figura 8-1] La Figura 8A muestra el cambio de la concentración de HGB después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con la pérdida de la función de la médula ósea. La Figura 8B muestra la concentración de HGB 3 días después del tratamiento con el agente farmacológico en un modelo en ratón de anemia asociada con la pérdida de la función de la médula ósea. La Figura 8C muestra el nivel de expresión de ARNm de mTfR2 en hígado después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con la pérdida de la función de la médula ósea. La Figura 8D muestra la concentración de HGB después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con la pérdida de la función de la médula ósea.

[Figura 8-2] La Figura 8E muestra la cantidad de MCH después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con la pérdida de la función de la médula ósea. La Figura 8F muestra el nivel de hematocrito (HCT) después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con la pérdida de la función de la médula ósea. La Figura 8G muestra la cantidad de glóbulos rojos (RBC) después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con la pérdida de la función de la médula ósea.

[Figura 9] La Figura 9A muestra la concentración de hierro en plasma después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con inflamación. La Figura 9B muestra la concentración de hepcidina en plasma después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con inflamación. La Figura 9C muestra la concentración de HGB

después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con inflamación. La Figura 9D muestra la cantidad de MCH después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con inflamación. La Figura 9E muestra la cantidad de RBC después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con inflamación. La Figura 9F muestra el nivel de expresión de ARNm de mTfR2 en hígado después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con inflamación.

[Figura 10] La Figura 10A muestra la concentración de hierro en plasma después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con inflamación. La Figura 10B muestra la concentración de HGB después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con inflamación. La Figura 10C muestra la cantidad de MCH después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con inflamación. La Figura 10D muestra la cantidad de RBC después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con inflamación. La Figura 10E muestra el nivel de expresión de ARNm de mTfR2 en hígado después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con inflamación.

[Figura 11] La Figura 11 muestra los resultados de la evaluación de la citotoxicidad del ARNip en células HepG2.

[Figura 12] La Figura 12 muestra la actividad de inactivación de hTfR2 del ARNip en células HepG2.

[Figura 13] La Figura 13 muestra el cambio en la concentración de hierro en plasma después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en ratones normales.

[Figura 14] La Figura 14A muestra la concentración de HGB antes del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con la pérdida de la función de la médula ósea. La Figura 14B muestra la concentración de hierro en plasma antes del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con la pérdida de la función de la médula ósea. La Figura 14C muestra la concentración de hierro en plasma 8 días después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con la pérdida de la

función de la médula ósea. La Figura 14D muestra la concentración de HGB 9 días después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con la pérdida de la función de la médula ósea. La Figura 14E muestra la cantidad de MCH 9 días después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con la pérdida de la función de la médula ósea. La Figura 14F muestra la cantidad de RBC 9 días después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con la pérdida de la función de la médula ósea.

[Figura 15] La Figura 15A muestra el cambio en la concentración de hierro en plasma después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con inflamación. La Figura 15B muestra la concentración de HGB antes del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con inflamación. La Figura 15C muestra la concentración de HGB 8 días después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con inflamación. La Figura 15D muestra la cantidad de MCH 8 días después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con inflamación. La FIGURA 15E muestra la cantidad de RBC 8 días después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con inflamación. La Figura 15F muestra el nivel de expresión de ARNm de mTfR2 en hígado 8 días después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con inflamación.

[Figura 16] La Figura 16A muestra el cambio en la concentración de hierro en plasma después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de MDS. La Figura 16B muestra el cambio en la concentración de HGB después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de MDS. La Figura 16C muestra la concentración de HGB 8 semanas después del inicio del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de MDS. La Figura 16D muestra la cantidad de MCH 8 semanas después del inicio del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de MDS. La FIGURA 16E muestra la cantidad de RBC 8 semanas después del inicio del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de MDS. La Figura 16F muestra el nivel de expresión de ARNm de mTfR2 en hígado 8 semanas después del inicio del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de MDS.

[Figura 17-1] La Figura 17A muestra la concentración de hierro en plasma antes del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con enfermedad renal crónica. La Figura 17B muestra la concentración de HGB antes del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con enfermedad renal crónica. La Figura 17C muestra la concentración de hierro en plasma 6 semanas después del inicio del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con enfermedad renal crónica. La Figura 17D muestra la concentración de HGB 6 semanas después del inicio del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con enfermedad renal crónica.

[Figura 17-2] La Figura 17E muestra la cantidad de MCH 6 semanas después del inicio del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con enfermedad renal crónica. La Figura 17F muestra la cantidad de RBC 6 semanas después del inicio del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con enfermedad renal crónica. La Figura 17G muestra el nivel DE expresión de ARNm de mTfR2 en hígado 6 semanas después del inicio del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con enfermedad renal crónica.

[Figura 18] La Figura 18A muestra la concentración de HGB antes del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia provocada por ruxolitinib. La Figura 18B muestra la concentración de hierro en plasma 3 semanas después del inicio del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia provocada por ruxolitinib. La Figura 18C muestra la concentración de HGB 6 semanas después del inicio del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia provocada por ruxolitinib. La Figura 18D muestra la cantidad de MCH 6 semanas después del inicio del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia provocada por ruxolitinib. La Figura 18E muestra la cantidad de RBC 6 semanas después del inicio del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia provocada por ruxolitinib. La Figura 18F muestra el nivel de expresión del ARNm de mTfR2 en hígado 6 semanas después del inicio del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia provocada por ruxolitinib.

[Figura 19] La Figura 19 muestra el nivel de expresión de ARNm de hTfR2 hepático 7

días después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en ratones Tg de hTfR2.

[Figura 20] La Figura 20 muestra el nivel de expresión de ARNm de hTfR2 después del tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en células hepáticas primarias humanas.

[Figura 21] La Figura 21A muestra la actividad supresora de la expresión de ARNm de hepcidina de TfR2-019 y TfR2-039 en células HepG2. La Figura 21B muestra la actividad supresora de la expresión de ARNm de hepcidina de TfR2-019.94DUG y TfR2-039.23DUG en células HepG2.

[Figura 22-1] La Figura 22-1 muestra la secuencia de nucleótidos del ARNm del gen que codifica para el receptor 2 de transferrina humana (hTfR2) (SEQ ID NO: 1). La secuencia subrayada (la secuencia 2847 a 2865) indica la secuencia dirigida por TfR2-019, y la secuencia doblemente subrayada (la secuencia 1536 a 1554) indica la secuencia dirigida por TfR2-039.

[Figura 22-2] La Figura 22-2 muestra una continuación de la Figura 22-1.

DESCRIPCIÓN DE LAS MODALIDADES

1. Descripción de los términos

En la presente memoria descriptiva, el término "gen diana" se refiere a ARNm correspondiente a un gen que codifica para el receptor de transferrina 2 (TfR2), y puede ser ARNm inmaduro antes de someterse a procesamiento de ARN (también denominado precursor de ARNm o pre-ARNm), o ARNm madurado al someterse a procesamiento de ARN. El procesamiento de ARN incluye, por ejemplo, empalme de ARN, formación de una estructura de casquete en el extremo 5'y formación de una porción de cola poli-A en el extremo 3'.

TfR2 es una proteína de membrana de tipo 2 expresada principalmente en el hígado, y se sabe que consiste en una región intracelular, una región transmembrana y una región extracelular (The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 35 (2003) 292-296). Se sabe que TfR2 juega un papel clave en la producción de hepcidina, que tiene un papel importante en el metabolismo del hierro y el control del metabolismo del hierro (Front. Pharmacol., 06 de marzo de 2014, Haematologica 2011; 96(4): 500-506., Blood. 2011; 117(10): 2960-2966).

El término "anemia" se refiere a una condición patológica en la que disminuye la concentración de hemoglobina existente en los eritrocitos en la sangre y que tiene la capacidad de transportar oxígeno. La anemia está involucrada en una disminución de la actividad física y un aumento de la mortalidad (Ann N Y Acad Sci. 2019 August; 1450(1): 15-31). La anemia se clasifica en varios tipos según la causa de la misma, las características clínicas, el índice de eritrocitos, tal como un volumen corpuscular medio (MCV) (The Journal of the Japanese Society of Internal Medicine, Vol. 104, No. 7: 1375-1382, The Guideline for Laboratory Medicine JSLM 2015: 175-180) y similares. Se considera que la anemia está provocada principalmente por una deficiencia en la producción de eritrocitos, destrucción excesiva de eritrocitos, deficiencia de hierro y similares, que se sabe que están intrincadamente relacionadas con una variedad de condiciones patológicas tal como utilización defectuosa de hierro asociada con inflamación crónica y similares, y disfunción de la médula ósea (Ann N Y Acad Sci. 2019 August; 1450(1): 15-31.).

Para la anemia asociada con la inflamación crónica, se sabe que un aumento permanente de citocinas inflamatorias tal como la interleucina 6 (IL6) conduce a un aumento en la concentración sanguínea de hepcidina, que desempeña un papel importante en el metabolismo del hierro, lo que provoca una utilización defectuosa del hierro, lo que resulta en una disminución de la función hematopoyética (Med Clin North Am. 2017 March; 101(2): 285-296.). Los ejemplos de la causa de esta inflamación crónica incluyen enfermedades crónicas tal como enfermedades autoinmunitarias, enfermedades infecciosas, enfermedades entéricas inflamatorias, insuficiencia cardíaca, enfermedad renal crónica y cáncer. Los ejemplos de anemia asociada con inflamación crónica incluyen anemia asociada con una enfermedad autoinmunitaria tal como artritis reumatoide, eritematosa sistémica o anemia hematólitica autoinmunitaria, anemia asociada con una enfermedad infecciosa, anemia asociada con síndrome de activación de macrófagos, anemia asociada con enfermedad de Castleman, anemia asociada con una enfermedad entérica inflamatoria tal como colitis inflamatoria, anemia asociada con insuficiencia cardíaca, anemia asociada con enfermedad renal crónica y anemia cancerosa. La anemia cancerosa incluye, por ejemplo, anemia asociada con cáncer tal como mieloma múltiple, leucemia aguda, leucemia crónica, cáncer de pulmón o cáncer de mama.

Para la anemia asociada con la disfunción de la médula ósea, la capacidad de producir eritrocitos se ve significativamente afectada por algunos factores, lo que lleva a la anemia. Los ejemplos de anemia asociada con la disfunción de la médula ósea incluyen anemia asociada con el síndrome mielodisplásico, anemia asociada con mielofibrosis, anemia

asociada con leucemia mielomonocítica crónica (CMML), anemia asociada con mielosupresión quimioterapéutica, anemia aplásica, anemia de Diamond-Blackfan y anemia de Fanconi. La mielofibrosis es una enfermedad en la que se genera una variante génica tal como JAK2V617F en las células madre hematopoyéticas a posteriori y, por lo tanto, proliferan clones anormales derivados de células madre hematopoyéticas, de modo que hay un aumento permanente de la inflamación y la fibrosis de la médula ósea, lo que resulta en la pérdida de la función de la médula ósea. Se sabe que la mielofibrosis produce anemia grave, agrandamiento del bazo y similares (Am J Hematol. 2021: 96: 145-162.).

En la presente memoria descriptiva, ácido nucleico o molécula de ácido nucleico es un término general para nucleósidos, nucleótidos, oligonucleótidos y polinucleótidos.

El término "nucleósido" significa una porción de estructura química en el que se unen una porción de base importante para la información genética y una porción de azúcar importante para las propiedades fisicoquímicas de la molécula.

El término "nucleótido" se refiere a un compuesto en el que el grupo hidroxilo en la posición 3'(posición 2' en el caso de la modificación en la posición 3') de una porción de azúcar de un nucleósido forma un éster con un grupo fosfato.

El término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero que tiene una estructura en la que hay dos o más nucleótidos, y la porción del grupo fosfato de uno de los nucleótidos y el grupo hidroxilo en la posición 5' de la porción de azúcar de otro nucleótido están unidos (enlace fosfodiéster). Sin embargo, los residuos en la posición 3'(posición 2' en el caso de un nucleótido modificado en la posición 3') del nucleótido en el extremo 3' y/o la posición 5' del nucleótido en el extremo 5' pueden ser grupos hidroxilo o grupos fosfato, y estos grupos pueden modificarse químicamente. El enlace fosfodiéster entre los nucleósidos se puede modificar químicamente. En la presente memoria descriptiva, el término "oligonucleótido" y el término "polinucleótido" se usan indistintamente entre sí.

La porción de base de un ácido nucleico es adenina (A), guanina (G), citosina (C), uracilo (U) o timina (T), A y U o T, G y C, respectivamente, forman pares de bases de Watson-Crick a través de un enlace de hidrógeno, y la relación entre las bases que forman un par de bases se denomina "complementaria". Cada porción de base se puede modificar químicamente y la base modificada puede tener la misma capacidad para formar un par de bases que la base original. Como bases modificadas típicas, se conocen 5-metilcitosina (5C), 5-metiluracilo (5U) y similares. 5U es idéntico en estructura a T. En el listado de secuencias

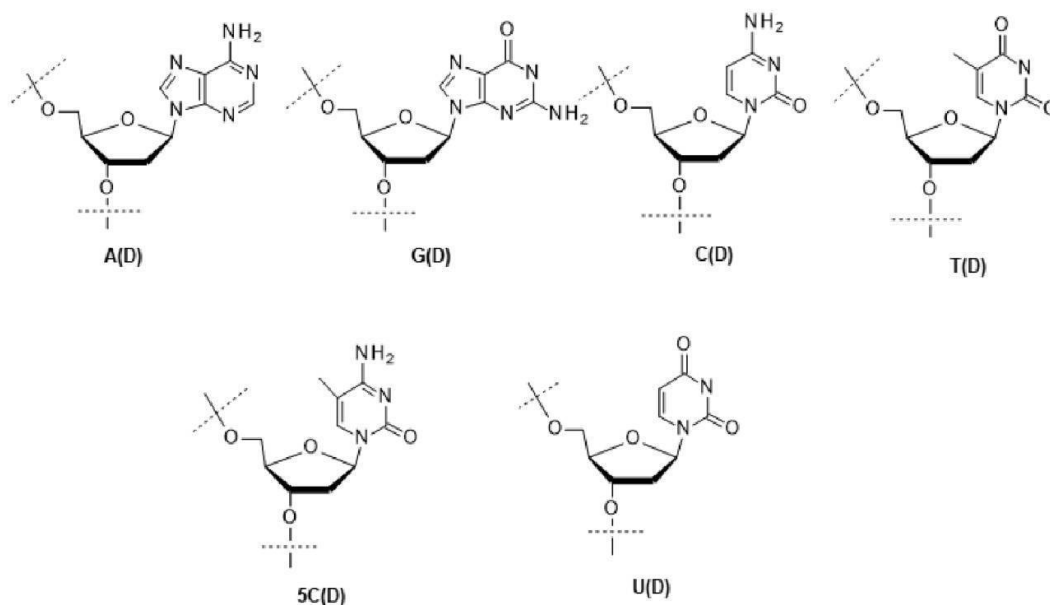
adjunto a la presente memoria descriptiva, 5C se representa como C, y 5U se representa como T o U.

En la presente memoria descriptiva, se pueden usar "símbolos para bases (símbolos para porciones de azúcar)" en la notación para ácidos nucleicos. Los símbolos para las porciones de azúcar se describirán en las siguientes secciones donde se describen varios nucleósidos.

En la presente memoria descriptiva, siempre que no se proporcione una indicación específica, el término "patrón de modificación" del oligonucleótido significa una disposición de modificaciones de las porciones de azúcar de los nucleósidos que forman un oligonucleótido, independientemente de la secuencia de bases. Si se proporciona una indicación específica, este término significa un patrón de modificación combinado adicionalmente con una forma de enlace entre nucleósidos. Dado que la estructura de la porción de azúcar y el enlace entre nucleósidos son elementos que no dependen de una secuencia diana, y tienen influencias sobre la estabilidad de las moléculas y el rendimiento del enlace asociado con la estabilidad, es probable que un patrón de modificación que se confirma que tiene una acción y un efecto sobre una secuencia diana exhiba la misma acción y efecto sobre otra secuencia diana (ver, por ejemplo, Mol Ther. (2018) 26: 708-717).

En la presente memoria descriptiva, el término "nucleósido natural" se refiere a un 2'-desoxinucleósido o un ribonucleósido. El 2'-desoxinucleósido (también denominado "ADN"; el símbolo que representa una porción de azúcar es (D), y se puede expresar mediante una marca en minúscula para una porción de base) correspondiente a cada base tiene una estructura representada por una de las siguientes fórmulas. 2'-desoxiadenosina puede representarse como A(D) o a, 2'-desoxiguanosina puede representarse como G(D) o g, 2'-desoxicitidina puede representarse como C(D) o c, timidina puede representarse como T(D) o t, 2'-desoxi-5-metilcitidina puede representarse como 5C(D) o 5c, y 2'-desoxiuridina puede representarse como U(D) o u. Un 2-desoxinucleósido cuya base no se especifica puede representarse como N(D).

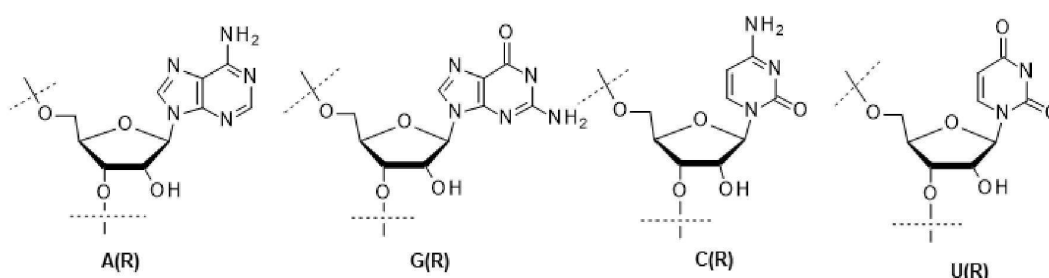
[Fórmula química 5]



en donde la línea discontinua indica un punto de unión.

El ribonucleósido (también denominado "ARN"; el símbolo que representa una porción de azúcar es (R), y se puede representar como una mayúscula que indica una porción de base) correspondiente a cada base tiene una estructura representada por una de las siguientes fórmulas. La adenosina puede representarse como A(R) o A, la guanosina puede representarse como G(R) o G, la citidina puede representarse como C(R) o C, y la uridina puede representarse como U(R) o U. Un ribonucleósido cuya base no se especifica puede representarse como N(R).

10 [Fórmula química 6]



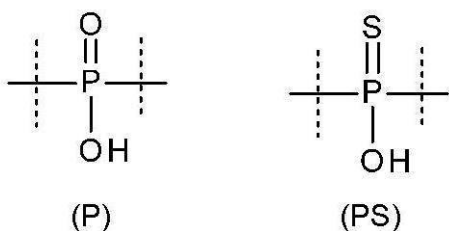
en donde la línea discontinua indica un punto de unión.

En la presente memoria descriptiva, los términos "nucleósido modificado" y "nucleótido modificado" significan un nucleósido o un nucleótido que contiene al menos una estructura

químicamente modificada fuera de la porción base, la porción azúcar o la porción fosfodiéster de un nucleósido natural.

En la presente memoria descriptiva, el término "enlace fosfodiéster que puede modificarse químicamente" significa un enlace fosfodiéster adoptado como un enlace inter-nucleósido natural, o un enlace fosfodiéster modificado químicamente. El enlace entre nucleósidos natural es un enlace fosfodiéster representado por la siguiente fórmula (P), y se muestra sin carácter ni símbolo entre nucleósidos, o entre un nucleósido y una unidad estructural adyacente (por ejemplo, una unidad GalNAc), una estructura de modificación química (por ejemplo, una estructura descrita más adelante indicada por "2"), o un ligador químico o un ligador de oligonucleótido (por ejemplo, una estructura descrita más adelante indicada por "Z") en la presentación de secuencias de nucleótidos en la presente memoria descriptiva. En la presente memoria descriptiva, el término "enlace fosfodiéster químicamente modificado" significa una forma de enlace en la que el átomo de fósforo contenido en el enlace fosfodiéster está químicamente modificado. Los ejemplos del enlace fosfodiéster modificado químicamente incluyen un enlace fosforotioato representado por la siguiente fórmula (PS), un enlace fosforamidato que es un enlace modificado en el que se adiciona un átomo de nitrógeno a un átomo de fósforo, un enlace alquilfosfonato que es un enlace modificado en el que se adiciona un grupo alquilo reemplazable a un átomo de fósforo (por ejemplo, un enlace metilfosfonato cuando el grupo alquilo es un grupo metilo) y un enlace fosfotriéster que es un enlace modificado en el que se adiciona un grupo alquilo reemplazable a un átomo de oxígeno de un enlace no covalente de un grupo fosfato. Cuando se adopta un enlace fosforotioato, "^" se muestra entre nucleósidos, o entre un nucleósido y su unidad estructural adyacente (por ejemplo, una unidad GalNAc), una estructura de modificación química (por ejemplo, una estructura descrita más adelante indicada por "2"), o un ligador químico o un ligador de oligonucleótido (por ejemplo, una estructura descrita más adelante indicada por "Z") en la presentación de secuencias de nucleótidos en la presente memoria descriptiva.

[Fórmula química 7]



en donde la línea discontinua representa un punto de unión, el punto de unión en un lado representa un enlace éster formado con el átomo de oxígeno del grupo 3'-hidroxilo (átomo de oxígeno en la posición 2' en el caso de un nucleósido modificado en la posición 3') de un nucleósido adyacente en el lado 5', una unidad estructural adyacente, o un ligador químico o un ligador oligonucleótido, y el punto de unión en el otro lado representa un enlace éster formado con el átomo de oxígeno del grupo 5'-hidroxilo de un nucleósido adyacente en el lado 3', una unidad estructural, o un ligador químico o un ligador oligonucleótido.

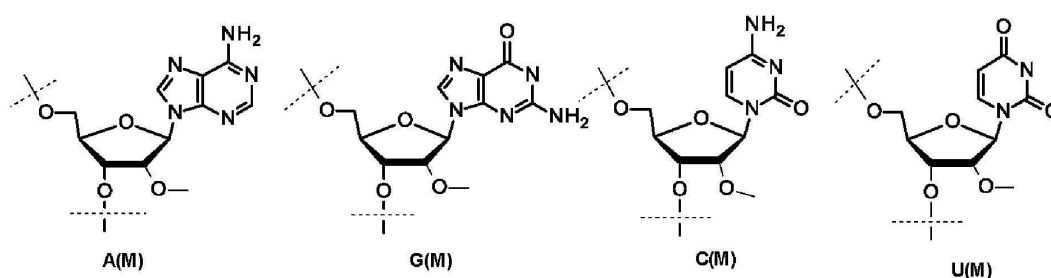
En la presente memoria descriptiva, el término "nucleósido modificado con azúcar" se refiere a un nucleósido en el que se modifica la porción de azúcar del nucleósido. El nucleósido modificado con azúcar incluye todas las formas de modificación de azúcar que se conocen en el campo técnico al que pertenece la presente invención. Los ejemplos del nucleósido modificado con azúcar incluyen nucleósidos modificados en 2', nucleósidos modificados en 3', nucleósidos modificados con 4'-tio, nucleósidos modificados con 4'-tio-2 'y nucleósidos modificados con puente 2'-O,4'-C. Ejemplos de modificaciones de azúcar preferidas son 2'-O-alquilación (metilación, etilación, propilación, isopropilación, butilación y similares), 2'-O-alcoxialquilación (metoxietilación, metoxipropilación, metoxibutilación y similares), 2'-halogenación (cloración, fluoración y similares), 3'-O-alquilación (metilación, etilación, propilación, isopropilación, butilación y similares), 3'-O-alcoxialquilación (metoxietilación, metoxipropilación, metoxibutilación y similares), 3' -halogenación (cloración, fluoración y similares), puente 2'-O,4'-C (puente de alquileo y similares) y similares.

En la presente memoria descriptiva, el término "nucleósido modificado en 2'" se refiere a un nucleósido en el que la ribofuranoza contenida en el nucleósido se modifica químicamente en la posición 2'. Los ejemplos de modificaciones relevantes son nucleósidos 2'-O-alquilados (por ejemplo, metilados, etilados, propilados, isopropilados y butilados), nucleósidos 2'-O-alcoxialquilados (por ejemplo, metoxietilados, metoxipropilados y metoxibutil), nucleósidos 2'-halogenados (por ejemplo, clorados y fluorados), nucleósidos 2'-alilados, nucleósidos 2'-aminados, nucleósidos 2'-azidados, nucleósidos 2'-O-alilados, nucleósidos 2'-OCF₃, nucleósidos 2'-O(CH₂)₂SCH₃, nucleósidos 2'-O-(CH₂)₂-O-N-(R_m)(R_n), o nucleósidos 2'-O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n) (cada R_m y R_n son independientemente H, un grupo protector de amino, o un alquilo de C₁-C₁₀ sustituido o insustituido). El nucleósido modificado en 2' preferido es un nucleósido 2'-O-alquilado, un nucleósido 2'-O-alcoxialquilado o un nucleósido 2'-halogenado.

Los ejemplos de una modificación de 2'-O-alquilación del nucleósido modificado con

azúcar incluyen 2'-O-metilnucleósido (a veces denominado "ARN 2'-OMe" o "ARN 2'-O-metilo"; el símbolo que representa una porción de azúcar es (M)). El 2'-O-metilnucleósido correspondiente a cada base tiene una estructura representada por una de las siguientes fórmulas: La 2'-O-metiladenosina se puede representar como A(M), la 2'-O-metilguanosina se puede representar como G(M), la 2'-O-metilcitidina se puede representar como C(M), la 2'-O-metil-5-metilcitidina se puede representar como 5C(M), la 2'-O-metiluridina se puede representar como U(M) y la 2'-O-metil-5-metiluridina se puede representar como T(M). Un 2'-O-metilnucleósido cuya base no se especifica se puede representar como N(M).

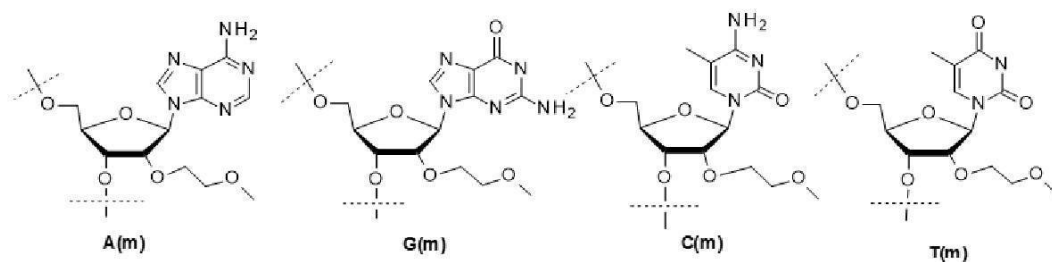
[Fórmula química 8]



en donde la línea discontinua indica un punto de unión.

Los ejemplos de una modificación de 2'-O-alcoxialquilación incluyen 2'-O-metoxietilnucleósidos (a veces denominados "ARN 2'-MOE", "ARN 2'-O-metoxietilo" o "ARN 2'-metoxietoxi"; el símbolo que representa una porción de azúcar es (m)). El 2'-O-metoxietilnucleósido correspondiente a cada base tiene una estructura representada por una de las siguientes fórmulas: La 2'-O-metoxietiladenosina se puede representar como A(m), la 2'-O-metoxietilguanosina se puede representar como G(m), la 2'-O-metoxietil-5-metilcitidina se puede representar como C(m) (escrito como C(m) por conveniencia, aunque la estructura de la base es 5C; la 2'-O-metoxietilcitidina también se puede usar en reemplazo de la 2'-O-metoxietil-5-metilcitidina), la 2'-O-metoxietiluridina se puede representar como U(m) y la 2'-O-metoxietil-5-metiluridina se puede representar como T(m). Un 2'-O-metoxietilnucleósido cuya base no se especifica se puede representar como N(m).

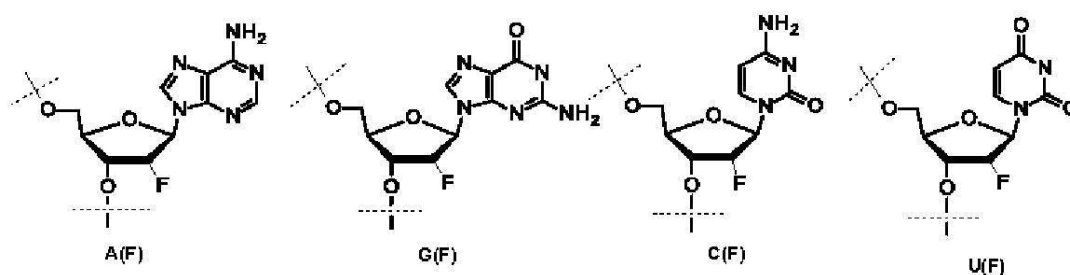
[Fórmula química 9]



en donde la línea discontinua indica un punto de unión.

Los ejemplos de una modificación de 2'-halogenación incluyen 2'-desoxi-2'-fluoronucleósidos ("a veces denominado "ARN 2'-F" o "ARN 2'-desoxi-2'-fluoro"; el símbolo que representa una porción de azúcar es (F)). El 2'-desoxi-2'-fluoronucleósido correspondiente a cada base tiene una estructura representada por una de las siguientes fórmulas: 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina se puede representar como A(F), 2'-desoxi-2'-fluoroguanosina se puede representar como G(F), 2'-desoxi-2'-fluorocitidina se puede representar como C(F), 2'-desoxi-2'-fluoro-5-metilcitidina se puede representar como 5mC(F), 2'-desoxi-2'-fluorouridina se puede representar como U(F), y 2'-desoxi-2'-fluoro-5-metiluridina se puede representar como T(F). Un 2'-desoxi-2'-fluoronucleósido cuya base no se especifica puede representarse como N(F).

[Fórmula química 10]



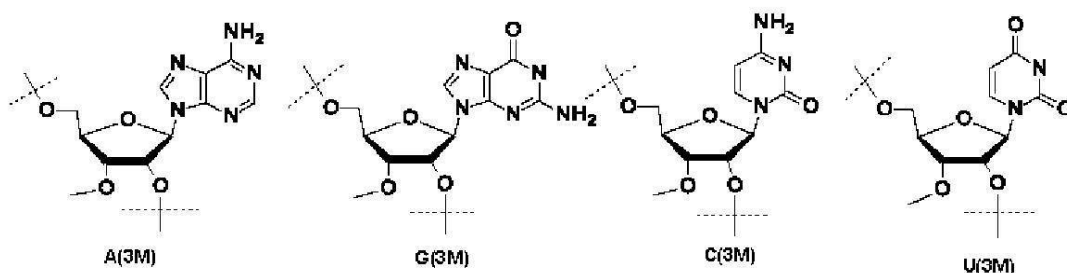
en donde la línea discontinua indica un punto de unión.

En la presente memoria descriptiva, el término "nucleósido modificado en 3'" se refiere a un nucleósido en el que la ribofuranosa contenida en el nucleósido se modifica químicamente en la posición 3'. El grupo hidroxilo en la posición 2' en el nucleósido modificado en 3' puede modificarse. Los ejemplos de una modificación relevante son nucleósidos 3'-O-alquilados (por ejemplo, metilados, etilados, propilados, isopropilados y butilados), nucleósidos 3'-O-alcoxialquilados (por ejemplo, metoxietilados, metoxipropilados y

metoxibutilados), nucleósidos 3'-halogenados (por ejemplo, clorados y fluorados), nucleósidos 3'-alilados, nucleósidos 3'-aminados, nucleósidos 3'-azidados, nucleósidos 3'-O-alilados, nucleósidos 3'-OCF₃, nucleósidos 3'-O(CH₂)₂SCH₃, nucleósidos 3'-O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), o nucleósidos 3'-O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n) (cada R_m y R_n son independientemente H, un grupo protector de amino, o un alquilo de C₁-C₁₀ sustituido o insustituido). El nucleósido modificado en 3' preferido es un nucleósido 3'-O-alquilado, un nucleósido 3'-O-alcoxialquilado o un nucleósido 3'-halogenado. Los nucleósidos descritos anteriormente y similares se pueden ejemplificar.

Los ejemplos de una modificación de 3'-O-alquilación de un nucleósido modificado en 3' incluyen 3'-O-metilnucleósido (a veces denominado "3'-OMe ARN"; el símbolo que representa una porción de azúcar es (3M)). El 3'-O-metilnucleósido correspondiente a cada base tiene una estructura representada por una de las siguientes fórmulas: La 3'-O-metiladenosina se puede representar como A(3M), la 3'-O-metilguanosina se puede representar como G(3M), la 3'-O-metilcitidina se puede representar como C(3M), la 3'-O-metil-5-metilcitidina se puede representar como 5mC(3M), la 3'-O-metiluridina se puede representar como U(3M) y la 3'-O-metil-5-metiluridina se puede representar como T(3M). Un 3'-O-metilnucleósido cuya base no se especifica puede representarse como N(3M).

[Fórmula química 11]



en donde la línea discontinua indica un punto de unión.

Los ejemplos de una modificación de 3'-O-alcoxialquilación incluyen 3'-O-metoxietilnucleósidos (a veces denominados "ARN 3'-MOE", "ARN 3'-O-metoxietilo" o "ARN 3'-metoxietoxi"; el símbolo que representa una porción de azúcar es (3m)). El 3'-O-metoxietilnucleósido correspondiente a cada base tiene una estructura en la que un grupo metoxietilo se une en lugar del grupo metilo unido al átomo de oxígeno en la posición 3' en la fórmula estructural del 3'-O-metilnucleósido correspondiente a cada base. Para el 3'-O-metoxietilnucleósido correspondiente a cada base, 3'-O-metoxietiladenosina se puede

representar como A(3m), 3'-O-metoxietilguanosina se puede representar como G(3m), 3'-O-metoxietil-5-metilcitidina se puede representar como C(3m) (escrito como C(3m) por conveniencia aunque la estructura de la base es 5C; 3'-O-metoxietilcitidina también se puede usar en reemplazo de 3'-O-metoxietil-5-metilcitidina), 3'-O-metoxietiluridina se puede
5 representar como U(3m), y 3'-O-metoxietil-5-metiluridina se puede representar como T(3m). Un 3'-O-metoxietilnucleósido cuya base no se especifica se puede representar como N(3m).

Los ejemplos de una modificación de halogenación en 3' incluyen 3'-desoxi-3' -fluoronucleósidos (a veces denominados "ARN 3'-F" o "ARN 3'-desoxi-3'-fluoro"; el símbolo que representa una porción de azúcar es (3F)). El 3'-desoxi-3'-fluoronucleósido
10 correspondiente a cada base tiene una estructura en la que un átomo de flúor se une en lugar del grupo metoxi unido al átomo de carbono en la posición 3' en la fórmula estructural del 3'-O-metilnucleósido correspondiente a cada base. Para el 3'-desoxi-3'-fluoronucleósido correspondiente a cada base, la 3'-desoxi-3'-fluoroadenosina se puede representar como A(3F), la 3'-desoxi-3'-fluoroguanosina se puede representar como G(3F), la 3'-desoxi-3'-
15 fluorocitidina se puede representar como C(3F), la 3'-desoxi-3' -fluoro-5-metilcitidina se puede representar como 5mC(3F), la 3'-desoxi-3' -fluorouridina se puede representar como U(3F), la 3'-desoxi-3' -fluoro-5-metiluridina se puede representar como T(3F). Un 3'-desoxi-3'-fluoronucleósido cuya base no se especifica puede representarse como N(3F).

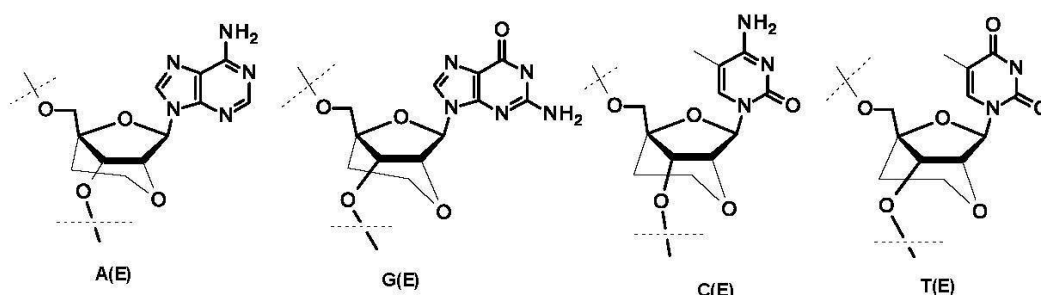
En la presente memoria descriptiva, el término "nucleósido modificado con 4'-tio" se
20 refiere a un nucleósido en el que el átomo de oxígeno en la posición 4' de una ribofuranosa contenida en el nucleósido se reemplaza por un átomo de azufre. Los ejemplos de un nucleósido 4'-tio-modificado pueden incluir β -D-ribonucleósidos en los que el átomo de oxígeno 4' se reemplaza por un átomo de azufre (Hoshika, S. et al. FEBS Lett. 579, p.3115-3118, (2005); Dande, P. et al. J. Med. Chem. 49, p.1624-1634 (2006); Hoshika, S. et al.
25 ChemBioChem. 8, p.2133-2138, (2007)).

En la presente memoria descriptiva, el término "nucleósido modificado con 4'-tio-2'" se refiere a un nucleósido en el que una ribofuranosa contenida en el nucleósido se modifica químicamente en la posición 2', y el átomo de oxígeno en la posición 4' de la ribofuranosa se reemplaza por un átomo de azufre. Los ejemplos del nucleósido modificado con 4'-tio-2'
30 pueden incluir nucleósidos modificados con 4'-tio-2' que contienen 2'-H o 2'-O-metilo (Matsugami, et al. Nucleic Acids Res. 36, 1805 (2008)).

Los ejemplos de una modificación de puente 2'-O,4'-C para el nucleósido modificado con azúcar incluyen nucleósidos con puente 2'-O,4'-C-etileno (a veces denominados "ENA" o

una "unidad ENA"; el símbolo que representa una porción de azúcar es (E)) (Morita, K. et al. Bioorg. Med. Chem. Lett., 12, p.73 (2002).; Morita, K. et al. Bioorg. Med. Chem., 11, p.2211 (2003).). El nucleósido con puente de 2'-O,4'-C-etileno correspondiente a cada base tiene una estructura representada por una de las siguientes fórmulas: La adenosina con puente de 2'-O,4'-C-etileno puede representarse como A(E), la guanosina con puente de 2'-O,4'-C-etileno puede representarse como G(E), la 5-metilcitidina con puente de 2'-O,4'-C-etileno puede representarse como C(E) (escrita como C(E) por conveniencia, aunque la estructura de la base es 5C; la citidina con puente de 2'-O,4'-C-etileno también puede usarse en reemplazo de la 5-metilcitidina con puente de 2'-O,4'-C-etileno), la uridina con puente de 2'-O,4'-C-etileno puede representarse como U(E) y la 5-metiluridina con puente de 2'-O,4'-C-etileno puede representarse como T(E). Un nucleósido con puente de 2'-O,4'-C-etileno cuya base no se especifica puede representarse como N(E).

[Fórmula química 12]

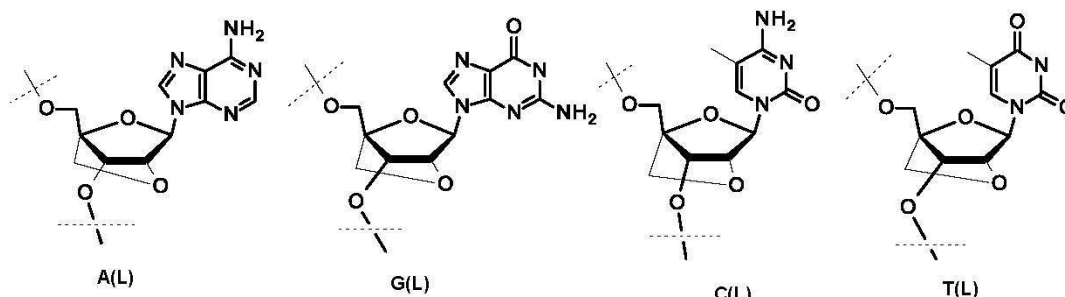


en donde la línea discontinua indica un punto de unión.

Otro ejemplo de una modificación de puente 2'-O,4'-C es, por ejemplo, un nucleósido con puente 2'-O,4'-C-metileno (a veces denominado "LNA" o una "unidad de LNA"; el símbolo que representa una porción de azúcar es (L)) (Obika, S. et al. Tetrahedron Lett., 38, p.8735- (1997).; Obika, S. et al., Tetrahedron Lett., 39, p.5401- (1998).; A. A. Koshkin, A. A. et al. Tetrahedron, 54, p.3607 (1998).; Obika, S. Bioorg. Med. Chem., 9, p.1001 (2001).). El nucleósido con puente de 2'-O,4'-C-metileno correspondiente a cada base tiene una estructura representada por una de las siguientes fórmulas: La adenosina con puente de 2'-O,4'-C-metileno puede representarse como A(L), la guanosina con puente de 2'-O,4'-C-metileno puede representarse como G(L), la 5-metilcitidina con puente de 2'-O,4'-C-metileno puede representarse como C(L) (escrita como C(L) por conveniencia, aunque la estructura de la base es 5C; la citidina con puente de 2'-O,4'-C-metileno también puede usarse en reemplazo de la 5-metilcitidina con puente de 2'-O,4'-C-metileno), la uridina con puente de 2

'-O,4'-C-metileno puede representarse como U(L) y la 5-metiluridina con puente de 2'-O,4'-C-metileno puede representarse como T(L). Un nucleósido con puente de 2'-O,4'-C-metileno cuya base no se especifica puede representarse como N(L).

[Fórmula química 13]

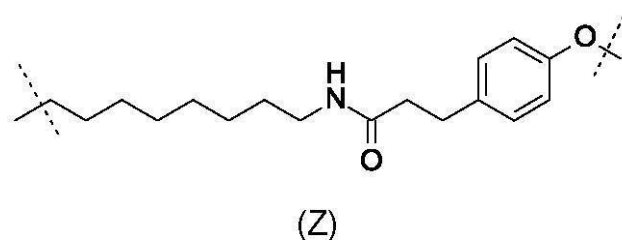


en donde la línea discontinua indica un punto de unión.

El oligonucleótido de la presente invención o una sal del mismo tiene una región de hebra antisentido (a veces denominada simplemente hebra antisentido) que tiene una secuencia de nucleótidos sustancialmente complementaria a la secuencia de nucleótidos de una secuencia diana, y una región de hebra homosentido (a veces denominada simplemente hebra homosentido) que tiene una secuencia de nucleótidos sustancialmente complementaria a la secuencia de nucleótidos de la región complementaria de la región de hebra antisentido. La región de hebra homosentido y la región de hebra antisentido forman una estructura de doble hebra en la secuencia de nucleótidos de la región complementaria, donde la región de hebra homosentido y la región de hebra antisentido son oligonucleótidos independientes y forman un oligonucleótido de doble hebra, o la posición 5' del nucleótido en el extremo 5' de una de la región de hebra homosentido y la región de hebra antisentido y la posición 3' (posición 2' en el caso de un nucleótido modificado en la posición 3') del nucleótido en el extremo 3' del otro puede conectarse para formar un oligonucleótido de hebra individual. Es decir, el oligonucleótido de la presente invención puede ser un oligonucleótido bimolecular o un oligonucleótido monomolecular. Cuando el oligonucleótido de la presente invención es un oligonucleótido monomolecular, la forma de conexión entre la región de hebra homosentido y la región de hebra antisentido no se limita siempre que el oligonucleótido de la presente invención tenga una acción de interferencia de ARN y/o una acción de supresión de la expresión génica. Los ejemplos de los mismos incluyen la conexión entre la posición 5' del nucleótido en el extremo 5' de una de la región de hebra homosentido y la región de hebra antisentido y la posición 3' (posición 2' en el caso de un nucleótido modificado en la posición

3') del nucleótido en el extremo 3' del otro a través de un ligador químico o ligador de oligonucleótido deseado. Los ejemplos de este ligador incluyen ligadores descritos en WO2012/074038, y preferentemente un ligador representado por la siguiente fórmula (Z). El ligador representado por la siguiente fórmula (Z) se puede ajustar adecuadamente de acuerdo con WO 2012/074038.

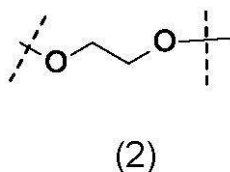
[Fórmula química 14]



en donde la línea discontinua representa un punto de unión, y significa que el átomo de oxígeno unido al grupo fenilo forma un enlace fosfodiéster con el grupo fosfato 5' del nucleótido en el extremo 5' de una región antisentido adyacente, y el grupo metileno en el otro extremo forma un enlace fosfodiéster con un grupo fosfato 3' (grupo fosfato en la posición 2' en el caso de un nucleótido modificado en la posición 3') del nucleótido en el extremo 3' de una región de hebra homosentido adyacente, y cada enlace fosfodiéster formado puede ser un enlace fosfodiéster modificado químicamente tal como un enlace fosforotioato.

El residuo en la posición 3'(posición 2' en el caso de un nucleótido modificado en la posición 3') del nucleótido en el extremo 3' y/o el residuo en la posición 5' del nucleótido en el extremo 5' puede ser un grupo hidroxilo o un grupo fosfato, o puede tener una estructura obtenida por modificación química del grupo hidroxilo o el grupo fosfato. Los ejemplos de la estructura obtenida por modificación química incluyen una estructura representada por la siguiente fórmula (2).

[Fórmula química 15]



en donde la línea discontinua representa un punto de unión, el punto de unión en un

lado significa que un átomo de oxígeno está unido a un nucleótido adyacente, donde el átomo de oxígeno forma un enlace fosfodiéster con el grupo 5'-fosfato cuando está unido al nucleótido en el extremo 5', y con el grupo 3'-fosfato (grupo 2'-fosfato en el caso de un nucleótido modificado en la posición 3') cuando está unido al nucleótido en el extremo 3', y el punto de unión en el otro lado significa que el átomo de oxígeno está unido a un átomo de hidrógeno para formar un grupo hidroxilo, y el enlace fosfodiéster formado puede ser un enlace fosfodiéster modificado químicamente tal como un enlace fosforotioato.

El término "secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica" en la presente memoria descriptiva incluye no solo una secuencia de nucleótidos que consiste en bases que son todas idénticas a las de una secuencia de nucleótidos de interés, sino también una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de 70% o más con una secuencia de nucleótidos de interés, y una secuencia de nucleótidos que contiene una o varias bases no idénticas, pero permite que los oligonucleótidos exhiban una función deseada. Aquí, el término "base idéntica" incluye una base totalmente idéntica a una base original, y una base equivalente o superior a una base original en su capacidad para formar un par de bases. Como tal base, por ejemplo, una base modificada químicamente, que es equivalente o superior a una base original en su capacidad para formar un par de bases, se considera idéntica a la base original (por ejemplo, C y 5C, o U y T(5U)). El término "identidad de secuencia" se refiere a una secuencia que tiene una identidad de preferentemente 80% o más, más preferentemente 90% o más, incluso más preferentemente 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, o un mal apareamiento en 3 bases, 2 bases o 1 base, con una secuencia de nucleótidos de interés. La identidad de una secuencia de nucleótidos se puede calcular usando un software de análisis génico conocido tal como BLAST (marca registrada).

La expresión "secuencia de nucleótidos sustancialmente complementaria" en la presente memoria descriptiva incluye no solo una secuencia de nucleótidos que consiste en nucleótidos que son todos complementarios a los de una secuencia de nucleótidos de interés, sino también una secuencia de nucleótidos en la que uno o varios (por ejemplo, cinco, cuatro, tres o dos) nucleótidos no son nucleótidos complementarios, pero la secuencia de nucleótidos permite que los oligonucleótidos formen un par de bases. En la presente memoria descriptiva, el término "base complementaria" se refiere a una base capaz de formar un par de bases de Watson-Crick a una base de interés, y la base puede ser una base no modificada, o una base modificada químicamente. Por ejemplo, 5-metiluracilo y adenina son bases complementarias entre sí, y 5-metilcitosina y guanina son bases complementarias entre sí.

El término "estructura de doble hebra" de oligonucleótidos en la presente memoria descriptiva significa que las secuencias de nucleótidos sustancialmente complementarias entre sí forman pares de bases Watson-Crick para dar una estructura con hebras dobles. Las secuencias de nucleótidos que forman una estructura de doble hebra pueden ser

5 secuencias de nucleótidos sustancialmente complementarias entre dos moléculas de oligonucleótidos diferentes, o secuencias sustancialmente complementarias en un oligonucleótido de hebra individual.

En la presente memoria descriptiva, el término "unidad estructural" se refiere a una unidad estructural química que imparte una función deseada a un oligonucleótido. Los

10 ejemplos de una función deseada impartida a un oligonucleótido incluyen una función de administración de un oligonucleótido a tejidos diana o células diana (también denominados tejidos diana o similares), y una función de mejora de la cinética de un oligonucleótido en el cuerpo. La unidad estructural se puede unir a un oligonucleótido mediante un método conocido y, por ejemplo, al proporcionar una estructura de amidito en la unidad estructural, la

15 unidad estructural se puede unir a la posición 3'(posición 2' en el caso de un nucleótido modificado en la posición 3') del nucleótido en el extremo 3' o la posición 5' del nucleótido en el extremo 5' del oligonucleótido. La capacidad de administración a tejidos diana o similares se puede impartir a un oligonucleótido al proporcionar una estructura para promover la administración a un tejido diana o similar, tal como un ligando, en la unidad estructural, y los

20 ejemplos de la estructura incluyen una unidad GalNAc para la administración a células hepáticas, y una unidad de ácido graso para la administración al hígado y tejidos musculares. En la presente memoria descriptiva, tal unidad estructural para impartir la capacidad de administración a los tejidos diana o similares se puede referir, en particular, como una "unidad para la administración".

25 2. ARNi-oligonucleótido

En la presente memoria descriptiva, el término "ARNi-oligonucleótido" se refiere a un oligonucleótido en el que nucleótidos sustancialmente complementarios contenidos en una región de hebra homosenrido y una región de hebra antisentido forman pares de bases de Watson-Crick, y el oligonucleótido contiene regiones complementarias que forman una

30 estructura de doble hebra, y tiene una acción de interferencia de ARN y/o una acción de supresión de la expresión génica en un gen diana. Siempre que el oligonucleótido tenga una acción de interferencia de ARN y/o una acción de supresión de la expresión génica en un gen diana, no se requieren todas las bases de la región complementaria contenida en el

oligonucleótido de iARN para formar un par de bases de Watson-Crick. En la presente memoria descriptiva, el iARN-oligonucleótido se puede referir como "ARNip".

En la presente memoria descriptiva, el término "secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a una secuencia diana" se refiere a una secuencia de nucleótidos idéntica a una secuencia diana, e incluye no solo una secuencia completamente idéntica a una secuencia diana, sino también una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a una secuencia diana siempre que el ARNi-oligonucleótido tenga una acción de interferencia de ARN y/o una acción supresora de la expresión génica en un gen diana.

En la presente memoria descriptiva, el término "secuencia de nucleótidos sustancialmente complementaria a una secuencia diana" se refiere a una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia diana, e incluye no solo una secuencia completamente complementaria a una secuencia diana, sino también una secuencia de nucleótidos sustancialmente complementaria a una secuencia diana siempre que el ARNi-oligonucleótido tenga una acción de interferencia de ARN y/o una acción de supresión de la expresión génica en un gen diana.

El oligonucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos sustancialmente complementaria a una secuencia diana y que tiene una acción de interferencia de ARN y/o una acción de supresión de la expresión génica en un gen diana se refiere a un oligonucleótido de iARN para un gen diana.

La secuencia de nucleótidos del oligonucleótido de iARN para un gen diana no se limita siempre que el oligonucleótido tenga una acción de interferencia de ARN y/o una acción de supresión de la expresión génica en el gen diana. Se puede determinar sobre la base de secuencias que se predice que tienen una acción de interferencia de ARN y/o una acción de supresión de la expresión génica en el gen diana usando, por ejemplo, software informático (por ejemplo, GENETYX (marca registrada): fabricado por GENETYX CORPORATION). También es posible realizar la determinación confirmando adicionalmente la acción de interferencia de ARN y/o la acción de supresión de la expresión génica del oligonucleótido de iARN preparado en función de las secuencias seleccionadas.

En la presente memoria descriptiva, la acción de supresión de la expresión génica incluye no solo una acción de supresión completa de la expresión de un gen, sino también una acción de reducción de la expresión de un gen en comparación con un control, y la acción de supresión de la expresión génica también incluye silenciamiento génico. En la presente

memoria descriptiva, el término "acción supresora de la expresión génica" y el término "actividad supresora de la expresión génica" se usan indistintamente entre sí.

La acción de interferencia de ARN y/o la acción de supresión de la expresión génica se pueden confirmar mediante un método que normalmente se lleva a cabo por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una proteína que es un producto traducido de un gen diana se cuantifica después de un cierto período de tiempo después de la administración de un iARN-oligonucleótido para el gen diana a células en las que el gen diana se expresa mediante análisis de transferencia Western, y el nivel de expresión de la proteína se compara con el de un control para confirmar la acción de interferencia de ARN y/o la acción de supresión de la expresión génica. También es posible confirmar la acción de interferencia de ARN y/o la acción de supresión de la expresión génica midiendo el nivel de expresión del gen diana en tiempo real mediante un método de PCR en tiempo real después de la administración del iARN-oligonucleótido para el gen diana al gen diana.

En la presente memoria descriptiva, el término "secuencia diana" significa una secuencia de 18 o más nucleótidos de cualquier parte de una secuencia de nucleótidos de ARNm para un gen que codifica para el receptor de transferrina 2, es decir, un gen diana, que es dirigido por el iARN-oligonucleótido de la presente invención. Cuando se sabe que la secuencia diana tiene SNP o similares, la secuencia diana también incluye una secuencia que tiene esta variación. En el oligonucleótido de iARN de la presente invención, al menos una parte de la región de hebra antisentido incluye una secuencia sustancialmente complementaria a una secuencia diana (en lo sucesivo, una "secuencia coincidente con la diana").

En la presente memoria descriptiva, el término "región complementaria" significa regiones en las que las secuencias de nucleótidos de la región de hebra homosentido y la región de hebra antisentido contenidas en el oligonucleótido de iARN son sustancialmente complementarias entre sí. La región de hebra homosentido y la región de hebra antisentido no son necesariamente completamente complementarias en sus regiones complementarias, pero al menos las bases terminales en las regiones complementarias son complementarias entre sí. En el oligonucleótido de iARN de la presente invención, la región complementaria de la región de hebra antisentido incluye una secuencia coincidente con la diana, y puede mantener la complementariedad con la región de hebra homosentido en regiones obtenidas extendiendo adicionalmente el extremo 5'y/o el extremo 3' de la región complementaria.

La longitud de hebra de la secuencia coincidente con la diana en la región de hebra

antisentido que forma el oligonucleótido de iARN de la presente invención no está limitada siempre que el oligonucleótido tenga una acción de interferencia de ARN y/o una acción de supresión de la expresión génica. Puede ser cualquier longitud que sea igual o mayor que 18 nucleótidos e igual o menor que la longitud completa del marco de lectura abierto (ORF) de un gen diana. Por ejemplo, la longitud de hebra de la secuencia coincidente con la diana puede ser de 19 a 29 nucleótidos, y es preferentemente de 18 a 24, 18 a 23, o 18 a 22, más preferentemente 18 a 21, e incluso más preferentemente 18 o 19.

La longitud de hebra de la región complementaria en cada una de la región de hebra homosentido y la región de hebra antisentido que forman el oligonucleótido de iARN de la presente invención no está limitada siempre que el oligonucleótido tenga una acción de interferencia de ARN y/o una acción de supresión de la expresión génica. Puede ser de cualquier longitud. Por ejemplo, la longitud de hebra de la *región* diana puede ser de 19 a 29 nucleótidos, y es preferentemente de 19 a 24, 19 a 23, o 19 a 22, más preferentemente 19 a 21, e incluso más preferentemente 19.

La longitud de hebra de cada una de la región de hebra homosentido y la región de hebra antisentido que forman el iARN-oligonucleótido en la presente invención no está limitada siempre que el oligonucleótido tenga una acción de interferencia de ARN y/o una acción de supresión de la expresión génica. Puede ser de cualquier longitud. La longitud de hebra de la región de hebra homosentido puede ser, por ejemplo, 19 a 39 nucleótidos, y es preferentemente 19 a 29, más preferentemente 19 a 24, 19 a 23, o 19 a 22, incluso más preferentemente 19 a 21, y lo más preferentemente 19. La longitud de hebra de la región de hebra antisentido puede ser, por ejemplo, de 19 a 39 nucleótidos, y es preferentemente de 19 a 29, más preferentemente de 19 a 24, de 19 a 23, o de 19 a 22, incluso más preferentemente de 21 a 23, y lo más preferentemente 21.

En el iARN-oligonucleótido de la presente invención, cuando la región de hebra homosentido y la región de hebra antisentido están presentes en diferentes moléculas de oligonucleótido, no se requiere que el oligonucleótido tenga una estructura de doble hebra en su conjunto, y puede tener una estructura saliente en la que una parte de los nucleósidos en los extremos 5' y/o 3' sobresale, o no se forma una estructura de doble hebra. Los ejemplos de la estructura saliente incluyen estructuras que consisten en, por ejemplo, 1 a 5 nucleósidos, preferentemente 1 a 3 nucleósidos, y más preferentemente 2 nucleósidos. La estructura saliente puede estar presente en uno o ambos de los extremos del oligonucleótido de hebra doble. En la presente memoria descriptiva, la estructura saliente puede expresarse

representando el extremo 5' de la región de hebra homosentido como S_{O5}, el extremo 3' de la región de hebra homosentido como S_{O3}, el extremo 5' de la región de hebra antisentido como A_{O5} y el extremo 3' de la región de hebra antisentido como A_{O3}. La secuencia de nucleótidos de la estructura saliente no se limita. Se pueden usar Oligo T u oligo U.

5 El iARN-oligonucleótido tiene al menos una propiedad seleccionada de las siguientes (i) a (iv):

(i) el oligonucleótido tiene una acción de interferencia de ARN y/o una acción de supresión de la expresión génica en un gen diana;

10 (ii) el oligonucleótido es estable contra una ribonucleasa, y tiene una acción de interferencia de ARN y/o una acción de supresión de la expresión génica en un gen diana;

(iii) el oligonucleótido es estable contra una exonucleasa y tiene una acción de interferencia de ARN y/o una acción de supresión de la expresión génica en un gen diana; y

15 (iv) el oligonucleótido es estable contra una ribonucleasa y una exonucleasa, y tiene una acción de interferencia de ARN y/o una acción de supresión de la expresión génica en un gen diana.

Un ejemplo del iARN-oligonucleótido se deriva de un oligonucleótido de doble hebra que tiene una región de hebra antisentido para un gen diana, y una región de hebra homosentido que tiene una secuencia de nucleótidos sustancialmente complementaria a la región de hebra antisentido, donde la posición 5' del nucleótido en el extremo 5' de la región de hebra antisentido y la posición 3' (posición 2' en el caso de un nucleótido modificado en la posición 3') del nucleótido en el extremo 3' de la región de hebra homosentido pueden unirse a través de un ligador que forma un enlace fosfodiéster que puede modificarse químicamente en cada extremo. Los ejemplos del oligonucleótido pueden incluir oligonucleótidos que forman la estructura del oligonucleótido 3'-P(=O)(OH)-[ligador]-P(=O)(OH)-5'-oligonucleótido [en la presente, "oligonucleótido 3'" indica una estructura en la que el átomo de hidrógeno en el grupo hidroxilo no está presente en la posición 3' (posición 2' en el caso de un nucleótido modificado en la posición 3') del nucleótido en el extremo 3' del oligonucleótido, y "5'-oligonucleótido" indica una estructura en la que el átomo de hidrógeno en el grupo hidroxilo no está presente en la posición 5' del nucleótido en el extremo 5' del oligonucleótido]. Este ligador se describe, por ejemplo, en WO 2012/074038 y similares, y se puede sintetizar mediante referencia a las descripciones en ese documento.

20

25

30

Un nucleósido que forma el ARNi-oligonucleótido puede ser un nucleósido natural, o se puede utilizar un nucleósido modificado con azúcar. El enlace entre nucleósidos es un enlace fosfodiéster que puede modificarse químicamente. Por ejemplo, se puede seleccionar adecuadamente un enlace fosfodiéster o un enlace fosforotioato.

5 El iARN-oligonucleótido de la presente invención puede suprimir la expresión del ARNm de TfR2. El ARNi-oligonucleótido de la presente invención tiene baja toxicidad para las células y se puede usar de forma segura en un producto farmacéutico. El ARNi-oligonucleótido de la presente invención, que suprime la expresión de ARNm de TfR2, puede suprimir así la producción de hepcidina que juega un papel clave en el metabolismo del hierro.

10 El ARNi-oligonucleótido de la presente invención, que suprime la expresión del ARNm de TfR2, puede aumentar así la concentración de hierro en plasma y/o la concentración de HGB. Aunque el mecanismo de acción no está limitado, el ARNi-oligonucleótido de la presente invención se puede usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad que se puede tratar o prevenir mediante la supresión de la expresión de ARNm de TfR2 y/o la producción

15 de hepcidina. Los ejemplos de la enfermedad incluyen anemia. Aunque el mecanismo de acción no está limitado, el iARNoligonucleótido de la presente invención permite tratar o prevenir la anemia, por ejemplo, aumentando la concentración de HGB. El iARN-oligonucleótido de la presente invención puede reducir la frecuencia y/o la cantidad de transfusión de células sanguíneas a un paciente con anemia que necesita transfusión de

20 células sanguíneas. Por ejemplo, la frecuencia y/o la cantidad de transfusión de células sanguíneas a un paciente con anemia durante un período de tiempo determinado (por ejemplo, 1 día, 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 8 semanas, 12 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses o 1 año) puede reducirse en aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente

25 80%, aproximadamente 90% o aproximadamente 100%.

La presente invención proporciona invenciones para uso médico, que incluyen una composición farmacéutica para usarse en el tratamiento o prevención de anemia, que comprende el ARNi-oligonucleótido de la presente invención como un ingrediente activo, un método para tratar o prevenir anemia, que comprende administrar una cantidad efectiva del

30 oligonucleótido, el oligonucleótido para usarse en el tratamiento o prevención de anemia, y el uso del ARNi-oligonucleótido de la presente invención en la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de anemia. La anemia que se puede tratar o prevenir mediante el ARNi-oligonucleótido de la presente invención incluye, por ejemplo, anemia asociada con inflamación crónica (anemia de enfermedad crónica (ACD)), anemia

asociada con disfunción de la médula ósea, anemia por deficiencia de hierro, anemia por deficiencia de hierro refractaria al hierro (IRIDA), anemia resistente a un agente estimulante de la eritropoyetina (ESA), anemia inducida por quimioterapia, anemia aplásica, anemia de Diamond-Blackfan y anomalía hereditaria de la hemoglobina tal como β talasemia y enfermedad de células falciformes. La anemia asociada con inflamación crónica incluye, por ejemplo, anemia asociada con enfermedad autoinmunitaria tal como reumatismo articular, eritematosa sistémica o anemia hematólítica autoinmunitaria, anemia asociada con enfermedad infecciosa, anemia asociada con enfermedad entérica inflamatoria tal como colitis inflamatoria, anemia asociada con insuficiencia cardíaca, anemia asociada con enfermedad renal crónica, anemia cancerosa, anemia asociada con síndrome de activación de macrófagos y anemia asociada con enfermedad de Castleman. La anemia asociada con la enfermedad renal crónica incluye, por ejemplo, enfermedad renal que implica diabetes, enfermedad renal que implica hipertensión, síndrome nefrótico (por ejemplo, síndrome nefrótico congénito del tipo finlandés, esclerosis mesangial difusa, síndrome nefrótico de lesión mínima, glomeruloesclerosis focal segmentaria, nefropatía membranosa y síndrome de Galloway-Mowat), enfermedad renal que implica glomerulonefritis crónica (por ejemplo, nefropatía por IgA, glomerulonefritis proliferativa mesangial, glomerulonefritis membranoproliferativa, nefritis de la púrpura, nefritis de la membrana basal antiglomerular (síndrome de Goodpasture), síndrome de Alport, síndrome de Epstein, nefritis por lupus, poliangeítis microscópica, síndrome urémico hemolítico atípico, síndrome de la patela ungueal, nefropatía por fibronectina y glomerulopatía por lipoproteína), enfermedad renal que implica nefritis tubulointersticial crónica, enfermedad renal que implica pielonefritis crónica, enfermedad renal que implica depósito de amiloide, enfermedad renal tubulointersticial autosómica dominante, enfermedad renal que implica nefronoptosis y enfermedad renal con malformación renal (por ejemplo, poliquistosis renal). La anemia cancerosa incluye, por ejemplo, anemia asociada con cáncer tal como mieloma múltiple, leucemia aguda, leucemia crónica, cáncer de pulmón o cáncer de mama. La anemia asociada con disfunción de la médula ósea incluye, por ejemplo, anemia asociada con mielofibrosis, anemia asociada con síndrome mielodisplásico, anemia asociada con leucemia mielomonocítica crónica (CMML), anemia asociada con mielosupresión quimioterapéutica, anemia aplásica, anemia de Diamond-Blackfan y anemia de Fanconi.

El ARNi-oligonucleótido de la presente invención se puede usar preferiblemente en el tratamiento o prevención de anemia asociada con inflamación crónica y anemia asociada con disfunción de la médula ósea, y se puede usar más preferiblemente en el tratamiento o prevención de anemia asociada con enfermedad autoinmunitaria tal como reumatismo

articular, eritematosa sistémica o anemia hematólica autoinmunitaria, anemia asociada con enfermedad infecciosa, anemia asociada con enfermedad entérica inflamatoria tal como colitis inflamatoria, anemia asociada con insuficiencia cardíaca, anemia asociada con enfermedad renal crónica, anemia cancerosa, anemia asociada con enfermedad de Castleman, anemia asociada con mielofibrosis, anemia asociada con síndrome mielodisplásico, anemia asociada con leucemia mielomonocítica crónica y anemia asociada con mielosupresión quimioterapéutica.

En la presente memoria descriptiva, el término "uso combinado" significa que dos o más agentes farmacológicos diferentes se administran simultáneamente, por separado o secuencialmente. La presente invención proporciona un método para tratar o prevenir la anemia, que comprende usar el ARNi-oligonucleótido de la presente invención en combinación con uno o más agentes farmacológicos diferentes. El ARNi-oligonucleótido de la presente invención se puede usar en combinación con uno o más de otros agentes farmacológicos siempre que se muestre el efecto de la presente invención. Preferentemente, el uso del ARNi-oligonucleótido de la presente invención en combinación con otros agentes farmacológicos que tienen un mecanismo de acción diferente sobre los síntomas anémicos puede proporcionar un mayor efecto terapéutico. Por ejemplo, para el síndrome mielodisplásico (MDS), se puede prescribir un agente farmacológico tal como un agente estimulante de la eritropoyesis (ESA) que tiene un mecanismo de acción de promoción de la proliferación de eritrocitos para tratar la anemia o luspatercept que tiene un mecanismo de acción de promoción de la diferenciación de eritrocitos para tratar la anemia, o un agente farmacológico tal como azacitidina que tiene un mecanismo de acción de supresión de la metilación del ADN y destrucción y lesión de células anormales, y este agente farmacológico y ARNi de TfR2 tienen diferentes mecanismos de acción. Por lo tanto, el uso combinado de este agente farmacológico y ARNi de TfR2 puede proporcionar un efecto terapéutico mayor que el de un agente individual en MDS. Para la anemia asociada con la enfermedad renal crónica, se puede prescribir un agente farmacológico tal como esa o un inhibidor del factor inducible por hipoxia proilil hidroxilasa (HIFPHD) que tenga un mecanismo de acción para promover la proliferación de eritrocitos para tratar la anemia, y este agente farmacológico y ARNi de TfR2 tienen diferentes mecanismos de acción. Por lo tanto, el uso combinado de este agente farmacológico y ARNi de TfR2 puede proporcionar un efecto terapéutico mayor que el de un agente individual sobre la anemia asociada con enfermedad renal crónica. Para la mielofibrosis, se sabe que ruxolitinib tiene un efecto terapéutico principalmente sobre síntomas tal como la esplenomegalia (N Engl J Med 2012; 366: 799-807). Sin embargo, se sabe que el agente farmacológico tiene un efecto limitado o ningún efecto sobre los síntomas

anémicos, o empeora la anemia (Journal of Hematology & Oncology 2013, 6: 79). Para el mecanismo en el que ruxolitinib empeora la anemia, se considera que las señales de ePO necesarias para la proliferación de células eritrocíticas se suprimen mediante la inhibición de JAK2. Sin embargo, dado que ruxolitinib tiene un cierto efecto terapéutico sobre los síntomas
5 distintos de la anemia en la mielofibrosis, el uso combinado de ruxolitinib y ARNi de TfR2 puede proporcionar un efecto terapéutico beneficioso sobre la anemia en la mielofibrosis. El uso en combinación con un inhibidor de JAK2 que no sea ruxolitinib también puede proporcionar un efecto terapéutico beneficioso sobre la anemia en la mielofibrosis. Ejemplos del otro inhibidor de JAK2 incluyen fedratinib, pacritinib y momelotinib.

10 Cuando el ARNi-oligonucleótido de la presente invención se usa en combinación con otros agentes farmacológicos, el momento de la administración del ARNi-oligonucleótido de la presente invención no se limita siempre que se muestre el efecto de la presente invención. Se puede administrar simultáneamente con el otro agente farmacológico, o se puede administrar antes o después de la administración del otro agente farmacológico. Los
15 ejemplos del agente farmacológico que se puede usar en combinación con el ARNi-oligonucleótido de la presente invención incluyen otros fármacos para tratar la anemia, o fármacos para tratar una enfermedad que provoca anemia. Los ejemplos del otro fármaco para tratar la anemia incluyen ESA, un inhibidor de la factor proil hidroxilasa inducible por hipoxia (HIFPHD), un suplemento de hierro oral, un suplemento de hierro intravenoso, danazol y luspatercept. Ejemplos de ESA incluyen epoetina alfa, epoetina beta, epoetina beta pegol,
20 epoetina kappa o darbepoetina alfa. Los ejemplos de un inhibidor de HIFPHD incluyen roxadustat, vadadustat, daprodustat, enarodustat y molidustat. Los ejemplos de un suplemento de hierro oral incluyen citrato ferroso, citrato férrico, fumarato ferroso, pirofosfato férrico soluble y sulfuro de hierro seco. Los ejemplos de un suplemento intravenoso de hierro
25 incluyen carboximaltosa férrica y óxido de hierro que contiene azúcar. Los ejemplos de un fármaco para tratar una enfermedad que provoca anemia incluyen un fármaco para tratar la mielofibrosis, un fármaco para tratar el síndrome mielodisplásico, un fármaco para tratar la enfermedad renal crónica o un agente anticáncer. Los ejemplos de un fármaco para tratar la mielofibrosis incluyen un inhibidor de JAK2. Los ejemplos de un inhibidor de JAK2 incluyen
30 ruxolitinib, fedratinib, pacritinib y momelotinib. Se prefiere su uso en combinación con ruxolitinib. Los ejemplos de un fármaco para tratar el síndrome mielodisplásico incluyen azacitidina y lenalidomida. Se prefiere su uso en combinación con azacitidina o lenalidomida. Los ejemplos de un fármaco para tratar la enfermedad renal crónica incluyen un inhibidor de SGLT2 (cotransportador de glucosa de sodio 2), un inhibidor del sistema renina-angiotensina
35 (por ejemplo, un antagonista del receptor de angiotensina II (ARB) y un inhibidor de la enzima

convertidora de angiotensina (ACE)), un antagonista de calcio, un fármaco diurético, un fármaco para tratar la diabetes, un fármaco para tratar la hiperlipidemia, un esteroide o un fármaco inmunosupresor. Los ejemplos de un agente anticancerígeno incluyen un fármaco quimioterapéutico. Los ejemplos de un fármaco quimioterapéutico incluyen cisplatino, carboplatino, doxorubicina, paclitaxel y amrubicina.

El ARNi-oligonucleótido de la presente invención se puede usar en combinación con un fármaco para tratar el trastorno por sobrecarga de hierro. Cuando se realiza una transfusión de células sanguíneas para el tratamiento de la anemia, se puede desarrollar un trastorno por sobrecarga de hierro debido a la transfusión frecuente de células sanguíneas.

El trastorno por sobrecarga de hierro es una condición patológica provocada por la acumulación de hierro derivado de células sanguíneas transfundidas en tejidos del hígado o del corazón, y puede producir insuficiencia hepática, insuficiencia cardíaca, diabetes, dolor articular, hipotiroidismo, pérdida de la función hipofisaria, disfunción sexual o similares. Por lo tanto, un fármaco para tratar el trastorno de sobrecarga de hierro se puede usar para tratar o prevenir el trastorno de sobrecarga de hierro en el tratamiento de la anemia, y se puede usar preferiblemente en combinación con el ARNi-oligonucleótido de la presente invención. Los ejemplos de un fármaco para tratar el trastorno por sobrecarga de hierro incluyen un agente quelante de hierro, y los ejemplos de un agente quelante de hierro incluyen Deferasirox, Deferoxamina y Deferiprona.

3. S3M-oligonucleótido

La presente invención proporciona un iARN-oligonucleótido (en lo sucesivo, también denominado "S3M-oligonucleótido") o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en el que una región de hebra homosentido consiste en un oligonucleótido representado por la siguiente fórmula (I), una región de hebra antisentido consiste en un oligonucleótido representado por la siguiente fórmula (II), y el iARN-oligonucleótido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene las siguientes características (a) a (g):

región de hebra de homosentido: 5' S₀₅-S_a-S₁₉-S₁₈-S₁₇-S₁₆-S₁₅-S₁₄-S₁₃-S₁₂-S₁₁-S₁₀-S₉-S₈-S₇-S₆-S₅-S₄-S₃-S₂-S₁-S₀₃ 3' (I)

región de hebra antisentido: 5' A₀₅-A₁-A₂-A₃-A₄-A₅-A₆-A₇-A₈-A₉-A₁₀-A₁₁-A₁₂-A₁₃-A₁₄-A₁₅-A₁₆-A₁₇-A₁₈-A₁₉-A_a-A₀₃ 3' (II)

(a) S₁ a S₁₉ representan cada uno un nucleósido, S₁ es un nucleósido modificado en

3', S_a es 0 a 10, preferentemente 0 a 5 o 0 a 4, y más preferentemente 0 a 3, 0 a 2, o 0 a 1 nucleósidos, S_{O3} y S_{O5} son cada uno independientemente 0 a 5, preferentemente 0 a 4, y más preferentemente 0 a 3, 0 a 2, o 0 a 1 nucleósidos, y cada enlace entre nucleósidos representa un enlace fosfodiéster que puede estar modificado químicamente;

5 (b) A_1 a A_{19} representan un nucleósido, al menos uno de A_{11} , A_{12} , A_{13} , A_{14} y A_{15} es ADN, ARN, un nucleósido con puente 2'-O,4'-C, o ARN 2'-MOE, A_a es 0 a 10, preferentemente 0 a 5 o 0 a 4, y más preferentemente 0 a 3, 0 a 2, o 0 a 1 nucleósidos, A_{O3} y A_{O5} son cada uno independientemente 0 a 5, preferentemente 0 a 4, y más preferentemente 0 a 3, 0 a 2, o 0 a 1 nucleósidos, y cada enlace entre nucleósidos representa un enlace fosfodiéster que puede
10 estar modificado químicamente;

(c) la secuencia de nucleótidos entre A_2 y A_a consiste en una secuencia de nucleótidos sustancialmente complementaria a una secuencia diana (secuencia coincidente diana), A_1 es un nucleósido que tiene una base complementaria a un nucleósido correspondiente de la secuencia diana, un nucleósido que tiene adenina, un nucleósido que tiene timina o un
15 nucleósido que tiene uracilo, y cuando A_{O3} y A_{O5} están presentes, las secuencias de nucleótidos de las mismas son cada una independientemente una secuencia de nucleótidos seleccionada independientemente del nucleósido correspondiente de la secuencia diana;

(d) la secuencia de nucleótidos entre S_1 y S_a y la secuencia de nucleótidos entre A_1 y A_a son regiones complementarias que consisten en secuencias de nucleótidos
20 sustancialmente complementarias entre sí, y forman una estructura de doble hebra;

(e) cuando tanto S_{O5} como A_{O3} están presentes, S_{O5} y A_{O3} son nucleósidos no complementarios entre sí;

(f) cuando tanto S_{O3} como A_{O5} están presentes, S_{O3} y A_{O5} son nucleósidos no complementarios entre sí; y

25 (g) la región de hebra homosentido y/o la región de hebra antisentido pueden modificarse químicamente en la posición 5' del nucleósido en el extremo 5' y/o la posición 3' del nucleósido en el extremo 3', o la posición 2' del mismo en el caso donde el nucleósido en el extremo 3' sea un nucleósido modificado en 3'.

3-1. Región de la hebra homosentido

30 La región de la hebra homosentido del oligonucleótido S3M se refiere a una región

representada por la fórmula anterior (I), es decir, S_{O5} a S_{O3} . La región complementaria en la región de hebra homosentido del oligonucleótido S3M se representa como S_1 a S_{19} numerada en el orden indicado desde el nucleósido en el extremo 3', y S_a ubicada en el lado 5' de la región complementaria. Es decir, la región complementaria en la hebra homosentido del oligonucleótido S3M es la región S_1 a S_a en la fórmula anterior (I). S_1 a S_{19} representan cada uno un nucleósido, y S_a representa 0 a 5, preferentemente 0 a 4, y más preferentemente 0 a 3, 0 a 2, o 0 a 1 nucleósidos. Entre las estructuras sobresalientes de la región de hebra homosentido, una estructura sobresaliente adicionada en el extremo 5' se representa como S_{O5} , y una estructura sobresaliente adicionada en el extremo 3' se representa como S_{O3} , y S_{O5} y S_{O3} representan cada uno 0 a 5, preferentemente 0 a 4, y más preferentemente 0 a 3, 0 a 2, o 0 a 1 nucleósidos.

El oligonucleótido S3M se caracteriza porque el nucleósido ubicado en el extremo 3' de la región complementaria en la región de la hebra homosentido (es decir, S_1 en la fórmula (I) anterior) es un nucleósido modificado en 3'. El nucleósido modificado en 3' no se limita siempre y cuando el oligonucleótido S3M tenga una acción de interferencia de ARN y/o una acción de supresión de la expresión génica. Es preferentemente ARN 3'-desoxi-3'-fluoro (ARN 3'-F), ARN 3'-OMe o ARN 3'-MOE, y más preferentemente ARN 3'-OMe. El residuo en la posición 2' del nucleósido modificado en 3' puede ser un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi opcionalmente modificado (preferentemente, un grupo metoxi, un grupo etoxi o un grupo metoxietoxi), o un grupo fosfato opcionalmente modificado (preferentemente, grupo tiofosfato, grupo ditiofosfato, grupo metilfosfato o grupo etilfosfato), y puede estar unido a la posición 5' del nucleósido de la estructura saliente (es decir, S_{O3} en la fórmula (I) anterior), o puede estar unido a una estructura ligadora. Preferiblemente, el residuo en la posición 2' es un grupo hidroxilo.

Los nucleósidos distintos de S_1 en la región complementaria en la región de hebra homosentido del oligonucleótido S3M no están limitados. Se pueden adoptar diversos nucleósidos naturales o nucleósidos modificados con azúcar. Son preferiblemente, cada uno independientemente, ARN 2'-OMe, ARN 2'-F o ADN.

Un aspecto de la región complementaria en la región de hebra homosentido del oligonucleótido S3M es tal que al menos uno de los 11°, 12°, 13° y 15° nucleósidos del extremo 3' (es decir, S_{11} , S_{12} , S_{13} y S_{15} en la fórmula (I) anterior) es ARN 2'-F, y otros nucleósidos son ARN 2'-OMe, ARN 2'-F, ADN o una combinación de los mismos. Preferentemente, todos los S_{11} , S_{12} , S_{13} y S_{15} son ARN 2'-F.

Un aspecto preferido de la región complementaria en la región de hebra homosentido del oligonucleótido S3M es que los nucleósidos de S₂ a S₁₀, S₁₄, S₁₆ a S₁₉ y S_a de la región complementaria en la región de hebra homosentido son cada uno independientemente ARN 2'-OMe, ARN 2'-F, ADN, o un patrón de modificación en el que dos seleccionados de los mismos están dispuestos alternativamente, y más preferiblemente ARN 2'-OMe, ADN, o un patrón de modificación en el que dos seleccionados de los mismos están dispuestos alternativamente. Más preferiblemente, todos esos nucleósidos son ARN 2'-OMe. El número de nucleósidos en S a puede seleccionarse adecuadamente entre 0 y 10, y desde el lado 3' del mismo, los nucleósidos pueden disponerse en el orden de S₂₀, S₂₁, S₂₂, S₂₃, S₂₄, S₂₅, S₂₆, S₂₇, S₂₈ y S₂₉ según sea necesario.

La secuencia de nucleótidos de la región complementaria en la región de hebra homosentido del oligonucleótido S3M (es decir, S₁ a S_a en la fórmula anterior (I)) es sustancialmente complementaria a la región complementaria en la región antisentido (es decir, A₁ a A_a en la fórmula anterior (II)).

La región de hebra homosentido del oligonucleótido S3M puede tener estructuras sobresalientes en el extremo 3' y/o el extremo 5' de la región complementaria de la misma (es decir, S_{O3} y S_{O5} en la fórmula anterior (I)). S_{O3} y S_{O5} representan cada uno independientemente de 0 a 5 (preferentemente, 4, 3, 2, 1 o 0) nucleósidos, y los nucleósidos son cada uno independientemente ARN 2'-OMe, ARN ADN 2'-F o nucleósido modificado por puente 2'-O,4'-C. Preferentemente, S_{O3} y S_{O5} no están presentes.

Cuando están presentes S_{O3} y S_{O5}, la base de los mismos no se limita siempre que se muestre una función como un saliente. De manera preferente es oligo U u oligo T.

Las siguientes fórmulas (Ia) a (Ic) muestran ejemplos del patrón de modificación de la región de hebra homosentido del oligonucleótido S3M:

5'S_{O5}(N(M))-S_a(N(M)-N(M))-S₁₉(N(M))-S₁₈(N(M))-S₁₇(N(M))-S₁₆(N(M))-S₁₅(N(F))-S₁₄(N(M))-S₁₃(N(F))-S₁₂(N(F))-S₁₁(N(F))-S₁₀(N(M))-S₉(N(M))-S₈(N(M))-S₇(N(M))-S₆(N(M))-S₅(N(M))-S₄(N(M))-S₃(N(M))-S₂(N(M))-S₁(N(3M))-2'H 3'(Ia)

5'S_a(N(M))-S₁₉(N(M))-S₁₈(N(M))-S₁₇(N(M))-S₁₆(N(M))-S₁₅(N(F))-S₁₄(N(M))-S₁₃(N(F))-S₁₂(N(F))-S₁₁(N(F))-S₁₀(N(M))-S₉(N(M))-S₈(N(M))-S₇(N(M))-S₆(N(M))-S₅(N(M))-S₄(N(M))-S₃(N(M))-S₂(N(M))-S₁(N(3M))-2'H 3'(Ib)

5'S₁₉(N(M))-S₁₈(N(M))-S₁₇(N(M))-S₁₆(N(M))-S₁₅(N(F))-S₁₄(N(M))-S₁₃(N(F))-S₁₂(N(F))-

$S_{11}(N(F))-S_{10}(N(M))-S_9(N(M))-S_8(N(M))-S_7(N(M))-S_6(N(M))-S_5(N(M))-S_4(N(M))-S_3(N(M))-S_2(N(M))-S_1(N(3M))-2'H\ 3'(Ic)$

en donde (N(M)) representa ARN 2'-OMe, (N(F)) representa ARN 2'-F y (N(3M)) representa ARN 3'-OMe. $S_{O5}(N(M))$ y $S_a(N(M))$ representan un nucleósido que consiste en 0 a 3 ARN 2'-OMe. Dos enlaces entre nucleósidos en tres nucleósidos de cada uno de los terminales 5'y 3' de cada oligonucleótido son enlaces fosforotioato, y otros enlaces entre nucleósidos son enlaces fosfodiéster. Es decir, cada oligonucleótido tiene un total de cuatro enlaces de fosforotioato con dos enlaces de fosforotioato en cada uno del extremo 3' y el extremo 5'.

10 3-2. Región de hebra antisentido

La región de hebra antisentido del oligonucleótido S3M se refiere a una región representada por la fórmula anterior (II), es decir, A_{O5} a A_{O3} . La región complementaria en la región de la hebra antisentido del oligonucleótido S3M se representa como A_1 a A_{19} numerada en el orden indicado desde el nucleósido en el extremo 5', y A_a ubicada en el lado 3' de la región complementaria. Es decir, la región complementaria de la hebra antisentido es la región de A_1 a A_a en la fórmula (II) anterior. Solo se requiere que la secuencia de nucleótidos de la región complementaria en la región de hebra antisentido del oligonucleótido S3M sea sustancialmente complementaria a una secuencia diana, y puede incluir, por ejemplo, un mal apareamiento en 5 bases, 4 bases, 3 bases, 2 bases o 1 base con la secuencia diana, aunque se prefiere que sea completamente complementaria a la secuencia diana. A_1 a A_{19} representan cada uno un nucleósido, y A_a representa 0 a 5 nucleósidos. Entre las estructuras sobresalientes de la región de hebra antisentido, una estructura sobresaliente adicionada en el extremo 5' se representa como A_{O5} , y una estructura sobresaliente adicionada en el extremo 3' se representa como A_{O3} .

Un_1 puede ser sustancialmente complementario a una base correspondiente de la secuencia diana, y puede ser adenina, uracilo o timina independientemente de la secuencia diana. La patente de los Estados Unidos Núm. 10093923 y similares indican que se exhibe una buena actividad de interferencia de ARN cuando la base en el extremo 3' en la región complementaria de la hebra homosentido de ARNip es adenina o uracilo independientemente de la secuencia diana. Además, el documento Nature 465, 818-822 (2010) indica que el nucleósido en el extremo 5' de la hebra antisentido se une a la proteína Ago 2 implicada en la actividad de interferencia de ARN y no se une al ARNm diana. También se indica que el nucleósido en el extremo 5' de la hebra antisentido se une más fuertemente a la proteína Ago

2 cuando el nucleósido es un nucleósido de adenina o uracilo que cuando el nucleósido es guanina o citosina y, por lo tanto, el nucleósido en el extremo 5' de la hebra antisentido es preferentemente un nucleósido de adenina o uracilo.

Al menos una (preferiblemente dos o más) de las regiones complementarias A₁₁, A₁₂,
5 A₁₃, A₁₄ y A₁₅ en la región de hebra antisentido del oligonucleótido S3M se selecciona de ADN, ARN, un nucleósido modificado por puente 2'-O,4'-C y ARN 2'-MOE. El nucleósido modificado con puente 2'-O,4'-C usado aquí no se limita. De manera preferente es LNA o ENA. En la región complementaria de la hebra antisentido, los nucleósidos distintos de los nucleósidos identificados como se describió anteriormente no están limitados. Se pueden
10 adoptar diversos nucleósidos naturales o nucleósidos modificados con azúcar. Son, cada uno independientemente, ARN 2'-OMe, ARN 2'-F o ADN.

Como un ejemplo de la presente invención, se proporciona un oligonucleótido en el cual la región complementaria A₁₄ en la región de hebra antisentido del oligonucleótido S3M es ARN. Los ejemplos del patrón de modificación de este oligonucleótido incluyen, pero no
15 se limitan a, los que se muestran como los tipos 56 y 57 de la Figura 2, los tipos 61, 62, 66 y 67 de la Figura 3, los tipos 75 a 83 de la Figura 5 y los tipos 91 a 95 de la Figura 6.

Un aspecto preferido de la región de hebra antisentido del oligonucleótido en el que A₁₄ es ARN es que A₁₃ es un nucleósido modificado con puente 2'-O,4'-C, ARN 2'-OMe o ARN 2'-F, más preferentemente un nucleósido modificado con puente 2'-O,4'-C, e incluso más
20 preferentemente ENA o LNA (tipos 76 a 83 de la Figura 5 y tipos 91 a 93 de la Figura 6). En este oligonucleótido S3M, el patrón de modificación de A₁₁-A₁₂-A₁₃-A₁₄-A₁₅ es preferentemente cualquiera de las siguientes fórmulas (IIIa) a (IIIh).

A₁₁(ARN 2'-OMe)-A₁₂(ARN 2'-OMe)-A₁₃(ENA)-A₁₄(ARN)-A₁₅(ARN 2'-OMe) (IIIa)

A₁₁(ARN 2'-F)-A₁₂(ARN 2'-OMe)-A₁₃(ENA)-A₁₄(ARN)-A₁₅(ARN 2'-OMe) (IIIb)

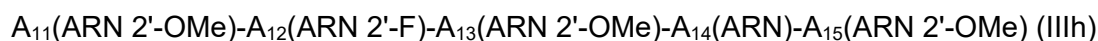
25 A₁₁(ARN 2'-OMe)-A₁₂(ARN 2'-F)-A₁₃(ENA)-A₁₄(ARN)-A₁₅(ARN 2'-OMe) (IIIc)

A₁₁(ARN 2'-OMe)-A₁₂(ARN 2'-OMe)-A₁₃(LNA)-A₁₄(ARN)-A₁₅(ARN 2'-OMe) (IIId)

A₁₁(ARN 2'-F)-A₁₂(ARN 2'-OMe)-A₁₃(LNA)-A₁₄(ARN)-A₁₅(ARN 2'-OMe) (IIIe)

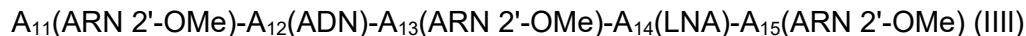
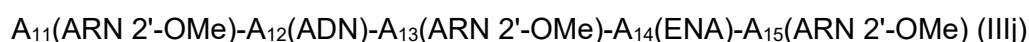
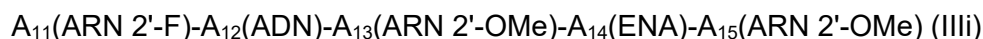
A₁₁(ARN 2'-OMe)-A₁₂(ARN 2'-F)-A₁₃(LNA)-A₁₄(ARN)-A₁₅(ARN 2'-OMe) (IIIf)

A₁₁(ARN 2'-F)-A₁₂(ARN 2'-OMe)-A₁₃(ARN 2'-OMe)-A₁₄(ARN)-A₁₅(ARN 2'-OMe) (IIIg)



Como un ejemplo de la presente invención, se proporciona un oligonucleótido en el cual la región complementaria A_{14} en la región de hebra antisentido del oligonucleótido S3M es un nucleósido modificado por puente 2'-O,4'-C. Aquí, el nucleósido modificado por puente 2'-O,4'-C es preferiblemente ENA o LNA. Ejemplos del patrón de modificación de este oligonucleótido incluyen, pero no se limitan a, aquellos mostrados como tipos 70 a 74 de la Figura 4 y tipos 88 a 90 de la Figura 6.

Un aspecto preferido del oligonucleótido en el que A_{14} es un nucleósido modificado por puente 2'-O,4'-C es que A_{12} es ADN. En este oligonucleótido S3M, el patrón de modificación $A_{11}\text{-}A_{12}\text{-}A_{13}\text{-}A_{14}\text{-}A_{15}$ de la región complementaria de la hebra antisentido es preferentemente cualquiera de las siguientes fórmulas (IIIi) a (IIIl).



Como un ejemplo de la presente invención, se proporciona un oligonucleótido en el que A_{14} de la región complementaria de la región de hebra antisentido del oligonucleótido S3M es ADN. Los ejemplos del patrón de modificación de este oligonucleótido incluyen, pero no se limitan a, aquellos mostrados como los tipos 58 y 59 de la Figura 2, y los tipos 63, 64, 68 y 69 de la Figura 3.

Como un ejemplo de la presente invención, se proporciona un oligonucleótido en el que A_{15} de la fórmula (II) en la región de hebra antisentido del oligonucleótido S3M es ARN 2'-MOE. Los ejemplos del patrón de modificación de este oligonucleótido incluyen, pero no se limitan a, aquellos mostrados como los tipos 79 y 83 de la Figura 5.

Como un ejemplo de la presente invención, se proporciona un oligonucleótido en el que cualquiera de los 11° a 13° nucleósidos del extremo 5' de la región complementaria de la región de hebra antisentido del oligonucleótido S3M (A_{11} , A_{12} y A_{13} de fórmula (II)) es un nucleósido modificado por puente 2'-O,4'-C. Los ejemplos del patrón de modificación de este oligonucleótido incluyen, pero no se limitan a, aquellos que se muestran como los tipos 43 y 45 de la Figura 1, los tipos 75 a 84 de la Figura 4 y los tipos 85 y 86 y 91 a 93 de la Figura 6

para ENA, y los tipos 44 y 46 de la Figura 1 y el tipo 67 y 69 de la Figura 3 para LNA.

Como un ejemplo de la presente invención, se proporciona un oligonucleótido en el que cualquiera de los 11° a 13° nucleósidos del extremo 5' de la región complementaria de la región de la hebra antisentido del oligonucleótido S3M (A_{11} , A_{12} y A_{13} de la fórmula (II)) es ADN. Los ejemplos del patrón de modificación de este oligonucleótido incluyen, pero no se limitan a, aquellos que se muestran como los tipos 41 y 42 de la Figura 1, el tipo 71 de la Figura 4 y los tipos 87 a 90 de la Figura 6.

Como un ejemplo de la presente invención, se proporciona un oligonucleótido en el que cualquiera de los 11° a 13° nucleósidos del extremo 5' de la región complementaria de la región de hebra antisentido del oligonucleótido S3M (A_{11} , A_{12} y A_{13} de la fórmula (II)) es ARN 2'-MOE. Ejemplos del patrón de modificación de este oligonucleótido incluyen, pero no se limitan a, aquellos mostrados como tipos 47, 48 de la Figura 1 y tipo 74 de la Figura 4.

Para los nucleósidos en la región complementaria en la región de hebra antisentido del oligonucleótido S3M de la presente invención que no sean los nucleósidos especificados como se describió anteriormente, se pueden seleccionar varios tipos de nucleósidos de manera apropiada, pero preferiblemente, al menos uno (preferiblemente todos) de los nucleósidos de A_2 , A_6 y A_{16} es ARN 2'-F. Una región de hebra antisentido más preferida es tal que, además de A_2 , A_6 y A_{16} , uno o dos nucleósidos seleccionados del grupo que consiste en A_8 , A_9 y A_{10} son ARN 2'-F, y nucleósidos distintos de los especificados como se describió anteriormente (por ejemplo, A_1 , A_3 a A_5 , A_7 , A_{17} a A_{19} y A_a) son ADN o ARN 2'-OMe.

Los patrones de modificación preferibles de regiones distintas de A_{11} a A_{15} de la región complementaria de la región de hebra antisentido del oligonucleótido S3M de la presente invención se ejemplifican en, por ejemplo, las Tablas A-1 y A-2 a continuación.

Tabla A-1

	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	A_7	A_8	A_9	A_{10}
Patrón 1	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)
Patrón 2	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(M)
Patrón 3	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(M)

Patrón 4	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(F)	(M)	(M)	(F)	(M)
Patrón 5	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(F)
Patrón 6	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)
Patrón 7	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(F)	(F)	(M)	(F)	(M)
Patrón 8	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)
Patrón 9	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(M)
Patrón 10	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)
Patrón 11	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)	(F)	(M)
Patrón 12	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)	(F)	(F)
Patrón 13	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(F)	(M)	(F)	(F)	(M)
Patrón 14	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(M)	(F)	(M)
Patrón 15	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(F)	(M)	(M)	(F)	(M)
Patrón 16	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(F)	(M)	(M)	(F)	(F)

Tabla A-2

	A ₁₆	A ₁₇	A ₁₈	A ₁₉	A _a	A _{O3}
Patrón 1	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)

Patrón 2	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
Patrón 3	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
Patrón 4	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
Patrón 5	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
Patrón 6	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
Patrón 7	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
Patrón 8	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
Patrón 9	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
Patrón 10	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
Patrón 11	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
Patrón 12	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
Patrón 13	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
Patrón 14	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
Patrón 15	(F)	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)
Patrón 16	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)

[En las tablas anteriores, (M) es ARN 2'-OMe y (F) es ARN 2'-F. A_a es 0 a 5 nucleósidos, donde todos los nucleósidos son iguales excepto cuando 0. A_{O3} es 0 a 5 nucleósidos, donde todos los nucleósidos son iguales excepto cuando 0. Un enlace fosfodiéster o un enlace fosforotioato se selecciona apropiadamente como el enlace inter-nucleósido.]

La región de hebra antisentido contenida en el oligonucleótido S3M puede tener estructuras sobresalientes en el extremo 3' y/o el extremo 5' de la región complementaria de la misma (es decir, A_{O3} y A_{O5} en la fórmula (II) anterior). A_{O3} y A_{O5} representan cada uno

independientemente de 0 a 5 (preferentemente, 3, 2, 1 o 0) nucleósidos, donde los nucleósidos son cada uno independientemente ARN 2'-OMe, ARN 2'-F, ADN o un nucleósido modificado por puente 2'-O,4'-C. Preferentemente, A₀₃ es un saliente que consiste en dos o tres ARN 2'-OMe, o un saliente que consiste en uno o dos ARN 2'-OMe y uno o dos nucleósidos modificados con puente 2'-O,4'-C, y A₀₅ no está presente.

Cuando están presentes A₀₃ y A₀₅, las bases de los mismos no están limitadas siempre que se muestre una función como un saliente. Son preferentemente oligo U u oligo T.

3-3. Enlace entre nucleósidos

Un enlace fosfodiéster que se puede modificar químicamente se puede seleccionar de forma adecuada para cada enlace entre nucleósidos en el oligonucleótido S3M de la presente invención, y se prefiere un enlace fosfodiéster o un enlace fosforotioato. Esos enlaces se pueden usar solos o en combinación. Se prefiere una combinación de enlaces fosfodiéster y enlaces fosforotioato, y el contenido de enlace fosforotioato en los enlaces entre nucleósidos es 50% o menos, 40% o menos, 30% o menos, 29% o menos, 28% o menos, 27% o menos, 26% o menos, o 25% o menos.

Cuando se utilizan ARN y/o ARN 2'-F, el enlace entre el nucleósido relevante y un nucleósido adyacente 3' puede ser un enlace fosforotioato. Cuando se usa ARN, el enlace entre el nucleósido relevante y un nucleósido adyacente en 3' es preferiblemente un enlace fosforotioato.

En el oligonucleótido S3M de la presente invención, se usa preferentemente un enlace fosforotioato para enlaces entre el 1° y 2° nucleósidos hasta entre el 4° y 5° nucleósidos (el número de enlaces entre nucleósidos es 1, 2, 3 o 4) desde el extremo 5' y/o el extremo 3' del oligonucleótido. En el oligonucleótido de la presente invención, cuando la región de hebra homosentido y la región de hebra antisentido están contenidas en oligonucleótidos separados, los enlaces entre el 1er y 2do nucleósidos hasta entre el 4to y 5to nucleósidos de cada uno del 5'-terminal y el 3'-terminal de la región de hebra homosentido, y los enlaces entre el 1er y 2do nucleótidos hasta entre el 4to y 5to nucleótidos de cada uno del 5'-terminal y el 3'-terminal de la región de hebra antisentido, pueden ser enlaces fosforotioato. Preferentemente, los enlaces entre el 1° y el 2° nucleósidos hasta entre el 2° y el 3° nucleósidos (el número de enlaces entre nucleósidos es 2) de cada uno del extremo 5'y el extremo 3' de la región de hebra homosentido, y los enlaces entre el 1° y el 2° nucleósidos hasta entre el 2° y el 3°

nucleósidos (el número de enlaces entre nucleósidos es 2) del extremo 5'y los enlaces entre el 1° y el 2° nucleótidos hasta entre el 3° y el 4° nucleósidos (el número de enlaces entre nucleósidos es 3) del extremo 3' de la región de hebra antisentido, son enlaces fosforotioato.

4. Método para sintetizar oligonucleótidos

El método para preparar el oligonucleótido de la presente invención no está limitado siempre que permita la síntesis de un oligonucleótido deseado. Se puede usar un método de síntesis química conocido (método de fosfotriéster, método de fosforamidita, un método de H-fosfonato o similares). Por ejemplo, el oligonucleótido se puede sintetizar con reactivos disponibles comercialmente para usarse en ADN/ARN usando un sintetizador de ácido nucleico disponible comercialmente.

Cuando se usa un método de fosforamidita normal, un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos deseada se puede sintetizar por un método descrito en la técnica (Nucleic Acids Research, 12, 4539 (1984)) usando un sintetizador de ADN, por ejemplo, Modelo 392 fabricado por PerkinElmer, Inc. basado en el método de fosforamidita.

Los reactivos de amidita correspondientes a varios nucleósidos se pueden obtener comprando aquellos que están disponibles comercialmente, o realizando síntesis por un método conocido.

El oligonucleótido de la presente invención se puede sintetizar mediante un método descrito en el documento Nucleic Acids Research, 12, 4539 (1984) usando un sintetizador de ADN disponible comercialmente (por ejemplo, Modelo 392 fabricado por PerkinElmer, Inc. basado en el método de fosforamidita). Los reactivos de fosforamidita utilizados en la presente pueden ser reactivos de fosforamidita disponibles comercialmente para nucleósidos naturales y 2'-O-metilnucleósidos (es decir, 2'-O-metilguanosina, 2'-O-metiladenosina, 2'-O-metilcitidina y 2'-O-metiluridina). Lo siguiente se aplica a 2'-O-alquilguanosinas, 2'-O-alquiladenosinas, 2'-O-alquilsitidinas y 2'-O-alquiluridinas en las que el número de átomos de carbono en el grupo 2'-O-alquilo es de 2 a 6.

Para 2'-O-aminoetilguanosina, 2'-O-aminoetiladenosina, 2'-O-aminoetilcitidina y 2'-O-aminoetiluridina, se pueden sintetizar los reactivos de fosforamidita correspondientes de acuerdo con el documento Blommers et al. Biochemistry (1998), 37, 17714-17725.

Para 2'-O-propilguanosina, 2'-O-propiladenosina, 2'-O-propilcitidina y 2'-O-propiluridina, se pueden sintetizar los reactivos de fosforamidita correspondientes de acuerdo

con el documento Lesnik, E.A. et al. Biochemistry (1993), 32, 7832-7838.

Para 2'-O-alilguanosina, 2'-O-aliladenosina, 2'-O-alilcitidina y 2'-O-aliluridina, se pueden usar reactivos de fosforamidita disponibles comercialmente.

5 Para 2'-O-metoxietilguanosina, 2'-O-metoxietiladenosina, 2'-O-metoxietil-5-metilcitidina y 2'-O-metoxietil-5-metiluridina para 2'-MOE ARN, se pueden sintetizar los reactivos de fosforamidita correspondientes de acuerdo con la patente de los Estados Unidos Núm. 6261840, o el documento Martin, P. Helv. Chim. Acta. (1995) 78, 486-504, o se pueden usar reactivos de fosforamidita disponibles comercialmente.

10 Para 2'-O-butilguanosina, 2'-O-butiladenosina, 2'-O-butilcitidina y 2'-O-butiluridina, se pueden sintetizar los reactivos de fosforamidita correspondientes de acuerdo con el documento Lesnik, E.A. et al. Biochemistry (1993), 32, 7832-7838.

Para 2'-O-pentilguanosina, 2'-O-pentiladenosina, 2'-O-pentilcitidina y 2'-O-pentiluridina, se pueden sintetizar los reactivos de fosforamidita correspondientes de acuerdo con el documento Lesnik, E.A. et al. Biochemistry (1993), 32, 7832-7838.

15 Para 2'-O-propargilguanosina, 2'-O-propargiladenosina, 2'-O-propargilcitidina y 2'-O-propargiluridina, se pueden usar reactivos de fosforamidita disponibles comercialmente.

20 Para 2'-desoxi-2'-fluoroguanosina, 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina, 2'-desoxi-2'-fluorocitidina y 2'-desoxi-2'-fluorouridina para ARN 2'-F, se pueden sintetizar los reactivos de fosforamidita correspondientes de acuerdo con el documento J. Med. Chem. 36, 831 (1993), o se pueden usar reactivos de fosforamidita disponibles comercialmente.

25 Para ARN 3'-F que es un nucleósido modificado en 3', se pueden sintetizar reactivos de fosforamidita correspondientes de acuerdo con WO 2017027645 para 3'-desoxi-3'-fluoroguanosina, WO2018198076 para 3'-desoxi-3'-fluoroadenosina, US 2011/0196141 para 3'-desoxi-3'-fluorocitidina. Para 3'-desoxi-3'-fluorouridina, la síntesis se puede realizar mediante referencia a métodos conocidos en los documentos mencionados anteriormente y similares.

Para el ARN 3'-OMe que es un nucleósido modificado en 3', se pueden sintetizar 3'-O-metilguanosina, 3'-O-metiladenosina, 3'-O-metilcitidina y 3'-O-metiluridina usando reactivos de fosforamidita disponibles comercialmente.

30 Para ARN 3'-MOE que es un nucleósido modificado en 3', 3'-O-metoxietilguanosina,

3'-O-metoxietiladenosina, 3'-O-metoxietil-5-metilcitidina y 3'-O-metoxietil-5-metiluridina, se pueden sintetizar los reactivos de fosforamidita correspondientes de acuerdo con US 2003/0096979.

5 Para 2'-O,4'-C-metilenguanosina, 2'-O,4'-C-metilenadenosina, 2'-O,4'-C-metilenocitidina, 2'-O,4'-C-metilen-5-metilcitidina y 2'-O,4'-C-metilen-5-metiluridina para LNA, los reactivos de fosforamidita correspondientes se pueden producir mediante un método descrito en WO 99/14226.

10 Para 2'-O,4'-C-alquilenguanosinas, 2'-O,4'-C-alquilenadenosinas, 2'-O,4'-C-alquilenocitidinas, 2'-O,4'-C-alquilen-5-metilcitidinas y 2'-O,4'-C-alquilen-5-metiluridinas en las que el número de átomos de carbono en el grupo alquileo de la porción del puente 2'-O,4'-C es de 2 a 5, los reactivos de fosforamidita correspondientes se pueden producir mediante un método descrito en WO 00/47599.

15 Para los nucleósidos sometidos a la modificación de D-ribofuranosa con 2'-desoxi-2'-C,4'-C-metilenoximetileno, los reactivos de fosforamidita correspondientes se pueden sintetizar de acuerdo con el documento Wang, G. et al. Tetrahedron (1999), 55, 7707-7724.

Para S-cEt (etilo restringido), los reactivos de fosforamidita correspondientes se pueden sintetizar de acuerdo con el documento Seth, P.P. et al. J. Org. Chem (2010), 75, 1569-1581.

20 Para AmNA, los reactivos de fosforamidita correspondientes se pueden sintetizar de acuerdo con el documento Yahara, A. et al. ChemBioChem (2012), 13, 2513-2516 o WO 2014/109384.

25 Un oligonucleótido antisentido que tiene un enlace fosforotioato se puede sintetizar acoplando reactivos de fosforamidita, seguido de reacción con un reactivo tal como azufre, disulfuro de tetraetiltiuram (TETD, Applied Biosystems), un reactivo de Beaucage (Glen Research) o hidruro de xantano (Tetrahedron Letters, 32, 3005 (1991); J. Am. Chem. Soc. 112, 1253 (1990); PCT/WO 98/54198).

30 Los soportes de fase sólida de vidrio de poro controlado (CPG) y poliestireno disponibles comercialmente, a los que se unen un 2'-O-metilnucleósido y un 3'-O-metilnucleósido, se pueden usar en un sintetizador. Para 2'-O,4'-C-metilenguanosina, 2'-O,4'-C-metilenadenosina, 2'-O,4'-C-metilen-5-metilcitidina y 2'-O,4'-C-metilen-5-metiluridina, los nucleósidos producidos por un método descrito en WO 99/14226 se pueden unir a CPG,

y para 2'-O,4'-C-alquilenguanosinas, 2'-O,4'-C-alquilenadenosinas, 2'-O,4'-C-alquilen-5-metilcitidinas y 2'-O,4'-C-alquilen-5-metiluridinas en las que el número de átomos de carbono en el alquileo es de 2 a 5, los nucleósidos producidos por un método descrito en WO 00/47599 se pueden unir a CPG de acuerdo con el documento Oligonucleotide Synthesis, editado por M. J. Gait, Oxford University Press, 1984. La síntesis se puede realizar uniendo cualquiera de los reactivos de fosforamidita descritos anteriormente usando resina universal. El uso de CPG modificado (descrito en la patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 7-87982, Ejemplo 12b) permite la síntesis de un oligonucleótido en el que un grupo 2-hidroxietilfosfato se une al extremo 3'. El uso del modificador 3'-amino C3 CPG, modificador 3'-amino C7 CPG, gliceril CPG, (Glen Research), 3'-espaciador C3 SynBase CPG 1000 o 3'-espaciador C9 SynBase CPG 1000 (tecnologías de enlace) permite la síntesis de un oligonucleótido en el que un grupo hidroxialquilfosfato o un grupo aminoalquilfosfato se une al extremo 3'.

Cuando un análogo de oligonucleótido se modifica con tioato, se puede obtener un derivado de tioato por un método descrito en la técnica (Tetrahedron Letters, 32, 3005 (1991), J. Am. Chem. Soc., 112, 1253 (1990)) usando reactivos tal como disulfuro de tetraetiltiuram (TETD, Applied BioSystems), un reactivo de Beaucage y un disulfuro de fenilacetilo/piridina-acetonitrilo (1 : 1 v/v) (Ravikumar, V.T. et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. (2006) 16, p. 2513-2517) además del azufre.

Cuando se usa un grupo protector a base de sililo tal como t-butildimetilsililo (TBS) como grupo protector para el grupo 2'-hidroxilo del ARN, la protección se puede eliminar usando fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF), HF-piridina, HF-trietilamina o similares.

La protección del grupo acilo de la porción base y el grupo cianoetilo de la porción fosfato se puede eliminar usando amoníaco acuoso concentrado, amoníaco metanólico, amoníaco etanólico, un amoníaco-etanol acuoso concentrado (3 : 1 V/V) líquido mixto, una solución acuosa concentrada de amoníaco-40% de metilamina (1 : 1 V/V) líquido mixto, metilamina, una solución acuosa de LiOH 0,5 M, una solución de trietilamina/metanol 3,5 M (1 : 10 V/V) líquido mixto, metanol que contiene carbonato de potasio 0,05 M o similar. Amoníaco acuoso concentrado y un líquido mixto acuoso concentrado de amoníaco-etanol (3 : 1 V/V).

El oligonucleótido de la presente invención se puede obtener mediante la realización de la purificación a través de cualquier proceso de purificación para usarse en la purificación normal de ácidos nucleicos, por ejemplo, varios tipos de cromatografía tal como cromatografía

de fase inversa y cromatografía de intercambio iónico (que incluye cromatografía líquida de alto rendimiento).

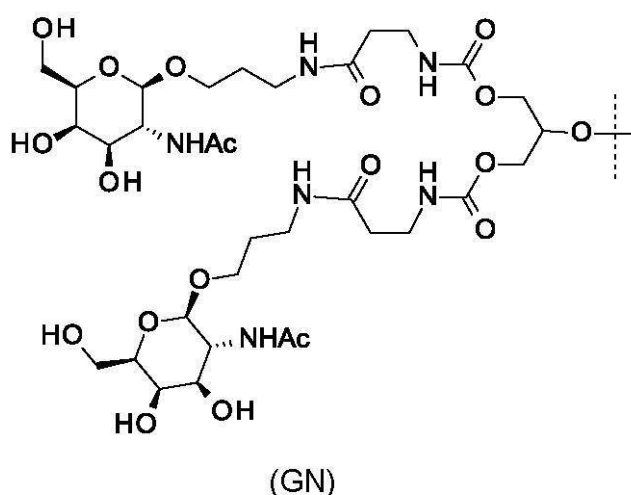
El oligonucleótido de la presente invención incluye un oligonucleótido al que se une una unidad de administración para administrar el oligonucleótido a tejidos diana o células diana. Los ejemplos del oligonucleótido al que se une una unidad de administración pueden incluir oligonucleótidos en los que una unidad de una estructura química deseada que tiene un grupo aminoalquilfosfato (por ejemplo, el alquilo tiene de 3 a 9 átomos de carbono) se une a la posición 5' del nucleótido en el extremo 5' y/o la posición 3' (posición 2' en el caso de un nucleótido modificado en la posición 3') del nucleótido en el extremo 3' del oligonucleótido.

Como tal unidad para la administración, por ejemplo, una unidad de GalNAc que se une a los receptores de asialoglicoproteína (ASGRP) de las células del parénquima hepático, o una unidad de ácido graso (por ejemplo, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico o ácido behénico) para la administración al hígado y los tejidos musculares (ver, por ejemplo, Nucleic Acids Res. (2020) 47, 6029-6044; WO 2017/19267) se puede usar según corresponda.

La unidad de GalNAc es una unidad estructural que contiene N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) capaz de unirse a ASGRP, y se puede usar para administrar el oligonucleótido de la presente invención al hígado. La unidad GalNAc puede tener una estructura ligadora lineal o ramificada, y puede tener, por ejemplo, una estructura ligadora lineal, o una estructura ligadora ramificada que diverge en dos o más, tres o más, o cuatro o más ramificaciones, o cuatro o menos, tres o menos, o dos o menos ramificaciones. La unidad GalNAc puede contener un grupo fosfato o un grupo tiofosfato para unirse a un oligonucleótido. Siempre que se mantenga la capacidad de unirse a ASGRP, el número de GalNAc contenidos en una unidad de GalNAc no está limitado, y la estructura de GalNAc puede modificarse. Como unidades de GalNAc que se pueden usar para el oligonucleótido de la presente invención, por ejemplo, se pueden usar las unidades de GalNAc conocidas descritas en WO 2021/049504, WO 2009/073809, WO 2014/076196, WO 2014/179620, WO 2015/006740, WO 2015/105083, WO 2016/055601, WO 2017/023817, WO 2017/084987, WO 2017/131236, Methods in Enzymology, 1999, Vol. 313, p. 297-321 y Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 26 (2016) 3690-3693, según corresponda.

Los ejemplos de la unidad GalNAc que se puede usar incluyen aquellos que tienen la siguiente fórmula, y se pueden ajustar adecuadamente mediante un método descrito en WO 2021/049504.

[Fórmula química 16]



en donde la línea discontinua representa un punto de unión, el átomo de oxígeno en el punto de unión se une a un nucleótido adyacente, y forma un enlace fosfodiéster con el grupo fosfato 5' cuando se une al nucleótido en el extremo 5', y con el grupo fosfato 3' (grupo fosfato en la posición 2' en el caso de un nucleótido modificado en la posición 3') cuando se une al nucleótido en el extremo 3', y el enlace fosfodiéster formado puede ser un enlace fosfodiéster modificado químicamente tal como un enlace fosforotioato.

El oligonucleótido de la presente invención también incluye un oligonucleótido en el que se introduce una unidad de colesterol, una unidad de lípido o una unidad de vitamina E en el oligonucleótido (ver, por ejemplo, Lorenz, C. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, p. 4975-4977 (2004); Soutschek, J., et al. *Nature*, 432, p. 173-178, (2004); Wolfrum, C. et al. *Nature Biotech.* 25, p. 1149-1157, (2007)) Kubo, T. et al. *Oligonucleotides*, 17, p. 1-20, (2007); Kubo, T., et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 365, p. 54-61, (2008); y Nishina, K., et al., *Mol. Ther.* 16, p. 734-740, (2008)), y un oligonucleótido en el que un aptámero, que es una molécula de ácido nucleico capaz de unirse a una proteína, se une a un extremo del oligonucleótido.

El oligonucleótido de la presente invención también incluye un oligonucleótido en el que el oligonucleótido se une a un anticuerpo monoclonal (o una porción de unión adecuado del mismo), o una proteína (o un fragmento de oligopéptido adecuado del mismo) (ver, por ejemplo, Song, et al. *Nature Biotech.* 23, p. 709-717 (2005); y Xia et al. *Pharm. Res.* 24, p. 2309-2316 (2007), Kumar, et al. *Nature*, 448, p. 39-43 (2007)).

El oligonucleótido de la presente invención también incluye un complejo cargado positivamente obtenido mediante la adición de un polímero catiónico al oligonucleótido (ver, como ejemplos de donde se podría lograr la distribución a órganos y células, Leng et al. *J.*

Gen. Med. 7, p. 977-986 (2005), Baigude et al. 2, p. 237-241, y ACS Chem. Biol. (2007), Yadava et al. Oligonucleotide 17, p. 213-222 (2007)).

El oligonucleótido de la presente invención incluye todas las sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de los oligonucleótidos, o sales de estos ésteres. Los
5 ejemplos preferidos de la sal farmacéuticamente aceptable del oligonucleótido de la presente invención pueden incluir sales metálicas tal como sales de metales alcalinos tal como sales de sodio, sales de potasio y sales de litio, metales alcalinotérreos tal como sales de calcio y sales de magnesio, sales de aluminio, sales de hierro, sales de zinc, sales de cobre, sales de níquel y sales de cobalto; sales de amina tal como sales de amina inorgánica tal como sales
10 de amonio y sales de amina orgánica tal como sales de t-octilamina, sales de dibencilamina, sales de morfolina, sales de glucosamina, sales de éster alquílico de fenilglicina, sales de etilendiamina, sales de N-metilglucamina, guanidina sales de dietilamina, sales de trietilamina, sales de dicitclohexilamina, sales de N,N'-dibenciletilendiamina, sales de cloroprocaína, sales de procaína, sales de dietanolamina, sales de N-bencilfenetilamina, sales de piperazina, sales
15 de tetrametilamonio y sales de tris(hidroximetil)aminometano; sales de ácidos inorgánicos tal como sales de hidrácidos halogenados tal como sales de ácido fluorhídrico, sales de ácido clorhídrico, sales de ácido bromhídrico y sales de ácido yodhídrico, sales de ácido nítrico, sales de ácido perclórico, sales de ácido sulfúrico y sales de ácido fosfórico; sales de ácidos orgánicos tal como sales de ácido alcanosulfónico inferior tal como sales de ácido
20 metanosulfónico, sales de ácido trifluorometanosulfónico y sales de ácido etanosulfónico, sales de ácido arilsulfónico tal como sales de ácido bencenosulfónico y sales de ácido p-toluenosulfónico, y sales de ácido acético, sales de ácido málico, sales de ácido fumárico, sales de ácido succínico, sales de ácido cítrico, sales de ácido tartárico, sales de ácido oxálico y sales de ácido maleico; y sales de aminoácidos tal como sales de glicina, sales de lisina,
25 sales de arginina, sales de ornitina, sales de ácido glutamínico y sales de ácido asparagínico.

El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la presente invención puede suprimir la expresión del ARNm de TfR2. El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la presente invención, que suprime la expresión del ARNm de TfR2, puede suprimir así la producción de hepcidina que
30 desempeña un papel clave en el metabolismo del hierro. Aunque el mecanismo de acción no está limitado, el oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la presente invención se puede usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad que se puede tratar o prevenir mediante la supresión de la expresión del ARNm de TfR2 y/o la producción de hepcidina. Un aspecto preferido es la administración a un

paciente con anemia, donde se puede suprimir la expresión del ARNm de TfR2, y se puede esperar un efecto de mejora de un síntoma anémico. El oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la presente invención también se puede usar como una composición farmacéutica que contiene el oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como un ingrediente activo.

Una composición farmacéutica que contiene el oligonucleótido de la presente invención se mezcla, encapsula o conjuga con otra molécula, estructura molecular o mezcla de compuestos para formar, por ejemplo, un liposoma, una molécula dirigida al receptor, una formulación oral, rectal o local u otra formulación para ayudar a la absorción, distribución y/o absorción. Cuando el oligonucleótido de la presente invención se usa como un fármaco profiláctico o un fármaco terapéutico para una enfermedad, el oligonucleótido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse por sí mismo, o mezclarse con un excipiente, diluyente y similar farmacéuticamente aceptable apropiado, y administrarse por vía oral como una tableta, una cápsula, un gránulo, un polvo, un jarabe o similar, o administrarse por vía parenteral como una inyección, un supositorio, un parche, una preparación externa o similar.

Estas preparaciones se producen mediante métodos bien conocidos usando aditivos tal como excipientes (ejemplos de los mismos pueden incluir excipientes orgánicos tal como derivados de azúcar tal como lactosa, azúcar blanco, glucosa, manitol y sorbitol; derivados de almidón tal como almidón de maíz, almidón de papa, α almidón y dextrina; derivados de celulosa tal como celulosa cristalina; goma arábica; dextrano; y pululano; y excipientes inorgánicos tal como derivados de sal de ácido silícico tal como ácido silícico anhidro ligero, silicato de aluminio sintético, silicato de calcio y aluminometasilicato de magnesio; sales de ácido fosfórico tal como hidrogenofosfato de calcio; sales de ácido carbónico tal como carbonato de calcio; y sales de ácido sulfúrico tal como sulfato de calcio), lubricantes (ejemplos de los mismos pueden incluir ácido esteárico, sales metálicas de ácido esteárico tal como estearato de calcio y estearato de magnesio; talco; sílice coloidal; ceras tal como cera de perlas y espermaceti; ácido bórico; ácido adípico; sales de ácido sulfúrico tal como sulfato de sodio; glicol; ácido fumárico; benzoato de sodio; DL leucina; sales de ácido laurilsulfúrico tal como laurilsulfato de sodio y laurilsulfato de magnesio; ácidos silícicos tal como ácido silícico anhidro e hidrato de ácido silícico; y el derivados de almidón descritos anteriormente), aglutinantes (ejemplos de los mismos pueden incluir hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, macrogol y los mismos compuestos que los excipientes descritos anteriormente), disgregantes (ejemplos de los mismos pueden incluir

derivados de celulosa tal como hidroxipropilcelulosa poco sustituida, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa cálcica y carboximetilcelulosa sódica internamente reticulada; y almidón/celulosas químicamente modificadas tal como carboximetilalmidón, carboximetilalmidón sódico y polivinilpirrolidona reticulada), emulsionantes (ejemplos de los mismos pueden incluir arcillas coloidales tal como bentonita y veegum; hidróxidos metálicos tal como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; tensioactivos aniónicos tal como laurilsulfato de sodio y estearato de calcio; tensioactivos catiónicos tal como cloruro de benzalconio; y tensioactivos no iónicos tal como éteres de alquilo de polioxietileno, ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitano y ésteres de ácido graso de sacarosa), estabilizantes (ejemplos de los mismos pueden incluir ésteres de ácido paraoxibenzoico tal como metilparabeno y propilparabeno; alcoholes tal como clorobutanol, alcohol bencílico y alcohol feniletílico; cloruro de benzalconio; fenoles tal como fenol y cresol; timerosal, ácido deshidroacético; y ácido sórbico); mejoradores del sabor y el olor (algunos ejemplos pueden ser los edulcorantes, los agentes agrios y los aromas utilizados normalmente), y diluyentes.

El cuerpo que se somete a la introducción de un oligonucleótido preparado como se describió anteriormente no está limitado siempre que permita que un gen diana se transcriba en ARN en su célula. El cuerpo que se va a someter a introducción significa una célula, un tejido o un individuo.

La célula en la que se introduce el oligonucleótido de la presente invención puede ser una célula de la línea germinal, una célula somática, una célula totipotente diferenciadora, una célula multipotente, una célula escindida, una célula no escindida, una célula del tejido parenquimatoso, una célula epidérmica, una célula inmortalizada, una célula transformada, una célula nerviosa o una célula inmunitaria.

El tejido incluye un embrión unicelular o una célula constitutiva, o un embrión multicelular, un tejido fetal y similares. Los ejemplos de una célula en diferenciación incluyen células adiposas, células de fibroblastos, células musculares, células miocárdicas, células endoteliales, células nerviosas, células gliales, células sanguíneas, megacariocitos, linfocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, leucocitos, granulocitos, queratinocitos, células de cartílago, células de osteoblastos, células osteoclasticas, células hepáticas y células endocrinas o exocrinas. Como ejemplos de estas células, las células CHO-K1 (banco RIKEN Cell), las células Drosophila S2 (Schneider, I. et al., J. Embryol. Exp. Morph., 27, p. 353-365 (1972), células HeLa humanas (ATCC: CCL-2), o células HEK 293 humanas (ATCC: CRL-1573), y similares se usan preferentemente.

Los ejemplos de un individuo utilizado como un cuerpo que se someterá a la introducción del oligonucleótido de la presente invención incluyen además específicamente aquellos que pertenecen a plantas, animales, protozoos, virus, bacterias u hongos. La planta puede ser una planta monocotiledónea, una planta dicotiledónea o una planta gimnosperma, y el animal puede ser un vertebrado o un invertebrado. El vertebrado es preferentemente un mamífero que incluye un ratón, una rata, un mono, un perro o un humano.

Como método para introducir el oligonucleótido de la presente invención en un cuerpo que se va a someter a la introducción, se usa un método de fosfato de calcio, un método de electroporación, un método de lipofección, infección viral, inmersión en una solución de 3L5-oligonucleótido, un método de transformación o similar cuando el cuerpo que se va a someter a la introducción es una célula o un tejido. Los ejemplos del método para la introducción en un embrión incluyen microinyección, un método de electroporación e infección viral. Cuando el cuerpo a someter a la introducción es una planta, se usa inyección o perfusión en la cavidad o células intersticiales o similares de la planta, o un método de pulverización. En el caso de un individuo animal, se utiliza un método de introducción sistémica por administración oral, tópica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, parenteral, transvaginal, transrectal, transnasal, transocular o transmembrana o similar, un método de electroporación o infección viral. Como método para la introducción oral, también se puede usar un método en el que el oligonucleótido de la presente invención se mezcla directamente con el alimento para un organismo.

Para un método para introducir el oligonucleótido de la presente invención en un paciente, se puede usar un sistema de dispersión coloidal además de lo anterior. Se espera que el sistema de dispersión coloidal tenga un efecto de mejorar la estabilidad *in vivo* de un compuesto, o un efecto de administrar eficientemente un compuesto a un órgano, tejido o célula específicos. El sistema de dispersión coloidal no está limitado siempre que se use normalmente. Los ejemplos de los mismos pueden incluir sistemas de dispersión basados en lípidos que incluyen complejos poliméricos, nanocápsulas, microesferas, perlas, emulsionantes de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Se prefiere una pluralidad de liposomas y vesículas de membrana artificial que tienen un efecto de administrar eficientemente un compuesto a un órgano, tejido o célula específica (Mannino et al., Biotechniques, 1988, 6, p.682; Blume y Cevc, Biochem. et Biophys. Acta, 1990, 1029, p.91; Lappalainen et al., Antiviral Res., 1994, 23, p.119; Chonn y Cullis, Current Op. Biotech., 1995, 6, p.698). Los liposomas de membrana individual que tienen un tamaño en el intervalo de 0,2 a 0,4 μm pueden encapsular una proporción significativa de un amortiguador acuoso que

contiene macromoléculas, y un compuesto se encapsula en las membranas internas acuosas resultantes, y se administra en una forma biológicamente activa a las células cerebrales (Fraley et al., Trends Biochem. Sci., 1981, 6, p. 77).

5 Un liposoma normalmente tiene una composición tal que un lípido, en particular, un fosfolípido, en particular, un fosfolípido que tiene una alta temperatura de transición de fase normalmente se combina con uno o más esteroides, en particular, colesterol. Los ejemplos de un lípido útil para la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo tal como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, esfingolípido, fosfatidiletanolamina, cerebrósido y gangliósido.

10 El diacilfosfatidilglicerol es particularmente útil. Aquí, la porción lipídica contiene de 14 a 18 átomos de carbono, en particular, de 16 a 18 átomos de carbono, y está saturado (carece de un enlace doble en una hebra de 14 a 18 átomos de carbono).

Los fosfolípidos típicos incluyen fosfatidilcolina, dipalmitoil fosfatidilcolina y diestearoil fosfatidilcolina.

15 El direccionamiento de un sistema de dispersión coloidal de liposomas puede ser pasivo o activo.

El direccionamiento pasivo se logra mediante el uso de la tendencia intrínseca de los liposomas a distribuirse a las células reticuloendoteliales de un órgano que contiene capilares sinusoidales.

20 Por otro lado, los ejemplos de direccionamiento activo pueden incluir unir un ligando específico tal como una cubierta de proteína viral (Morishita et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A), 1993. 90, p. 8474-), un anticuerpo monoclonal (o una porción de unión apropiado del mismo), un azúcar, un glicolípido o una proteína (o un fragmento de oligopéptido del mismo) a liposomas, o un método en el que los liposomas se modifican cambiando la composición de
25 los liposomas para lograr la distribución a órganos y tipos de células distintos de los sitios de localización de origen natural.

La superficie de un sistema de dispersión coloidal dirigido se puede modificar de varias maneras. En un sistema de administración en el que el direccionamiento se realiza con liposomas, los grupos lipídicos se pueden incorporar en bicapas lipídicas de liposomas para
30 mantener un ligando diana en estrecha asociación con las bicapas lipídicas. Se pueden utilizar varios grupos de enlace para unir una cadena lipídica al ligando objetivo.

Un ligando diana que se une a una molécula de superficie celular específica que se encuentra predominantemente en células a las que se desea administrar el oligonucleótido de la presente invención puede ser, por ejemplo, (1) una hormona, un factor de crecimiento o un fragmento de oligopéptido apropiado del mismo que se une a un receptor celular específico que se expresa predominantemente por células a las que se desea administrar, o (2) un anticuerpo policlonal o monoclonal o un fragmento apropiado del mismo (por ejemplo, Fab; F(ab')₂) que se une específicamente a un epítipo antigénico que se encuentra predominantemente en células diana. Dos o más agentes biológicamente activos también se pueden combinar en un liposoma individual y administrarse.

También se puede adicionar un agente farmacológico que mejora la estabilidad intracelular del contenido y/o el direccionamiento al sistema de dispersión coloidal.

La cantidad del oligonucleótido de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo utilizada varía dependiendo del síntoma, la edad y similares. Es deseable que se administre a un adulto de una a tres veces al día dependiendo del síntoma en una cantidad de no menos de 1 mg (preferiblemente 30 mg) y no más de 2000 mg (preferiblemente 1500 mg) por dosis en el caso de administración oral, no menos de 0,5 mg (preferiblemente 5 mg) y no más de 1000 mg (preferiblemente 250 mg) por dosis en el caso de administración intravenosa o administración subcutánea, no menos de 0,5 mg (preferiblemente 5 mg) y no más de 500 mg (preferiblemente 250 mg) en el caso de administración intratraqueal, y no menos de 0,05 mg (preferiblemente 0,5 mg) y no más de 10 mg (preferiblemente 5 mg) en el caso de administración intraocular. Es deseable que la administración se realice, dependiendo del síntoma, de una a tres veces a la semana en el caso de un agente farmacológico que tenga una estabilidad mejorada, y de una a tres veces al mes, o cada 3, 6, 12, 18 o 24 meses en el caso de un agente farmacológico que tenga una estabilidad mejorada.

Una composición y formulación farmacéutica para administración tópica incluye un parche transdérmico, un ungüento, una loción, una crema, un gel, una pastilla para chupar, un supositorio, un aerosol, una solución y un polvo.

El oligonucleótido de la presente invención puede suprimir la expresión del ARNm de TfR2. El oligonucleótido de la presente invención tiene baja toxicidad para las células y se puede aplicar a un producto farmacéutico que tiene alta seguridad. El oligonucleótido de la presente invención, que suprime la expresión del ARNm de TfR2, puede suprimir así la producción de hepcidina que juega un papel clave en el metabolismo del hierro. El

oligonucleótido de la presente invención, que suprime la expresión del ARNm de TfR2, puede aumentar así la concentración de hierro en plasma y/o la concentración de HGB. Aunque el mecanismo de acción no está limitado, el oligonucleótido de la presente invención se puede usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad que se puede tratar o prevenir mediante la supresión de la expresión de ARNm de TfR2 y/o la producción de hepcidina. Los ejemplos de la enfermedad incluyen anemia. Aunque el mecanismo de acción no está limitado, el oligonucleótido de iARN de la presente invención permite tratar o prevenir la anemia, por ejemplo, aumentando la concentración de HGB. El iARN-oligonucleótido de la presente invención puede reducir la frecuencia y/o la cantidad de transfusión de células sanguíneas a un paciente con anemia que necesita transfusión de células sanguíneas. Por ejemplo, la frecuencia y/o la cantidad de transfusión de células sanguíneas a un paciente con anemia durante un período de tiempo determinado (por ejemplo, 1 día, 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 8 semanas, 12 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses o 1 año) puede reducirse en aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90% o aproximadamente 100%.

La presente invención proporciona invenciones para uso médico, que incluyen una composición farmacéutica para usarse en el tratamiento o prevención de anemia, que comprende el oligonucleótido de la presente invención como un ingrediente activo, un método para tratar o prevenir anemia, que comprende administrar una cantidad efectiva del oligonucleótido, el oligonucleótido para usarse en el tratamiento o prevención de anemia, y uso del oligonucleótido de la presente invención en la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de anemia. La anemia que se puede tratar o prevenir mediante el oligonucleótido de la presente invención incluye, por ejemplo, anemia asociada con inflamación crónica (anemia de enfermedad crónica (ACD)), anemia asociada con disfunción de la médula ósea, anemia por deficiencia de hierro, anemia por deficiencia de hierro refractaria al hierro (IRIDA), anemia resistente a un agente estimulante de la eritropoyetina (ESA), anemia inducida por quimioterapia, anemia aplásica, anemia de Diamond-Blackfan y anomalía hereditaria de la hemoglobina tal como β talasemia o enfermedad de células falciformes. La anemia asociada con inflamación crónica incluye, por ejemplo, anemia asociada con enfermedad autoinmunitaria tal como reumatismo articular, eritematosa sistémica o anemia hematólítica autoinmunitaria, anemia asociada con enfermedad infecciosa, anemia asociada con enfermedad entérica inflamatoria tal como colitis inflamatoria, anemia asociada con insuficiencia cardíaca, anemia asociada con enfermedad renal crónica, anemia cancerosa, anemia asociada con síndrome de activación de macrófagos

y anemia asociada con enfermedad de Castleman. La anemia asociada con enfermedad renal crónica incluye, por ejemplo, enfermedad renal que implica diabetes, enfermedad renal que implica hipertensión, síndrome nefrótico (por ejemplo, síndrome nefrótico congénito del tipo finlandés, esclerosis mesangial difusa, síndrome nefrótico de lesión mínima, glomeruloesclerosis focal segmentaria, nefropatía crónica y síndrome de Galloway-Mowat), enfermedad renal que implica glomerulonefritis crónica (por ejemplo, nefropatía IgA, glomerulonefritis proliferativa mesangial, glomerulonefritis membranoproliferativa, nefritis de púrpura, nefritis de membrana basal antiaglomerular (síndrome de Goodpasture), síndrome de Alport, síndrome de Epstein, nefritis de Lupus, poliangeítis microscópica, síndrome urémico hemolítico atípico, síndrome de patela ungueal, nefropatía por fibronectina y glomerulopatía por lipoproteína), enfermedad renal que implica nefritis tubulointersticial crónica, enfermedad renal que implica pielonefritis crónica, enfermedad renal que implica deposición de amiloide, enfermedad renal tubulointersticial autosómica dominante, enfermedad renal que implica nefronoptosis y enfermedad renal que implica malformación del riñón (por ejemplo, enfermedad renal poliquística). La anemia cancerosa incluye, por ejemplo, anemia asociada con cáncer tal como mieloma múltiple, leucemia aguda, leucemia crónica, cáncer de pulmón o cáncer de mama. La anemia asociada con disfunción de la médula ósea incluye, por ejemplo, anemia asociada con mielofibrosis, anemia asociada con síndrome mielodisplásico, anemia asociada con leucemia mielomonocítica crónica (CMML), anemia asociada con mielosupresión quimioterapéutica, anemia aplásica, anemia de Diamond-Blackfan y anemia de Fanconi.

El oligonucleótido de la presente invención se puede usar preferentemente en el tratamiento o prevención de anemia asociada con inflamación crónica y anemia asociada con disfunción de la médula ósea, y se puede usar más preferentemente en el tratamiento o prevención de anemia asociada con enfermedad autoinmunitaria tal como reumatismo articular, eritematosa sistémica o anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia asociada con enfermedad infecciosa, anemia asociada con enfermedad entérica inflamatoria tal como colitis inflamatoria, anemia asociada con insuficiencia cardíaca, anemia asociada con enfermedad renal crónica, anemia cancerosa, anemia asociada con enfermedad de Castleman, anemia asociada con mielofibrosis, anemia asociada con síndrome mielodisplásico, anemia asociada con leucemia mielomonocítica crónica y anemia asociada con mielosupresión quimioterapéutica.

La presente invención proporciona un método para tratar o prevenir la anemia, que comprende usar el oligonucleótido de la presente invención en combinación con uno o más

de otros agentes farmacológicos. El oligonucleótido de la presente invención se puede usar en combinación con uno o más de otros agentes farmacológicos siempre que se muestre el efecto de la presente invención. Preferentemente, el uso del oligonucleótido de la presente invención en combinación con otros agentes farmacológicos que tienen un mecanismo de acción diferente sobre los síntomas anémicos puede proporcionar un mayor efecto terapéutico. Por ejemplo, para el síndrome mielodisplásico (MDS), se puede prescribir un agente farmacológico tal como un agente estimulante de la eritropoyesis (ESA) que tiene un mecanismo de acción de promoción de la proliferación de eritrocitos para tratar la anemia o luspatercept que tiene un mecanismo de acción de promoción de la diferenciación de eritrocitos para tratar la anemia, o un agente farmacológico tal como azacitidina que tiene un mecanismo de acción de supresión de la metilación del ADN y destrucción y lesión de células anormales, y este agente farmacológico y ARNip de TfR2 tienen diferentes mecanismos de acción. Por lo tanto, el uso combinado de este agente farmacológico y ARNip de TfR2 puede proporcionar un efecto terapéutico mayor que el de un agente individual en MDS. Para la anemia asociada con la enfermedad renal crónica, se puede prescribir un agente farmacológico tal como esa o un inhibidor del factor inducible por hipoxia proil hidroxilasa (HIFPHD) que tenga un mecanismo de acción para promover la proliferación de eritrocitos para tratar la anemia, y este agente farmacológico y ARNip de TfR2 tienen diferentes mecanismos de acción. Por lo tanto, el uso combinado de este agente farmacológico y ARNip de TfR2 puede proporcionar un efecto terapéutico mayor que el de un agente individual sobre la anemia asociada con enfermedad renal crónica. Para la mielofibrosis, se sabe que ruxolitinib tiene un efecto terapéutico principalmente sobre síntomas tal como la esplenomegalia (N Engl J Med 2012; 366: 799-807). Sin embargo, se sabe que el agente farmacológico tiene un efecto limitado o ningún efecto en los síntomas anémicos, o empeora la anemia (Journal of Hematology & Oncology 2013, 6: 79). Para el mecanismo en el que ruxolitinib empeora la anemia, se considera que las señales de EPO necesarias para la proliferación de células eritrocíticas se suprimen mediante la inhibición de JAK2. Sin embargo, dado que ruxolitinib tiene un cierto efecto terapéutico sobre los síntomas distintos de la anemia en la mielofibrosis, el uso combinado de ruxolitinib y ARNip de TfR2 puede proporcionar un efecto terapéutico beneficioso sobre la anemia en la mielofibrosis. El uso en combinación con un inhibidor de JAK2 que no sea ruxolitinib también puede proporcionar un efecto terapéutico beneficioso sobre la anemia en la mielofibrosis. Ejemplos del otro inhibidor de JAK2 incluyen fedratinib, pacritinib y momelotinib.

Cuando el oligonucleótido de la presente invención se usa en combinación con otros agentes farmacológicos, el momento de la administración del iARN-oligonucleótido de la

presente invención no se limita siempre que se muestre el efecto de la presente invención. Se puede administrar simultáneamente con el otro agente farmacológico usado en combinación, o se puede administrar antes o después de la administración del otro agente farmacológico usado en combinación. Los ejemplos del agente farmacológico que se puede

5 usar en combinación con el ARNi-oligonucleótido de la presente invención incluyen otros fármacos para tratar la anemia, o fármacos para tratar una enfermedad que provoca anemia. Los ejemplos de otro fármaco para tratar la anemia incluyen ESA, un inhibidor del factor inducible por hipoxia prolin hidroxilasa (HIFPHD), un suplemento oral de hierro, un suplemento intravenoso de hierro, danazol y luspatercept. Ejemplos de ESA incluyen epoetina alfa,

10 epoetina beta, epoetina beta pegol, epoetina kappa o darbepoetina alfa. Los ejemplos de un inhibidor de HIFPHD incluyen roxadustat, vadadustat, daprodustat, enarodustat y molidustat. Los ejemplos de un suplemento de hierro oral incluyen citrato ferroso, citrato férrico, fumarato ferroso, pirofosfato férrico soluble y sulfuro de hierro seco. Los ejemplos de un suplemento intravenoso de hierro incluyen carboximaltosa férrica y óxido de hierro que contiene azúcar.

15 Los ejemplos de un fármaco para tratar una enfermedad que provoca anemia incluyen un fármaco para tratar la mielofibrosis, un fármaco para tratar el síndrome mielodisplásico, un fármaco para tratar la enfermedad renal crónica o un agente anticáncer. Los ejemplos de un fármaco para tratar la mielofibrosis incluyen un inhibidor de JAK2. Los ejemplos de un inhibidor de JAK2 incluyen ruxolitinib, fedratinib, pacritinib y momelotinib. Se prefiere su uso

20 en combinación con ruxolitinib. Los ejemplos de un fármaco para tratar el síndrome mielodisplásico incluyen azacitidina y lenalidomida. Se prefiere su uso en combinación con azacitidina o lenalidomida. Los ejemplos de un fármaco para tratar la enfermedad renal crónica incluyen un inhibidor de SGLT2 (cotransportador de glucosa de sodio 2), un inhibidor del sistema renina-angiotensina (por ejemplo, un antagonista del receptor de angiotensina II

25 (ARB) y un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE)), un antagonista de calcio, un fármaco diurético, un fármaco para tratar la diabetes, un fármaco para tratar la hiperlipidemia, un esteroide o un fármaco inmunosupresor. Los ejemplos del agente anticancerígeno incluyen un fármaco quimioterapéutico. Los ejemplos de un fármaco quimioterapéutico incluyen cisplatino, carboplatino, doxorubicina, paclitaxel y amrubicina.

30 El oligonucleótido de la presente invención se puede usar en combinación con un fármaco para tratar el trastorno por sobrecarga de hierro. Cuando se realiza una transfusión de células sanguíneas para el tratamiento de la anemia, se puede desarrollar un trastorno por sobrecarga de hierro debido a la transfusión frecuente de células sanguíneas. El trastorno por sobrecarga de hierro es una condición patológica provocada por la acumulación de hierro

35 derivado de células sanguíneas transfundidas en tejidos del hígado o del corazón, y puede

producir insuficiencia hepática, insuficiencia cardíaca, diabetes, dolor articular, hipotiroidismo, pérdida de la función hipofisaria, disfunción sexual o similares. Por lo tanto, un fármaco para tratar el trastorno por sobrecarga de hierro se puede usar para tratar o prevenir el trastorno por sobrecarga de hierro en el tratamiento de la anemia, y se puede usar preferiblemente en combinación con el oligonucleótido de la presente invención. Los ejemplos de un fármaco para tratar el trastorno por sobrecarga de hierro incluyen un agente quelante de hierro, y los ejemplos del agente quelante de hierro incluyen Deferasirox, Deferoxamina y Deferiprona.

Ejemplos

(Ejemplos 1 a 82)

10 Cada uno de los compuestos de los Ejemplos 1 a 82 que se muestran en la Tabla 1 es un oligonucleótido de doble hebra que consiste en una región de hebra homosentido y una región de hebra antisentido que son oligonucleótidos que son independientes entre sí. Las regiones complementarias de la región de hebra homosentido y la región de hebra antisentido consisten todas en ARN natural (es decir, A(R), G(R), C(R) y U(R)). Cada enlace entre nucleósidos es un enlace fosfodiéster que no está modificado químicamente. La región de hebra antisentido en el compuesto de cada Ejemplo es un oligonucleótido que tiene una región complementaria que consiste en una secuencia completamente complementaria a cada secuencia diana (secuencia de nucleótidos intercalada entre la posición de inicio y la posición final) que se muestra en la Tabla 1 y en la que dos T(D) consecutivos se unen como una estructura saliente al extremo 3' de la región complementaria. La región de hebra homosentido en el compuesto de cada Ejemplo es un oligonucleótido que tiene una región complementaria que consiste en una secuencia completamente complementaria a la secuencia de nucleótidos en la región complementaria de la región de hebra antisentido correspondiente y en la que dos T(D) consecutivos se unen como una estructura saliente al extremo 3' de la región complementaria. En el compuesto del Ejemplo 61, los 19 pares de base en AD-47826 que es ARN_{ip} para TfR2 humano (hTfR2) que se muestra en WO 2012/177921 son ARN natural, y dos T(D) consecutivos se unen como una estructura saliente al extremo 3' de cada una de la región de hebra homosentido y la región de hebra antisentido.

30 Los compuestos de la Tabla 1 se sintetizaron usando un método de fosforamidita (Nucleic Acids Research, 12, 4539 (1984), Nature Communications 6, número de artículo: 6317 (2015)). El compuesto de cada Ejemplo se identificó por espectrometría de masas ESI de iones negativos. La Tabla 1 muestra los resultados. En el compuesto de cada Ejemplo, una región de hebra homosentido y una región de hebra antisentido, cada una de las cuales

se había sintetizado por separado, se pusieron en cantidades equimolares en un tubo, y se hibridaron, y luego se confirmó que formaban un oligonucleótido de doble hebra usando un gel no modificado.

Tabla 1-1

Ejemplo	Nombre del compuesto	Posición inicial de la secuencia diana	Posición final de la secuencia diana	Peso molecular de la región de la hebra homosenrido	Peso molecular de la región de la hebra antisenrido
1	TfR2-001	2657	2675	6646,37	6649,27
2	TfR2-002	1114	1132	6624,72	6685,04
3	TfR2-003	399	417	6734,91	6548,29
4	TfR2-004	2157	2175	6652,11	6629,77
5	TfR2-005	2497	2515	6583,01	6715,25
6	TfR2-006	1669	1687	6667,45	6628,97
7	TfR2-007	2543	2561	6551,67	6733,92
8	TfR2-008	918	936	6653,14	6628,17
9	TfR2-009	2658	2676	6644,50	6633,72
10	TfR2-010	2180	2198	6559,74	6722,03
11	TfR2-011	1446	1464	6563,57	6729,86
12	TfR2-012	1843	1861	6752,25	6540,43
13	TfR2-013	1236	1254	6692,84	6605,73
14	TfR2-014	1824	1842	6552,53	6748,08

15	TfR2-015	2667	2685	6734,68	6550,24
16	TfR2-016	1042	1060	6480,05	6820,56
17	TfR2-017	2659	2677	6607,34	6678,06
18	TfR2-018	2680	2698	6611,58	6669,11
19	TfR2-019	2847	2865	6655,76	6613,08
20	TfR2-020	2544	2562	6529,26	6757,86
21	TfR2-021	2181	2199	6520,08	6760,85
22	TfR2-022	1671	1689	6649,91	6645,88
23	TfR2-023	1788	1806	6518,94	6777,18
24	TfR2-024	1233	1251	6706,11	6605,52
25	TfR2-025	2499	2517	6564,16	6716,94
26	TfR2-026	2422	2440	6654,04	6611,86
27	TfR2-027	1141	1159	6695,40	6621,10
28	TfR2-028	2175	2193	6682,89	6631,59
29	TfR2-029	1837	1855	6696,91	6583,11
30	TfR2-030	2534	2552	6523,62	6771,59
31	TfR2-031	1787	1805	6559,13	6752,32
32	TfR2-032	917	935	6666,78	6630,22
33	TfR2-033	2636	2654	6643,05	6656,46
34	TfR2-034	894	912	6626,34	6667,53
35	TfR2-035	2145	2163	6671,56	6621,64

Tabla 1-2

Ejemplo	Nombre del compuesto	Posición inicial de la secuencia diana	Posición final de la secuencia diana	Peso molecular de la región de la hebra homosenrido	Peso molecular de la región de la hebra antisenido
36	TfR2-036	1308	1326	6625,92	6667,59
37	TfR2-037	2645	2663	6628,83	6668,09
38	TfR2-038	2824	2842	6764,86	6546,52
39	TfR2-039	1536	1554	6652,30	6646,75
40	TfR2-040	1841	1859	6778,08	6502,47
41	TfR2-041	2545	2563	6523,60	6740,06
42	TfR2-042	504	522	6695,27	6620,27
43	TfR2-043	93	111	6565,85	6746,68
44	TfR2-044	414	432	6643,58	6649,31
45	TfR2-045	415	433	6620,18	6691,65
46	TfR2-046	2143	2161	6670,24	6661,91
47	TfR2-047	1743	1761	6645,61	6666,08
48	TfR2-048	1998	2016	6689,93	6641,90
49	TfR2-049	1845	1863	6677,87	6606,31
50	TfR2-050	1842	1860	6780,09	6501,11
51	TfR2-051	1069	1087	6543,54	6773,30

52	TfR2-052	1742	1760	6672,60	6628,87
53	TfR2-053	2646	2664	6627,88	6673,84
54	TfR2-054	1623	1641	6623,58	6676,32
55	TfR2-055	2425	2443	6660,18	6610,74
56	TfR2-056	2423	2441	6675,54	6590,43
57	TfR2-057	2634	2652	6630,83	6670,68
58	TfR2-058	64	82	6701,99	6600,48
59	TfR2-059	1585	1603	6652,70	6631,57
60	TfR2-060	1668	1686	6687,20	6631,76
61	TfR2-061	241	259	6610,06	6701,54
62	TfR2-062	1746	1764	6567,92	6732,37
63	TfR2-063	2004	2022	6671,13	6645,01
64	TfR2-064	396	414	6696,31	6588,21
65	TfR2-065	1748	1766	6565,91	6732,86
66	TfR2-066	2800	2818	6605,37	6707,92
67	TfR2-067	397	415	6696,17	6593,60
68	TfR2-068	306	324	6557,51	6786,94
69	TfR2-069	1234	1252	6708,31	6607,12
70	TfR2-070	2427	2445	6660,36	6593,84

Tabla 1-3

Ejemplo	Nombre del compuesto	Posición inicial de la secuencia diana	Posición final de la secuencia diana	Peso molecular de la región de la hebra homosentido	Peso molecular de la región de la hebra antisentido
71	TfR2-071	2681	2699	6589,66	6709,78
72	TfR2-072	2799	2817	6605,45	6709,89
73	TfR2-073	465	483	6624,81	6692,06
74	TfR2-074	1312	1330	6591,52	6696,28
75	TfR2-075	1687	1705	6671,36	6632,90
76	TfR2-076	2553	2571	6551,07	6701,44
77	TfR2-077	2684	2702	6535,41	6751,70
78	TfR2-078	994	1012	6764,41	6547,17
79	TfR2-079	1789	1807	6559,74	6737,30
80	TfR2-080	66	84	6676,65	6641,69
81	TfR2-081	1468	1486	6719,88	6610,66
82	TfR2-082	2647	2665	6631,34	6671,27

La "posición de inicio de la secuencia diana" y la "posición final de la secuencia diana" en las tablas indican cada una la posición de una base en la secuencia de nucleótidos del ARNm de TfR2 humano expuesta como SEQ ID NO: 1. El compuesto de cada Ejemplo es un oligonucleótido de hebra doble cuya secuencia diana es una secuencia de nucleótidos intercalada entre la posición de inicio y la posición final. Es decir, en cada Ejemplo, la región de hebra antisentido tiene una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos intercalada entre la posición de inicio y la posición final de la secuencia diana, y la región de hebra homosentido tiene una secuencia complementaria a la región de hebra antisentido.

Por ejemplo, en el compuesto del Ejemplo 19 (TfR2-019), la secuencia de la región complementaria de la región de hebra homosentido es 5' CGUGGAGUUUCAUAUCAA 3' (SEQ ID NO: 43), y la secuencia de la región complementaria de la región de hebra antisentido es 5' UUGAUUAUUGAAACUCCACG 3' (SEQ ID NO: 44). En el compuesto del Ejemplo 39 (TfR2-039), la secuencia de la región complementaria de la región de hebra homosentido es 5' ACCUCAAGCCGUAGUGUA 3' (SEQ ID NO: 45), y la secuencia de la región complementaria de la región de hebra antisentido es 5' UACACUACGGCUUUGAGGU 3' (SEQ ID NO: 46). Dos T(D) consecutivas se unen como una estructura saliente al extremo 3' de la región complementaria en cada una de la región de hebra homosentido y la región de hebra antisentido del compuesto de cada Ejemplo en la Tabla 1. El residuo en cada una de la posición 5' del nucleótido en el extremo 5' y la posición 3' del nucleótido en el extremo 3' de cada oligonucleótido es un grupo hidroxilo en el que un átomo de hidrógeno está unido a un átomo de oxígeno en el diagrama estructural anterior de cada nucleósido. El "peso molecular" en las tablas indica un valor medido por espectrometría de masas ESI de iones negativos.

(Ejemplos 83 a 184)

Cada uno de los compuestos de los Ejemplos 83 a 133 que se muestran en la Tabla 2 es un oligonucleótido de hebra individual en el que el residuo en la posición 3' (posición 2' en el caso de un nucleótido modificado en la posición 3') del nucleótido en el extremo 3' de la región de hebra homosentido y el residuo en la posición 5' del nucleótido en el extremo 5' de la región de hebra antisentido están conectados por un ligador representado por la fórmula (Z) anterior. La región complementaria de la región de hebra homosentido y la región complementaria de la región de hebra antisentido forman una estructura de doble hebra. Cada uno de los compuestos de los Ejemplos 134 a 184 que se muestran en la Tabla 3 es un oligonucleótido de doble hebra que tiene una región de hebra homosentido y una región de hebra antisentido que son oligonucleótidos que son independientes entre sí.

Los compuestos del Ejemplo 180 (TfR2-019. 94DUG. s1) y Ejemplo 181 (TfR2-019. 94DUG. s2) son ARNip en el que cada una de las estructuras protuberantes en el extremo 3' de las regiones de hebra antisentido en el compuesto del Ejemplo 169 (TfR2-019. 94DUG) es un nucleótido, o no está presente. Los compuestos del Ejemplo 182 (TfR2-019. 94DUG. e1) y Ejemplo 183 (TfR2-019. 94DUG. e2) son ARNip que se dirige a una secuencia obtenida extendiendo la secuencia diana en el compuesto del Ejemplo 19 (TfR2-019) (es decir, la secuencia de las posiciones 2847 a 2865 en SEQ ID NO: 1) hacia el lado del extremo 5' por 1

o 2 nucleótidos en longitud de hebra (es decir, la secuencia 2846 a 2865 y la secuencia 2845 a 2865, respectivamente, de SEQ ID NO: 1), y tienen longitudes de hebra de región complementaria de 20 pb y 21 pb, respectivamente. El compuesto del Ejemplo 184 (TfR2-019. 94DUG. e3) es ARNip en el que la estructura saliente en el extremo 3' de la región de hebra antisentido en el compuesto del Ejemplo 169 (TfR2-019. 94DUG) es G(M)U(M).

Los compuestos de los Ejemplos 83 a 184 que se muestran en las Tablas 2 y 3 se sintetizaron de la misma manera que en los Ejemplos 1 a 82. DMT-etano-Diol fosforamidita (ChemGene, Número de catálogo: CLP-2250) en la síntesis de la porción "2" y un método descrito en WO 2012/074038, el Ejemplo 12 se usó en la síntesis de la porción "Z" en la secuencia. La porción "2'-O-metilnucleósido" se sintetizó usando una fosforamidita descrita en Nucleic Acids Research 17, 3373 (1989). La porción "ADN" se sintetizó usando una fosforamidita descrita en Nucleic Acids Research 11, 4539 (1984). La porción "3'-O-metilnucleósido" se sintetizó usando 3'-O-metil adenosina (n-bz) CED fosforamidita (ChemGene, Número de catálogo: ANP-2901), 3'-O-metil citidina (n-bz) CED fosforamidita (ChemGene, Núm. de catálogo: ANP-2902), 3'-O-metil guanosina (n-ibu) CED fosforamidita (ChemGene, Núm. de catálogo: ANP-2903), o 3'-O-metil uridina CED fosforamidita (ChemGene, Núm. de catálogo: ANP-2904). La porción "2'-O,4'-C-metilennucleósido" se sintetizó usando una fosforamidita descrita en WO 99/14226. La porción "2'-desoxi-2'-fluoronucleósido" se sintetizó usando una fosforamidita descrita en J. Med. Chem. 36, 831 (1993). La porción "2'-O-metoxietilnucleósido" se sintetizó usando una fosforamidita descrita en Helv. Chim. Acta 78, 486-504 (1995). La porción "GN" se sintetizó usando una fosforamidita descrita en WO 2019/172286, Ejemplo de Referencia 41. Para los compuestos de los Ejemplos 134 a 179, la secuencia de nucleótidos de la región de hebra homosentido se muestra en las Tablas 3-1 a 3-5, y la secuencia de nucleótidos de la región de hebra antisentido se muestra en las Tablas 3-6 a 3-10. Para los compuestos de los Ejemplos 180 a 184, la secuencia de nucleótidos de la región de hebra homosentido se muestra en la Tabla 3-11, y la secuencia de nucleótidos de la región de hebra antisentido se muestra en la Tabla 3-12.

En cada uno de los compuestos de los Ejemplos 134 a 184, una región de hebra homosentido y una región de hebra antisentido se colocaron en cantidades equimolares en un tubo, y se hibridaron, y luego se confirmó que formaban un oligonucleótido de doble hebra mediante el uso de un gel no modificado o una HPLC.

Tabla 2-1

Ejemplo	Nombre del compuesto	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Peso molecular	Valor teórico	SEQ ID NO
83	TfR2-003. 5	G(M)^U(M)^G(M)A(M)G(F)G(M)A(F)U(F)G(F)U(M)C(M)A(M)A(M)C(M)U(M)A(M)U(M)G(M)A(M)Z U(M)^C(F)^A(M)U(M)A(M)G(F)U(M)U(F)G(F)A(M)C(M)A(M)U(M)C(F)C(M)U(F)C(M)A(M)C(M)^U(M)^U(M)	13637,49	13635,29	2
84	TfR2-005. 5	G(M)^C(M)^U(M)C(M)C(F)U(M)C(F)G(F)C(F)U(M)U(M)G(M)A(M)A(M)U(M)G(M)A(M)U(M)U(M)Z A(M)^A(F)^U(M)C(M)A(M)U(F)U(M)C(F)A(F)A(M)G(M)C(M)G(M)A(F)G(M)G(F)A(M)G(M)C(M)^U(M)^U(M)	13651,48	13650,29	3
85	TfR2-006. 5	U(M)^G(M)^G(M)G(M)C(F)A(M)G(F)A(F)C(F)U(M)C(M)U(M)C(M)U(M)A(M)U(M)G(M)A(M)A(M)Z U(M)^U(F)^C(M)A(M)U(M)A(F)G(M)A(F)G(F)A(M)G(M)U(M)C(M)U(F)G(M)C(F)C(M)C(M)A(M)^U(M)^U(M)	13647,17	13650,29	4
86	TfR2-022. 5	G(M)^G(M)^C(M)A(M)G(F)A(M)C(F)U(F)C(F)U(M)C(M)U(M)A(M)U(M)G(M)A(M)A(M)C(M)A(M)Z U(M)^G(F)^U(M)U(M)C(M)A(F)U(M)A(F)G(F)A(M)G(M)A(M)G(M)U(F)C(M)U(F)G(M)C(M)C(M)^U(M)^U(M)	13648,50	13650,29	5
87	TfR2-039. 5	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)	13652,26	13650,29	6

		M)C(F)G(F)G(M)C(M)U(M)U(M)U (F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M) ^U(M)			
88	TfR2-046. 5	G(M)^C(M)^G(M)A(M)C(F)U(M)G (F)A(F)C(F)A(M)C(M)G(M)C(M)A(M)U(M)G(M)U(M)A(M)C(M)Z G(M)^U(F)^A(M)C(M)A(M)U(F)G(M)C(F)G(F)U(M)G(M)U(M)C(M)A(F)G(M)U(F)C(M)G(M)C(M)^U(M)^ U(M)	13676,17	13680,29	7
89	TfR2-065. 5	A(M)^G(M)^C(M)A(M)G(F)U(M)G(F)C(F)C(F)U(M)A(M)U(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)C(M)A(M)Z U(M)^G(F)^A(M)A(M)G(M)G(F)A(M)A(F)U(F)A(M)G(M)G(M)C(M)A(F)C(M)U(F)G(M)C(M)U(M)^U(M)^ U(M)	13647,20	13650,29	8
90	TfR2-007. 5	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)U(M)C(F)A(F)U(F)U(M)G(M)C(M)U(M)G(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)C(F)A(M)G(F)C(F)A(M)A(M)U(M)G(M)A(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^ U(M)	13632,75	13635,29	9
91	TfR2-013. 5	G(M)^G(M)^C(M)U(M)A(F)G(M)U (F)G(F)G(F)U(M)C(M)A(M)A(M)C (M)A(M)A(M)U(M)C(M)A(M)Z U(M)^G(F)^A(M)U(M)U(M)G(F)U(M)U(F)G(F)A(M)C(M)C(M)A(M)C(F)U(M)A(F)G(M)C(M)C(M)^U(M)^ U(M)	13648,57	13650,29	10
92	TfR2-019. 5	C(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G (F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z	13617,57	13620,29	11

		U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)			
--	--	--	--	--	--

Tabla 2-2

Ejemplo	Nombre del compuesto	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Peso molecular	Valor teórico	SEQ ID NO
93	TfR2-037.5	A(M)^C(M)^C(M)C(M)U(F)A(M)A(F)U(F)G(F)U(M)G(M)A(M)C(M)G(M)G(M)U(M)C(M)A(M)U(M)Z A(M)^U(F)^G(M)A(M)C(M)C(F)G(M)U(F)C(F)A(M)C(M)A(M)U(M)U(F)A(M)G(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	13652,76	13650,29	12
94	TfR2-076.5	G(M)^C(M)^U(M)G(M)A(F)U(M)C(F)A(F)A(F)U(M)U(M)U(M)C(M)U(M)C(M)A(M)U(M)U(M)A(M)Z U(M)^A(F)^A(M)U(M)G(M)A(F)G(M)A(F)A(F)A(M)U(M)U(M)G(M)A(F)U(M)C(F)A(M)G(M)C(M)^U(M)^U(M)	13602,76	13605,29	13
95	TfR2-077.5	U(M)^A(M)^G(M)C(M)A(F)U(M)C(F)C(F)C(F)U(M)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)C(M)A(M)C(M)A(M)Z U(M)^G(F)^U(M)G(M)A(M)U(F)U(M)G(F)A(F)A(M)G(M)G(M)G(M)A(F)U(M)G(F)C(M)U(M)A(M)^U(M)^U(M)	13632,45	13635,29	14
96	TfR2-081.5	C(M)^U(M)^G(M)G(M)G(F)A(M)C(F)G(F)G(F)U(M)G(M)G(M)U(M)G(M)A(M)C(M)U(M)U(M)U(M)Z A(M)^A(F)^A(M)G(M)U(M)C(F)A(M)C(F)C(F)A(M)C(M)C(M)G(M)U(F)C(M)C(F)C(M)A(M)G(M)^U(M)^U(M)	13682,43	13680,29	15

97	TfR2-061. 5	C(M)^A(M)^G(M)G(M)C(F)A(M)G(F)C(F))C(F)A(M)A(M)A(M)C(M)C(M)U(M)C(M) A(M)U(M)U(M)Z A(M)^A(F)^U(M)G(M)A(M)G(F)G(M)U(F))U(F)U(M)G(M)G(M)C(M)U(F)G(M)C(F) C(M)U(M)G(M)^U(M)^U(M)	13666,44	13665,29	16
98	TfR2-006. 3	U(M)^G(M)^G(M)G(M)C(D)A(M)G(D)A(D)C(D)U(M)C(M)U(M)C(M)U(M)A(M)U(M)G(M)A(M)A(M)Z U(M)^T(D)^C(M)A(M)U(M)A(D)G(M)A(D)G(D)A(M)G(M)U(M)C(M)T(D)G(M)C(D)C(M)C(M)A(M)^U(M)^U(M)	13496,61	13498,37	17
99	TfR2-007. 3	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(D)U(M)C(D)A(D)T(D)U(M)G(M)C(M)U(M)G(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)^T(D)^G(M)A(M)U(M)C(D)A(M)G(D)C(D)A(M)A(M)U(M)G(M)A(D)G(M)A(D)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	13481,10	13483,36	18
100	TfR2-013. 3	G(M)^G(M)^C(M)U(M)A(D)G(M)T(D)G(D)G(D)U(M)C(M)A(M)A(M)C(M)A(M)A(M)U(M)C(M)A(M)Z U(M)^G(D)^A(M)U(M)U(M)G(D)U(M)T(D)G(D)A(M)C(M)C(M)A(M)C(D)U(M)A(D)G(M)C(M)C(M)^U(M)^U(M)	13496,24	13498,40	19
101	TfR2-019. 3	C(M)^G(M)^U(M)G(M)G(D)A(M)G(D)T(D)T(D)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)^T(D)^G(M)A(M)U(M)A(D)U(M)T(D))G(D)A(M)A(M)A(M)C(M)T(D)C(M)C(D) A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	13507,44	13510,47	20
102	TfR2-039. 3	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(D)A(M)A(D)A(D)G(D)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z U(M)^A(D)^C(M)A(M)C(M)T(D)A(M)C(D)	13496,54	13498,37	21

		)G(D)G(M)C(M)U(M)U(M)T(D)G(M)A(D) G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)			
--	--	---	--	--	--

Tabla 2-3

Ejemplo	Nombre del compuesto	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Peso molecular	Valor teórico	SEQ ID NO
103	TfR2-076. 3	G(M)^C(M)^U(M)G(M)A(D)U(M)C(D)A(D)A(D)U(M)U(M)U(M)C(M)U(M)C(M)A(M)U(M)U(M)A(M)Z U(M)^A(D)^A(M)U(M)G(M)A(D)G(M)A(D)A(D)A(M)U(M)U(M)G(M)A(D)U(M)C(D)A(M)G(M)C(M)^U(M)^U(M)	13422,42	13425,29	13
104	TfR2-006. 6	U(M)^G(M)^G(M)G(M)C(F)A(M)G(F)A(F)C(F)U(M)C(M)U(M)C(M)U(M)A(M)U(M)G(M)A(M)A(M)Z U(M)^U(F)^C(M)A(M)U(M)A(F)G(M)A(M)G(F)A(M)G(M)U(M)C(M)U(F)G(M)C(F)C(M)C(M)A(M)^U(M)^U(M)	13661,03	13662,32	4
105	TfR2-007. 6	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)U(M)C(F)A(F)U(F)U(M)G(M)C(M)U(M)G(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)C(F)A(M)G(M)C(F)A(M)A(M)U(M)G(M)A(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	13645,38	13647,32	9
106	TfR2-013. 6	G(M)^G(M)^C(M)U(M)A(F)G(M)U(F)G(F)G(F)U(M)C(M)A(M)A(M)C(M)A(M)A(M)U(M)C(M)A(M)Z U(M)^G(F)^A(M)U(M)U(M)G(F)U(M)U(M)G(F)A(M)C(M)C(M)A(M)C(F)U(M)A(F)G(M)C(M)C(M)^U(M)^U(M)	13661,03	13662,32	10
107	TfR2-019. 6	C(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z	13630,35	13632,32	11

		U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)			
7108	TfR2-039. 6	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(F)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	13660,75	13662,32	6
109	TfR2-076. 6	G(M)^C(M)^U(M)G(M)A(F)U(M)C(F)A(F)A(F)U(M)U(M)U(M)C(M)U(M)C(M)A(M)U(M)U(M)A(M)Z U(M)^A(F)^A(M)U(M)G(M)A(F)G(M)A(M)A(F)A(M)U(M)U(M)G(M)A(F)U(M)C(F)A(M)G(M)C(M)^U(M)^U(M)	13615,42	13617,32	13
110	TfR2-039. 8	A(D)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(F)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	13635,56	13632,29	6
111	TfR2-039. 9	A(D)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	13633,74	13632,29	6
112	TfR2-039. 10	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z T(D)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(F)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	13636,50	13634,29	22

113	TfR2-039. 11	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F))G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M))G(M)U(M)A(M)Z T(D)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M))G(F)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F) G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	13649,50	13646,32	22
-----	-----------------	--	----------	----------	----

Tabla 2-4

Ejemplo	Nombre del compuesto	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Peso molecular	Valor teórico	SEQ ID NO
114	TfR2-039. 12	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F))G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M))G(M)U(M)A(M)Z T(D)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M))G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F) G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	13650,20	13646,32	22
115	TfR2-019. 8	C(D)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F) U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M) U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M) G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F) A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	13605,92	13602,29	11
116	TfR2-019. 9	C(D)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F) U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M) U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F) G(M)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F) A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	13599,79	13602,29	11
117	TfR2-019. 15	C(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F) T(D)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M) U(M)C(M)^A(M)^A(D)Z U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M) G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C	13633,59	13630,46	23

		(F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)			
118	TfR2-019. 17	C(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U (F)T(D)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M) U(M)C(M)^A(M)^A(D)Z U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(M)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C (F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	13634,22	13630,46	23
119	TfR2-039. 19	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U (M)G(M)U(M)A(M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M) A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	13675,42	13674,35	6
120	TfR2-039. 20	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U (M)G(M)U(M)A(M)Z T(D)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M) A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	13662,17	13658,35	22
121	TfR2-039. 21	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U (M)G(M)U(M)A(3M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(F)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A (F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	13650,03	13650,29	6
122	TfR2-039. 22	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U (M)G(M)U(M)A(3M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(F)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A (F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	13663,25	13662,32	6
123	TfR2-039. 23	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U	13664,40	13662,32	6

		(M)G(M)U(M)A(3M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)			
124	TfR2-039. 24	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(3M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	13669,00	13674,35	6

Tabla 2-5

Ejemplo	Nombre del compuesto	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Peso molecular	Valor teórico	SEQ ID NO
125	TfR2-039. 25	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(3M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(M)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	13690,27	13686,38	6
126	TfR2-039. 26	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(3M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(M)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	13687,73	13686,38	6
127	TfR2-039. 5G	GNA(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(F)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	14554,80	14547,45	6

128	TfR2-019. 6G	GNC(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	14536,80	14529,45	11
129	TfR2-019. 22	C(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(3M)Z U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	13632,67	13632,32	11
130	TfR2-019. 22s	C(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)^Z U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	13679,53	13680,53	11
131	AD47882. 5G	GNC(M)^C(M)^A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M)C(M)U(M)Z A(M)^G(F)^A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(F)G(F)A(M)A(M)U(M)C(M)A(F)C(M)G(F)U(M)G(M)G(M)^U(M)^U(M)	14555,13	14554,85	24
132	AD47882. 23G	GNC(M)^C(M)^A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M)C(M)U(3M)Z A(M)^G(F)^A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(F)G(F)A(M)A(M)U(M)C(M)A(F)C(M)G(F)U(M)G(M)G(M)^U(M)^U(M)	14560,47	14559,47	24
133	AD47882. 23sG	GNC(M)^C(M)^A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M)^C(M)^U(3M)^Z A(M)^G(F)^A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(F)G(F)A(M)A(M)U(M)C(M)A(F)C(M)G(F)U(M)G(M)G(M)^U(M)^U(M)	14615,25	14615,08	24

		F)G(M)A(M)A(M)U(M)C(M)A(F)C(M)G (F)U(M)G(M)G(M)^U(M)^U(M)			
--	--	--	--	--	--

Tabla 2-6

Nombre del compuesto	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	SEQ ID NO
TfR2-003.5	G(M)^U(M)^G(M)A(M)G(F)G(M)A(F)U(F)G(F)U(M)C(M)A(M)A(M) C(M)U(M)A(M)U(M)G(M)A(M)Z U(M)^C(F)^A(M)U(M)A(M)G(F)U(M)U(F)G(F)A(M)C(M)A(M)U(M) C(F)C(M)U(F)C(M)A(M)C(M)^U(M)^U(M)	2
TfR2-005.5	G(M)^C(M)^U(M)C(M)C(F)U(M)C(F)G(F)C(F)U(M)U(M)G(M)A(M) A(M)U(M)G(M)A(M)U(M)U(M)Z A(M)^A(F)^U(M)C(M)A(M)U(F)U(M)C(F)A(F)A(M)G(M)C(M)G(M) A(F)G(M)G(F)A(M)G(M)C(M)^U(M)^U(M)	3
TfR2-006.5	U(M)^G(M)^G(M)G(M)C(F)A(M)G(F)A(F)C(F)U(M)C(M)U(M)C(M) U(M)A(M)U(M)G(M)A(M)A(M)Z U(M)^U(F)^C(M)A(M)U(M)A(F)G(M)A(F)G(F)A(M)G(M)U(M)C(M) U(F)G(M)C(F)C(M)C(M)A(M)^U(M)^U(M)	4
TfR2-022.5	G(M)^G(M)^C(M)A(M)G(F)A(M)C(F)U(F)C(F)U(M)C(M)U(M)A(M) U(M)G(M)A(M)A(M)C(M)A(M)Z U(M)^G(F)^U(M)U(M)C(M)A(F)U(M)A(F)G(F)A(M)G(M)A(M)G(M) U(F)C(M)U(F)G(M)C(M)C(M)^U(M)^U(M)	5
TfR2-039.5	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M) A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(F)G(M)C(M)U(M)U(M) U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	6
TfR2-046.5	G(M)^C(M)^G(M)A(M)C(F)U(M)G(F)A(F)C(F)A(M)C(M)G(M)C(M) A(M)U(M)G(M)U(M)A(M)C(M)Z G(M)^U(F)^A(M)C(M)A(M)U(F)G(M)C(F)G(F)U(M)G(M)U(M)C(M) A(F)G(M)U(F)C(M)G(M)C(M)^U(M)^U(M)	7
TfR2-065.5	A(M)^G(M)^C(M)A(M)G(F)U(M)G(F)C(F)C(F)U(M)A(M)U(M)U(M) C(M)C(M)U(M)U(M)C(M)A(M)Z U(M)^G(F)^A(M)A(M)G(M)G(F)A(M)A(F)U(F)A(M)G(M)G(M)C(M) A(F)C(M)U(F)G(M)C(M)U(M)^U(M)^U(M)	8

TfR2-007.5	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)U(M)C(F)A(F)U(F)U(M)G(M)C(M)U(M) G(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)C(F)A(M)G(F)C(F)A(M)A(M)U(M)G(M) A(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	9
------------	---	---

Tabla 2-7

Nombre del compuesto	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	SEQ ID NO
TfR2-013.5	G(M)^G(M)^C(M)U(M)A(F)G(M)U(F)G(F)G(F)U(M)C(M)A(M)A(M))C(M)A(M)A(M)U(M)C(M)A(M)Z U(M)^G(F)^A(M)U(M)U(M)G(F)U(M)U(F)G(F)A(M)C(M)C(M)A(M) C(F)U(M)A(F)G(M)C(M)C(M)^U(M)^U(M)	10
TfR2-019.5	C(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M) U(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M) U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	11
TfR2-037.5	A(M)^C(M)^C(M)C(M)U(F)A(M)A(F)U(F)G(F)U(M)G(M)A(M)C(M) G(M)G(M)U(M)C(M)A(M)U(M)Z A(M)^U(F)^G(M)A(M)C(M)C(F)G(M)U(F)C(F)A(M)C(M)A(M)U(M) U(F)A(M)G(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	12
TfR2-076.5	G(M)^C(M)^U(M)G(M)A(F)U(M)C(F)A(F)A(F)U(M)U(M)U(M)C(M) U(M)C(M)A(M)U(M)U(M)A(M)Z U(M)^A(F)^A(M)U(M)G(M)A(F)G(M)A(F)A(F)A(M)U(M)U(M)G(M) A(F)U(M)C(F)A(M)G(M)C(M)^U(M)^U(M)	13
TfR2-077.5	U(M)^A(M)^G(M)C(M)A(F)U(M)C(F)C(F)C(F)U(M)U(M)C(M)A(M) A(M)U(M)C(M)A(M)C(M)A(M)Z U(M)^G(F)^U(M)G(M)A(M)U(F)U(M)G(F)A(F)A(M)G(M)G(M)G(M))A(F)U(M)G(F)C(M)U(M)A(M)^U(M)^U(M)	14
TfR2-081.5	C(M)^U(M)^G(M)G(M)G(F)A(M)C(F)G(F)G(F)U(M)G(M)G(M)U(M))G(M)A(M)C(M)U(M)U(M)U(M)Z A(M)^A(F)^A(M)G(M)U(M)C(F)A(M)C(F)C(F)A(M)C(M)C(M)G(M) U(F)C(M)C(F)C(M)A(M)G(M)^U(M)^U(M)	15
TfR2-061.5	C(M)^A(M)^G(M)G(M)C(F)A(M)G(F)C(F)C(F)A(M)A(M)A(M)C(M)	16

	C(M)U(M)C(M)A(M)U(M)U(M)Z A(M)^A(F)^U(M)G(M)A(M)G(F)G(M)U(F)U(F)U(M)G(M)G(M)C(M) U(F)G(M)C(F)C(M)U(M)G(M)^U(M)^U(M)	
TfR2-006.3	U(M)^G(M)^G(M)G(M)C(D)A(M)G(D)A(D)C(D)U(M)C(M)U(M)C(M) U(M)A(M)U(M)G(M)A(M)A(M)Z U(M)^T(D)^C(M)A(M)U(M)A(D)G(M)A(D)G(D)A(M)G(M)U(M)C(M) T(D)G(M)C(D)C(M)C(M)A(M)^U(M)^U(M)	17

Tabla 2-8

Nombre del compuesto	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	SEQ ID NO
TfR2-007.3	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(D)U(M)C(D)A(D)T(D)U(M)G(M)C(M)U(M) G(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)^T(D)^G(M)A(M)U(M)C(D)A(M)G(D)C(D)A(M)A(M)U(M)G(M) A(D)G(M)A(D)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	18
TfR2-013.3	G(M)^G(M)^C(M)U(M)A(D)G(M)T(D)G(D)G(D)U(M)C(M)A(M)A(M) C(M)A(M)A(M)U(M)C(M)A(M)Z U(M)^G(D)^A(M)U(M)U(M)G(D)U(M)T(D)G(D)A(M)C(M)C(M)A(M) C(D)U(M)A(D)G(M)C(M)C(M)^U(M)^U(M)	19
TfR2-019.3	C(M)^G(M)^U(M)G(M)G(D)A(M)G(D)T(D)T(D)U(M)C(M)A(M)A(M) U(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)^T(D)^G(M)A(M)U(M)A(D)U(M)T(D)G(D)A(M)A(M)A(M)C(M) T(D)C(M)C(D)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	20
TfR2-039.3	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(D)A(M)A(D)A(D)G(D)C(M)C(M)G(M)U(M) A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z U(M)^A(D)^C(M)A(M)C(M)T(D)A(M)C(D)G(D)G(M)C(M)U(M)U(M) T(D)G(M)A(D)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	21
TfR2-076.3	G(M)^C(M)^U(M)G(M)A(D)U(M)C(D)A(D)A(D)U(M)U(M)U(M)C(M) U(M)C(M)A(M)U(M)U(M)A(M)Z U(M)^A(D)^A(M)U(M)G(M)A(D)G(M)A(D)A(D)A(M)U(M)U(M)G(M) A(D)U(M)C(D)A(M)G(M)C(M)^U(M)^U(M)	13
TfR2-006.6	U(M)^G(M)^G(M)G(M)C(F)A(M)G(F)A(F)C(F)U(M)C(M)U(M)C(M) U(M)A(M)U(M)G(M)A(M)A(M)Z U(M)^U(F)^C(M)A(M)U(M)A(F)G(M)A(M)G(F)A(M)G(M)U(M)C(M)	4

	)U(F)G(M)C(F)C(M)C(M)A(M)^U(M)^U(M)	
TfR2-007.6	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)U(M)C(F)A(F)U(F)U(M)G(M)C(M)U(M) G(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)C(F)A(M)G(M)C(F)A(M)A(M)U(M)G(M))A(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	9
TfR2-013.6	G(M)^G(M)^C(M)U(M)A(F)G(M)U(F)G(F)G(F)U(M)C(M)A(M)A(M) C(M)A(M)A(M)U(M)C(M)A(M)Z U(M)^G(F)^A(M)U(M)U(M)G(F)U(M)U(M)G(F)A(M)C(M)C(M)A(M))C(F)U(M)A(F)G(M)C(M)C(M)^U(M)^U(M)	10

Tabla 2-9

Nombre del compuesto	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	SEQ ID NO
TfR2-019.6	C(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M) U(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M) U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	11
TfR2-039.6	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M) A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(F)G(M)C(M)U(M)U(M))U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	6
TfR2-076.6	G(M)^C(M)^U(M)G(M)A(F)U(M)C(F)A(F)A(F)U(M)U(M)U(M)C(M) U(M)C(M)A(M)U(M)U(M)A(M)Z U(M)^A(F)^A(M)U(M)G(M)A(F)G(M)A(M)A(F)A(M)U(M)U(M)G(M) A(F)U(M)C(F)A(M)G(M)C(M)^U(M)^U(M)	13
TfR2-039.8	A(D)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M) A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(F)G(M)C(M)U(M)U(M))U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	6
TfR2-039.9	A(D)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M) A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M))U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	6

TfR2-039.10	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M) A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z T(D)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(F)G(M)C(M)U(M)U(M) U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	22
TfR2-039.11	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M) A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z T(D)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(F)G(M)C(M)U(M)U(M) U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	22
TfR2-039.12	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M) A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z T(D)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M) U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	22

Tabla 2-10

Nombre del compuesto	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	SEQ ID NO
TfR2-019.8	C(D)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M) U(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M) U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	11
TfR2-019.9	C(D)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M) U(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(M)A(M)A(M)A(M)C(M) U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	11
TfR2-019.15	C(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)T(D)U(M)C(M)A(M)A(M) U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(D)Z U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M) U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	23
TfR2-019.17	C(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)T(D)U(M)C(M)A(M)A(M) U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(D)Z U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(M)A(M)A(M)A(M)C(M) U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	23
TfR2-039.19	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M) A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z	6

	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M))U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	
TfR2-039.20	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M) A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z T(D)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M))U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	22
TfR2-039.21	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M) A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(3M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(F)G(M)C(M)U(M)U(M) U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	6
TfR2-039.22	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M) A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(3M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(F)G(M)C(M)U(M)U(M))U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	6

Tabla 2-11

Nombre del compuesto	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	SEQ ID NO
TfR2-039.23	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M) A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(3M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M))U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	6
TfR2-039.24	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M) A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(3M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M))U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	6
TfR2-039.25	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M) A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(3M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(M)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M))U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	6
TfR2-039.26	A(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M) A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(3M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M))U(F)G(M)A(M)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	6

TfR2-039.5G	GNA(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(F)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	6
TfR2-019.6G	GNC(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	11
TfR2-019.22	C(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(3M)Z U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	11
TfR2-019.22s	C(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)^Z U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	11

Tabla 2-12

Nombre del compuesto	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	SEQ ID NO
AD47882.5G	GNC(M)^C(M)^A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M)C(M)U(M)Z A(M)^G(F)^A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(F)G(F)A(M)A(M)U(M)C(M)A(F)C(M)G(F)U(M)G(M)G(M)^U(M)^U(M)	24
AD47882.23G	GNC(M)^C(M)^A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M)C(M)U(3M)Z A(M)^G(F)^A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(F)G(F)A(M)A(M)U(M)C(M)A(F)C(M)G(F)U(M)G(M)G(M)^U(M)^U(M)	24
AD47882.23sG	GNC(M)^C(M)^A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M)^C(M)^U(3M)^Z A(M)^G(F)^A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(F)G(M)A(M)A(M)U(M)C(M)A(F)C(M)G(F)U(M)G(M)G(M)^U(M)^U(M)	24

Tabla 3-1

Ejemplo	Nombre del compuesto	Nombre del filamento sensorial	Secuencia de nucleótidos de la región de hebra homosenrido (5'-3')	Peso molecular	Valor teórico	SEQ ID NO
134	TfR2-039. 28DU	TfR2-039. 28S	A(D)^C(E)^C(M)U(M)C(F) A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M) G(M)U(M)A(M)G(M)U(M) G(M)^U(M)^A(M)	6325,17	6323,42	25
135	TfR2-039. 29DU	TfR2-039. 29S	A(D)^C(M)^C(E)U(M)C(F) A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M) G(M)U(M)A(M)G(M)U(M) G(M)^U(M)^A(M)	6323,22	6323,42	25
136	TfR2-039. 30DU	TfR2-039. 30S	A(D)^C(M)^C(M)T(E)C(F) A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M) G(M)U(M)A(M)G(M)U(M) G(M)^U(M)^A(M)	6321,96	6323,41	47
137	TfR2-039. 31DU	TfR2-039. 31S	A(D)^C(M)^C(M)U(M)C(E) A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M) G(M)U(M)A(M)G(M)U(M) G(M)^U(M)^A(M)	6336,64	6335,45	25
138	TfR2-039. 32DU	TfR2-039. 32S	A(D)^C(M)^C(M)U(M)C(F) A(E)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M) G(M)U(M)A(M)G(M)U(M) G(M)^U(M)^A(M)	6309,91	6309,39	25
139	TfR2-039. 9DU	TfR2-039. 9S	A(D)^C(M)^C(M)U(M)C(F) A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M) G(M)U(M)A(M)G(M)U(M) G(M)^U(M)^A(M)	6296,13	6297,38	25
140	TfR2-019. 29DU	TfR2-019. 29S	C(D)^G(M)^T(E)G(M)G(F) A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M) A(M)A(M)U(M)A(M)U(M) C(M)^A(M)^A(M)	6322,20	6325,39	26
141	TfR2-019. 34DU	TfR2-019. 34S	C(D)^G(M)^T(E)G(M)G(F) A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M) A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)	6321,49	6325,39	26

			)C(M)^A(M)^A(M)			
142	TfR2-019. 22DU	TfR2-019. 22S	C(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F) A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M))C(M)^A(M)^A(3M)	6330,00	6329,39	27
143	TfR2-019. 22sDU	TfR2-019. 22sS	C(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F) A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M))C(M)^A(M)^A(3M)^2	6470,00	6469,49	27

Tabla 3-2

Ejemplo	Nombre del compuesto	Nombre del filamento sensorial	Secuencia de nucleótidos de la región de hebra homossentido (5'-3')	Peso molecular	Valor teórico	SEQ ID NO
144	TfR2-039. 23DUG	TfR2-039. 23SG	GNA(M)^C(M)^C(M)U(M) C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)^U(M)^A(3M))	7228,28	7228,32	25
145	TfR2-039. 35DUG	TfR2-039. 23SG	GNA(M)^C(M)^C(M)U(M) C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)^U(M)^A(3M))	7228,28	7228,32	25
146	TfR2-039. 36DUG	TfR2-039. 23SG	GNA(M)^C(M)^C(M)U(M) C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)^U(M)^A(3M))	7228,28	7228,32	25
147	TfR2-039. 37DUG	TfR2-039. 23SG	GNA(M)^C(M)^C(M)U(M) C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)^U(M)^A(3M))	7228,28	7228,32	25

			)			
148	TfR2-039. 38DUG	TfR2-039. 23SG	GNA(M)^C(M)^C(M)U(M) C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)^U(M)^A(3M)	7228,28	7228,32	25
149	TfR2-039. 39DUG	TfR2-039. 23SG	GNA(M)^C(M)^C(M)U(M) C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)^U(M)^A(3M)	7228,28	7228,32	25
150	TfR2-039. 40DUG	TfR2-039. 23SG	GNA(M)^C(M)^C(M)U(M) C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)^U(M)^A(3M)	7228,28	7228,32	25
151	TfR2-039. 41DUG	TfR2-039. 23SG	GNA(M)^C(M)^C(M)U(M) C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)^U(M)^A(3M)	7228,28	7228,32	25
152	TfR2-039. 42DUG	TfR2-039. 23SG	GNA(M)^C(M)^C(M)U(M) C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)^U(M)^A(3M)	7228,28	7228,32	25
153	TfR2-039. 43DUG	TfR2-039. 23SG	GNA(M)^C(M)^C(M)U(M) C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)^U(M)^A(3M)	7228,28	7228,32	25
154	TfR2-039. 45DUG	TfR2-039. 23SG	GNA(M)^C(M)^C(M)U(M) C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)^U(M)^A(3M)	7228,28	7228,32	25

			M)U(M)G(M)^U(M)^A(3M))			
--	--	--	----------------------------	--	--	--

Tabla 3-3

Ejemplo	Nombre del compuesto	Nombre del filamento sensorial	Secuencia de nucleótidos de la región de hebra homosen sentido (5'-3')	Peso molecular	Valor teórico	SEQ ID NO
155	TfR2-019. 22DUG	TfR2-019. 22SG	GNC(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)	7230,30	7230,28	27
156	TfR2-019. 36DUG	TfR2-019. 22SG	GNC(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)	7230,30	7230,28	27
157	TfR2-019. 38DUG	TfR2-019. 22SG	GNC(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)	7230,30	7230,28	27
158	TfR2-019. 85DUG	TfR2-019. 22SG	GNC(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)	7230,30	7230,28	27
159	TfR2-019. 86DUG	TfR2-019. 22SG	GNC(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)	7230,30	7230,28	27

160	TfR2-019. 87DUG	TfR2-019. 22SG	GNC(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)	7230,30	7230,28	27
161	TfR2-019. 71DUG	TfR2-019. 22SG	GNC(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)	7230,30	7230,28	27
162	TfR2-019. 88DUG	TfR2-019. 22SG	GNC(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)	7230,30	7230,28	27
163	TfR2-019. 89DUG	TfR2-019. 22SG	GNC(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)	7230,30	7230,28	27
164	TfR2-019. 90DUG	TfR2-019. 22SG	GNC(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)	7230,30	7230,28	27
165	TfR2-019. 80DUG	TfR2-019. 22SG	GNC(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)	7230,30	7230,28	27

Tabla 3-4

Ejemplo	Nombre del compuesto	Nombre del filamento	Secuencia de nucleótidos de la región de hebra	Peso molecular	Valor teórico	SEQ ID NO
---------	----------------------	----------------------	--	----------------	---------------	-----------

			M)U(M)U(M)^C(M)^U(3M))^2			
173	AD47882. 41DUG	AD47882. 23SG	GNC(M)^C(M)^A(M)C(M) G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M)^C(M)^U(3M)	7056,15	7056,20	28
174	AD47882. 88DUG	AD47882. 23SG	GNC(M)^C(M)^A(M)C(M) G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M)^C(M)^U(3M)	7056,15	7056,20	28
175	AD47882. 89DUG	AD47882. 23SG	GNC(M)^C(M)^A(M)C(M) G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M)^C(M)^U(3M)	7056,15	7056,20	28
176	AD47882. 91DUG	AD47882. 23SG	GNC(M)^C(M)^A(M)C(M) G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M)^C(M)^U(3M)	7056,15	7056,20	28

Tabla 3-5

Ejemplo	Nombre del compuesto	Nombre del filamento sensorial	Secuencia de nucleótidos de la región de hebra homosentido (5'-3')	Peso molecular	Valor teórico	SEQ ID NO
177	AD47882. 92DUG	AD47882. 23SG	GNC(M)^C(M)^A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M) U(M)^C(M)^U(3M)	7056,15	7056,20	28
178	AD47882.	AD47882.	GNC(M)^C(M)^A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M) U(M)^C(M)^U(3M)	7056,15	7056,20	28

	93DUG	23SG	F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M)^C(M)^U(3M)			
179	AD47882.94DUG	AD47882.23SG	GNC(M)^C(M)^A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M)^C(M)^U(3M)	7056,15	7056,20	28

Tabla 3-6

Ejemplo	Nombre del compuesto	Nombre de la hebra antisentido	Secuencia de nucleótidos de la región de hebra antisentido (5'-3')	Peso molecular	Valor teórico	SEQ ID NO
134	TfR2-039.28DU	TfR2-039.9AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	6949,20	6949,72	29
135	TfR2-039.29DU	TfR2-039.9AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	6949,20	6949,72	29
136	TfR2-039.30DU	TfR2-039.9AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	6949,20	6949,72	29
137	TfR2-039.31DU	TfR2-039.9AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	6949,20	6949,72	29
138	TfR2-039.	TfR2-039.	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)	6949,20	6949,72	29

	32DU	9AS	U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)			
139	TfR2-039.9DU	TfR2-039.9AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	6949,20	6949,72	29
140	TfR2-019.29DU	TfR2-019.29AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(M)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	6917,88	6917,74	30
141	TfR2-019.34DU	TfR2-019.34AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	6914,60	6917,74	30
142	TfR2-019.22DU	TfR2-019.22AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	6918,0	6917,74	30
143	TfR2-019.22sDU	TfR2-019.22AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	6918,0	6917,74	30

Tabla 3-7

Ejemplo	Nombre del compuesto	Nombre de la hebra antisentido	Secuencia de nucleótidos de la región de hebra antisentido (5'-3')	Peso molecular	Valor teórico	SEQ ID NO
---------	----------------------	--------------------------------	--	----------------	---------------	-----------

144	TfR2-039. 23DUG	TfR2-039. 23AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M) U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F) G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M))	6950,0	6949,72	29
145	TfR2-039. 35DUG	TfR2-039. 35AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M) U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F) G(M)G(M)^U(M)^U(M)^U(M)	6963,03	6965,79	29
146	TfR2-039. 36DUG	TfR2-039. 36AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M) U(F)A(M)C(M)G(M)G(M)C (M)U(F)U(M)U(F)G(M)A(F) G(M)G(M)^U(M)^U(M)^U(M)	6964,35	6965,79	29
147	TfR2-039. 37DUG	TfR2-039. 37AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M) U(F)A(M)C(M)G(M)G(M)C (M)U(F)^U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)^U(M)^U(M)^ U(M)	6977,99	6981,86	29
148	TfR2-039. 38DUG	TfR2-039. 38AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M) U(F)A(M)C(F)G(F)G(M)C(M)U(F)U(M)U(F)G(M)A(F) G(M)G(M)^U(M)^U(M)^U(M)	6942,14	6941,73	29
149	TfR2-039. 39DUG	TfR2-039. 39AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M) U(F)A(M)C(F)G(F)G(M)C(M)U(F)^U(M)U(F)G(M)A(F))G(M)G(M)^U(M)^U(M)^U(M)	6957,52	6957,80	29
150	TfR2-039. 40DUG	TfR2-039. 40AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M) U(F)A(M)C(F)^G(F)^G(M) C(M)U(F)^U(M)U(F)G(M)A (F)G(M)G(M)^U(M)^U(M)^	6987,83	6989,94	29

			U(M)			
151	TfR2-039. 41DUG	TfR2-039. 41AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M) U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)T(D)U(M)U(F)G(M)A(F) G(M)G(M)^U(M)^U(M)^U(M)	6949,06	6949,79	31
152	TfR2-039. 42DUG	TfR2-039. 42AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M) U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)T(D)^U(M)U(F)G(M)A(F))G(M)G(M)^U(M)^U(M)^U(M)	6964,35	6965,86	31
153	TfR2-039. 43DUG	TfR2-039. 43AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M) U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(E)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F) G(M)G(M)^U(M)^U(M)^U(M)	6994,48	6991,83	29
154	TfR2-039. 45DUG	TfR2-039. 45AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M) U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)T(E)U(F)G(M)A(F) G(M)G(M)^U(M)^U(M)^U(M)	6994,74	6991,82	32

Tabla 3-8

Ejemplo	Nombre del compuesto	Nombre de la hebra antisentido	Secuencia de nucleótidos de la región de hebra antisentido (5'-3')	Peso molecular	Valor teórico	SEQ ID NO
155	TfR2-019. 22DUG	TfR2-019. 22AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M) A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F) A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M))	6918,0	6917,74	30
156	TfR2-019. 36DUG	TfR2-019. 36AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M) A(F)U(M)U(M)G(M)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F) A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M))	6929,97	6929,99	30

			M)A(F)C(M)U(F)C(M)C(F) A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)			
157	TfR2-019. 38DUG	TfR2-019. 38AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M) A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M) A(F)C(M)U(F)C(M)C(F) A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	6905,91	6905,95	30
158	TfR2-019. 85DUG	TfR2-019. 85AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M) A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M) A(M)C(E)U(F)C(M)C(F) A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	6955,94	6956,00	30
159	TfR2-019. 86DUG	TfR2-019. 86AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M) A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(E) A(M)C(M)U(F)C(M)C(F) A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	6941,94	6941,99	30
160	TfR2-019. 87DUG	TfR2-019. 87AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M) A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M) A(D)C(M)U(F)C(M)C(F) A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	6899,95	6899,98	30
161	TfR2-019. 71DUG	TfR2-019. 71AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M) A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M) A(D)C(M)T(E)C(M)C(F) A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	6926,06	6925,99	33
162	TfR2-019. 88DUG	TfR2-019. 88AS	U(M)^U(F)^G(M)A(F)U(M) A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M) A(D)C(M)T(E)C(M)C(F) A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	6926,05	6925,99	33
163	TfR2-019.	TfR2-019.	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)	6926,11	6925,99	33

	89DUG	89AS	A(F)U(M)U(M)G(F)A(F)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)			
164	TfR2-019.90DUG	TfR2-019.90AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(F)^G(M)^U(M)^U(M)	6926,00	6925,99	33
165	TfR2-019.80DUG	TfR2-019.80AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)A(M)C(E)U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	6958,09	6957,96	30

Tabla 3-9

Ejemplo	Nombre del compuesto	Nombre de la hebra antisentido	Secuencia de nucleótidos de la región de hebra antisentido (5'-3')	Peso molecular	Valor teórico	SEQ ID NO
166	TfR2-019.91DUG	TfR2-019.91AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(F)A(M)A(M)C(E)U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	6957,96	6957,96	30
167	TfR2-019.92DUG	TfR2-019.92AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(E)U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	6958,07	6957,96	30
168	TfR2-019.93DUG	TfR2-019.93AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(F)C(E)U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	6958,06	6957,96	30

169	TfR2-019. 94DUG	TfR2-019. 94AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M) A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	6935,66	6935,69	30
170	TfR2-019. 95DUG	TfR2-019. 95AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M) A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(F)C(M)U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	6935,68	6935,69	30
171	AD47882. 23DUG	AD47882. 9AS	A(M)^G(F)^A(M)A(M)A(M) G(F)G(M)A(F)G(M)A(M)A(M)U(M)C(M)A(F)C(M)G(F) U(M)G(M)G(M)^U(M)^U(M)	7118,03	7118,12	34
172	AD47882. 23sDUG	AD47882. 9AS	A(M)^G(F)^A(M)A(M)A(M) G(F)G(M)A(F)G(M)A(M)A(M)U(M)C(M)A(F)C(M)G(F) U(M)G(M)G(M)^U(M)^U(M)	7118,03	7118,12	34
173	AD47882. 41DUG	AD47882. 41AS	A(M)^G(F)^A(M)A(M)A(M) G(F)G(M)A(F)G(M)A(M)A(M)T(D)C(M)A(F)C(M)G(F) U(M)G(M)^G(M)^U(M)^U(M)	7119,06	7118,1	35
174	AD47882. 88DUG	AD47882. 88AS	A(M)^G(F)^A(M)A(F)A(M) G(F)G(M)A(M)G(F)A(M)A(M)T(D)C(M)A(E)C(M)G(F) U(M)G(M)^G(M)^U(M)^U(M)	7130,10	7130,10	35
175	AD47882. 89DUG	AD47882. 89AS	A(M)^G(F)^A(M)A(M)A(M) G(F)G(M)A(M)G(F)A(F)A(M)T(D)C(M)A(E)C(M)G(F) U(M)G(M)^G(M)^U(M)^U(M)	7130,11	7130,10	35

			M)			
176	AD47882. 91DUG	AD47882. 91AS	A(M)^G(F)^A(M)A(M)A(M) G(F)G(M)A(M)G(F)A(F)A(M)U(M)C(E)A(R)^C(M)G(F)U(M)G(M)^G(M)^U(M)^ U(M)	7162,09	7162,07	34

Tabla 3-10

Ejemplo	Nombre del compuesto	Nombre de la hebra antisentido	Secuencia de nucleótidos de la región de hebra antisentido (5'-3')	Peso molecular	Valor teórico	SEQ ID NO
177	AD47882. 92DUG	AD47882. 92AS	A(M)^G(F)^A(M)A(M)A(M) G(F)G(M)A(M)G(F)A(M)A(F)U(M)C(E)A(R)^C(M)G(F))U(M)G(M)^G(M)^U(M)^U(M)	7163,08	7162,07	34
178	AD47882. 93DUG	AD47882. 93AS	A(M)^G(F)^A(M)A(M)A(M) G(F)G(M)A(M)G(F)A(M)A(M)U(F)C(E)A(R)^C(M)G(F))U(M)G(M)^G(M)^U(M)^U(M)	7162,05	7162,07	34
179	AD47882. 94DUG	AD47882. 94AS	A(M)^G(F)^A(M)A(M)A(M) G(F)G(M)A(M)G(F)A(M)A(F)U(M)C(M)A(R)^C(M)G(F))U(M)G(M)^G(M)^U(M)^U(M)	7136,04	7136,06	34

Tabla 3-11

Ejemplo	Nombre del compuesto	Nombre del filamento sensorial	Secuencia de nucleótidos de la región de hebra homosentido (5'-3')	Peso molecular	Valor teórico	SEQ ID NO
180	TfR2-019.	TfR2-019.	GNC(M)^G(M)^U(M)G(M)G	7230,30	7230,28	27

	94DUG.s1	22SG	(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M) C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)			
181	TfR2-019. 94DUG.s2	TfR2-019. 22SG	GNC(M)^G(M)^U(M)G(M)G (F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M) C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)	7230,30	7230,28	27
182	TfR2-019. 94DUG.e1	TfR2-019. 22SG.e1	GNG(M)^C(M)^G(M)U(M)G (M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F) U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)	7589,35	7589,35	36
183	TfR2-019. 94DUG.e2	TfR2-019. 22SG.e2	GNG(M)^G(M)^C(M)G(M)U (M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F) U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)	7948,42	7948,41	37
184	TfR2-019. 94DUG.e3	TfR2-019. 22SG	GNC(M)^G(M)^U(M)G(M)G (F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M) C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)	7230,30	7230,28	27

Tabla 3-12

Ejemplo	Nombre del compuesto	Nombre de la hebra antisentido	Secuencia de nucleótidos de la región de hebra antisentido (5'-3')	Peso molecular	Valor teórico	SEQ ID NO
180	TfR2-019.94DUG.s1	TfR2-019.94AS.s1	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)	6599	6599,58	38
181	TfR2-019.94DUG.s2	TfR2-019.94AS.s2	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)	6263	6263,31	39

			M)A(F)A(M)C(M)U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)			
182	TfR2-019.94DUG.e1	TfR2-019.94AS.e1	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^C(M)^U(M)^U(M)	7254	7255,06	40
183	TfR2-019.94DUG.e2	TfR2-019.94AS.e2	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)C(M)^C(M)^U(M)^U(M)	7574	7574,27	41
184	TfR2-019.94DUG.e3	TfR2-019.94AS.e3	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^G(M)^U(M)	6974	6974,88	42

Tabla 3-13

Nombre del filamento sensorial	Secuencia de nucleótidos de la región de hebra homosentido (5'-3')	SEQ ID NO
TfR2-039.28S	A(D)^C(E)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)^U(M)^A(M)	25
TfR2-039.29S	A(D)^C(M)^C(E)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)^U(M)^A(M)	25
TfR2-039.30S	A(D)^C(M)^C(M)T(E)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)^U(M)^A(M)	47
TfR2-039.31S	A(D)^C(M)^C(M)U(M)C(E)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)^U(M)^A(M)	25
TfR2-039.32S	A(D)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(E)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)^U(M)^A(M)	25
TfR2-039.9S	A(D)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)^U(M)^A(M)	25
TfR2-019.29S	C(D)^G(M)^T(E)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)	26

	A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(M)	
TfR2-019.34S	C(D)^G(M)^T(E)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M) A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(M)	26

Tabla 3-14

Nombre del filamento sensorial	Secuencia de nucleótidos de la región de hebra homosenrido (5'-3')	SEQ ID NO
TfR2-019.22S	C(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)	27
TfR2-019.22sS	C(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)^2	27
TfR2-039.23SG	GNA(M)^C(M)^C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)^U(M)^A(3M)	25
TfR2-019.22SG	GNC(M)^G(M)^U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)	27
AD47882.23SG	GNC(M)^C(M)^A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M)^C(M)^U(3M)	28
AD47882.23sSG	GNC(M)^C(M)^A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M)^C(M)^U(3M)^2	28
TfR2-019.22SG.e1	GNG(M)^C(M)^G(M)U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)	36
TfR2-019.22SG.e2	GNG(M)^G(M)^C(M)G(M)U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)^A(M)^A(3M)	37

Tabla 3-15

Nombre de la hebra antisentido	Secuencia de nucleótidos de la región de hebra antisentido (5'-3')	SEQ ID NO
TfR2-039.9AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	29
TfR2-019.29AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(M)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	30
TfR2-019.	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)	30

34AS	)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	
TfR2-019. 22AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M))U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^U(M)^U(M)	30
TfR2-039. 23AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M) U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^U(M)^U(M)	29
TfR2-039. 35AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M) U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)^U(M)^U(M)^U(M)	29
TfR2-039. 36AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(F)U(M) U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)^U(M)^U(M)^U(M)	29
TfR2-039. 37AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(F)^U(M) U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)^U(M)^U(M)^U(M)	29

Tabla 3-16

Nombre de la hebra antisentido	Secuencia de nucleótidos de la región de hebra antisentido (5'-3')	SEQ ID NO
TfR2-039. 38AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(F)G(M)C(M)U(F)U(M)U(F) G(M)A(F)G(M)G(M)^U(M)^U(M)^U(M)	29
TfR2-039. 39AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(F)G(M)C(M)U(F)^U(M) U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)^U(M)^U(M)^U(M)	29
TfR2-039. 40AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)^G(F)^G(M)C(M)U(F)^U(M) U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)^U(M)^U(M)^U(M)	29
TfR2-039. 41AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)T(D)U(M) U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)^U(M)^U(M)^U(M)	31
TfR2-039. 42AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)T(D)^U(M) U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)^U(M)^U(M)^U(M)	31
TfR2-039. 43AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(E)U(M)U(M) U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)^U(M)^U(M)^U(M)	29
TfR2-039. 45AS	U(M)^A(F)^C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)T(E) U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)^U(M)^U(M)^U(M)	32
TfR2-019.	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(M)A(M)A(M)A(F)C(M)	30

36AS	U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	
------	-------------------------------------	--

Tabla 3-17

Nombre de la hebra antisentido	Secuencia de nucleótidos de la región de hebra antisentido (5'-3')	SEQ ID NO
TfR2-019. 38AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)A(F)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	30
TfR2-019. 85AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(E)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	30
TfR2-019. 86AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(E)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	30
TfR2-019. 87AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	30
TfR2-019. 71AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	33
TfR2-019. 88AS	U(M)^U(F)^G(M)A(F)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	33
TfR2-019. 89AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(F)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	33
TfR2-019. 90AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(F)^G(M)^U(M)^U(M)	33

Tabla 3-18

Nombre de la hebra antisentido	Secuencia de nucleótidos de la región de hebra antisentido (5'-3')	SEQ ID NO
TfR2-019. 80AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)A(M)C(E)U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	30
TfR2-019. 91AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(F)A(M)A(M)C(E)U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	30
TfR2-019.	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(E)	30

92AS	U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	
TfR2-019. 93AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(F)C(E) U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	30
TfR2-019. 94AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M) U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	30
TfR2-019. 95AS	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(F)C(M) U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)^U(M)	30
AD47882. 9AS	A(M)^G(F)^A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(F)G(M)A(M)A(M)U(M)C(M))A(F)C(M)G(F)U(M)G(M)G(M)^U(M)^U(M)	34
AD47882. 41AS	A(M)^G(F)^A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(F)G(M)A(M)A(M)T(D)C(M) A(F)C(M)G(F)U(M)G(M)^G(M)^U(M)^U(M)	35

Tabla 3-19

Nombre de la hebra antisentido	Secuencia de nucleótidos de la región de hebra antisentido (5'-3')	SEQ ID NO
AD47882. 88AS	A(M)^G(F)^A(M)A(F)A(M)G(F)G(M)A(M)G(F)A(M)A(M)T(D)C(M)A (E)C(M)G(F)U(M)G(M)^G(M)^U(M)^U(M)	35
AD47882. 89AS	A(M)^G(F)^A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(M)G(F)A(F)A(M)T(D)C(M)A (E)C(M)G(F)U(M)G(M)^G(M)^U(M)^U(M)	35
AD47882. 91AS	A(M)^G(F)^A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(M)G(F)A(F)A(M)U(M)C(E)A (R)^C(M)G(F)U(M)G(M)^G(M)^U(M)^U(M)	34
AD47882. 92AS	A(M)^G(F)^A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(M)G(F)A(M)A(F)U(M)C(E)A (R)^C(M)G(F)U(M)G(M)^G(M)^U(M)^U(M)	34
AD47882. 93AS	A(M)^G(F)^A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(M)G(F)A(M)A(M)U(F)C(E)A (R)^C(M)G(F)U(M)G(M)^G(M)^U(M)^U(M)	34
AD47882. 94AS	A(M)^G(F)^A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(M)G(F)A(M)A(F)U(M)C(M) A(R)^C(M)G(F)U(M)G(M)^G(M)^U(M)^U(M)	34
TfR2-019. 94AS.s1	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M) U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^U(M)	38
TfR2-019. 94AS.s2	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M) U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)	39

Tabla 3-20

Nombre de la hebra antisentido	Secuencia de nucleótidos de la región de hebra antisentido (5'-3')	SEQ ID NO
TfR2-019. 94AS.e1	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^C(M)^U(M)^U(M)	40
TfR2-019. 94AS.e2	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)C(M)^C(M)^U(M)^U(M)	41
TfR2-019. 94AS.e3	U(M)^U(F)^G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R)^C(M)C(F)A(M)C(M)^G(M)^G(M)^U(M)	42

El "peso molecular" en las tablas indica un valor medido por espectrometría de masas ESI de iones negativos. En la "secuencia de nucleótidos" en las tablas, N(R) representa ARN, N(D) representa ADN, N(M) representa ARN 2'-OMe, N(m) representa 2'-MOE ARN, N(3M) representa ARN 3'-OMe, N(F) representa ARN 2'-F, N(L) representa LNA y N(E) representa ENA. Las estructuras de los nucleósidos están representadas por las fórmulas estructurales anteriores, respectivamente.

En las tablas, "GN" indica una unidad de GalNAc representada por la fórmula anterior (GN). En las tablas, "2" indica $-O(CH_2)_2O-$ (representado por la fórmula anterior (2)), y "Z" indica $-O(CH_2)_8NHC(=O)(CH_2)_2PhO-$ (representado por la fórmula anterior (Z)). Para el enlace entre nucleósidos, o el enlace entre el nucleósido y la unidad GalNAc, "2" o "Z", "^" en las tablas indica un enlace fosforotioato ($-P(=S)(OH)-$, representado por el diagrama estructural (PS) anterior del enlace entre nucleósidos). El enlace es un enlace fosfodiéster ($-P(=O)(OH)-$, representado por (P) en el diagrama estructural anterior de enlaces entre nucleósidos) si no se da una indicación específica.

El residuo en cada una de la posición 5' del nucleótido en el extremo 5' y la posición 3' (posición 2' en el caso de un nucleótido modificado en la posición 3') del nucleótido en el extremo 3' de un oligonucleótido es un grupo hidroxilo en el que un átomo de hidrógeno está unido a un átomo de oxígeno en el diagrama estructural anterior de cada nucleósido. Cuando "2" forma un extremo, se forma un grupo hidroxilo con un átomo de hidrógeno unido a un átomo de oxígeno en el lado donde no hay unión a un oligonucleótido en el diagrama estructural anterior de "2". Cuando "^" forma un extremo, un grupo hidroxilo está unido a un átomo de fósforo en el diagrama estructural anterior de "PS". Sin embargo, cuando "GN"

forma un extremo, no es necesario el enlace de un átomo de hidrógeno.

Ejemplo de Prueba 1: Cribado de células HepG2 para ARNip de TfR2 mediante método de transfección directa

El siguiente experimento se llevó a cabo usando los compuestos de los Ejemplos 1 a 82 como ARNip de TfR2. El día antes de la transfección, las células HepG2 en 100 μ L de medio DMEM (fabricado por Gibco) que contiene 10% de FBS (fabricado por Gibco) se sembraron a $2,5 \times 10^4$ células por pocillo de una placa de 96 pocillos (fabricada por Corning Incorporated). En el día de la transfección, se prepararon cada muestra de ARNip, un control negativo (NT) usando agua destilada en lugar de ARNip y TfR2-061 (Ejemplo 61) como un control positivo para dos pocillos respectivamente. La preparación de un reactivo para realizar la transfección de una muestra de ARNip es como sigue. 50 μ L de Opti-MEM y 1 μ L de ARNip (concentración: 10 μ M) a una mezcla de 50 μ L de Opti-MEM (fabricado por Life Technologies Corporation) y 3 μ L de iARN MAX (fabricado por Thermo Fisher Scientific Inc.), y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. A partir de entonces, se adicionó 1 mL de DMEM preparado previamente que contiene 10% de FBS, calentado a 37°C. A la placa de 96 pocillos en la que se sembraron las células HepG2 y se removió el medio, se adicionaron 110 μ L de la mezcla.

La concentración final de ARNip fue de 10 nM para todas las muestras. La preparación de un reactivo para el control negativo es como sigue. Se adicionaron 50 μ L de Opti-MEM y 1 μ L de agua destilada a una mezcla de 50 μ L de Opti-MEM (fabricado por Life Technologies Corporation) y 3 μ L de iARN MAX (fabricado por Thermo Fisher Scientific Inc.), y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Dos días después de la transfección, las células se lavaron una vez con PBS (fabricado por Thermo Fisher Scientific Inc.) y se extrajo el ARN. El ARN se extrajo usando el Kit RNeasy Mini (fabricado por QUAGEN) y siguiendo el protocolo del kit. Usando el kit de ARN a ADNc de alta capacidad (fabricado por Applied Biosystems), 300 ng del ARN obtenido se sometieron a una reacción de transcripción inversa para sintetizar ADNc. Usando el ADNc obtenido, se midió el nivel de ARNm de hTfR2 endógeno mediante PCR cuantitativa. El nivel de ARNm del ARN ribosómico 18S humano (h18S) se midió como el gen de mantenimiento.

Usando IDT PrimeTime Gene Expression Master Mix (fabricado por Integrated DNA Technologies, Inc.), la PCR cuantitativa se realizó de la siguiente manera. El ADNc obtenido

se diluyó 10 veces con agua destilada (se mezclaron 15 µL de ADNc y 135 µL de agua destilada). En una placa de PCR de 384 pocillos (fabricada por Applied Biosystems), 5 µL de mezcla maestra de expresión génica IDT PrimeTime, 0,5 µL de un cebador hTfR2 (Hs. PT. 58. 20599434, fabricado por Integrated DNA Technologies, Inc.), 0,5 µL de un cebador h18S (Hs. PT. 39a. 22214856.g, fabricado por Integrated DNA Technologies, Inc.), 2 µL de agua destilada y 2 µL de ADNc (total 10 µL) se mezclaron por pocillo, la mezcla se preparó en una cantidad equivalente a 2 pocillos para cada ADNc, y se realizó PCR cuantitativa. El nivel de expresión de ARNm de cada uno de hTfR2 y h18S se proporcionó como un valor promedio de dos pocillos. El nivel de expresión de ARNm de hTfR2 se estandarizó con el nivel de expresión de ARNm de h18S, que es el gen constitutivo. Como se supone que el nivel de expresión de ARNm de hTfR2 en el control negativo es 1,0, se calcularon y registraron los niveles relativos de expresión de ARNm de hTfR2 de las muestras tratadas con ARNip. La Tabla 4 muestra los resultados.

Tabla 4-1

Nombre del compuesto	Valor relativo
TfR2-001	0,35
TfR2-002	0,41
TfR2-003	0,41
TfR2-004	0,43
TfR2-005	0,42
TfR2-006	0,43
TfR2-007	0,35
TfR2-008	0,53
TfR2-009	0,40
TfR2-010	0,42
TfR2-011	0,53
TfR2-012	0,49
TfR2-013	0,31
TfR2-014	0,49
TfR2-015	0,33
TfR2-016	0,50
TfR2-017	0,48
TfR2-018	0,39

TfR2-019	0,30
TfR2-020	0,49
TfR2-021	1,01
TfR2-022	0,43
TfR2-023	1,18
TfR2-024	0,41
TfR2-025	0,81
TfR2-026	1,16
TfR2-027	0,61
TfR2-028	0,45
NT	1,00
TfR2-061	0,19

Tabla 4-2

Nombre del compuesto	Valor relativo
TfR2-029	0,55
TfR2-030	0,98
TfR2-031	1,22
TfR2-032	0,55
TfR2-033	0,53
TfR2-034	0,48
TfR2-035	0,40
TfR2-036	0,48
TfR2-037	0,35
TfR2-038	0,48
TfR2-039	0,36
TfR2-040	0,65
TfR2-041	0,39
TfR2-042	1,02
TfR2-043	0,44
TfR2-044	0,58
TfR2-045	0,90
TfR2-046	0,38
TfR2-047	0,76

TfR2-048	0,77
TfR2-049	0,87
TfR2-050	0,50
TfR2-051	0,45
TfR2-052	0,40
TfR2-053	0,32
TfR2-054	0,45
TfR2-055	0,54
TfR2-056	0,43
NT	1,00
TfR2-061	0,22

Tabla 4-3

Nombre del compuesto	Valor relativo
TfR2-057	0,46
TfR2-058	0,50
TfR2-059	0,63
TfR2-060	0,63
TfR2-062	0,61
TfR2-063	0,73
TfR2-064	0,47
TfR2-065	0,43
TfR2-066	0,63
TfR2-067	0,49
TfR2-068	0,69
TfR2-069	0,50
TfR2-070	0,54
TfR2-071	0,52
TfR2-072	0,53
TfR2-073	0,55
TfR2-074	0,58
TfR2-075	0,57
TfR2-076	0,39
TfR2-077	0,40

TfR2-078	0,52
TfR2-079	0,90
TfR2-080	0,50
TfR2-081	0,38
TfR2-082	0,35
NT	1,00
TfR2-061	0,35

Ejemplo de Prueba 1-1: Evaluación de citotoxicidad usando células HepG2

La evaluación de la citotoxicidad se realizó 4 días después de que se introdujo ARNip en células HepG2 mediante un método de transfección inversa de la misma manera que en el Ejemplo de prueba 2. Como ARNip, se utilizaron TfR2-061 (Ejemplo 61), TfR2-019 (Ejemplo 19) y TfR2-039 (Ejemplo 39).

Para determinar la citotoxicidad del ARNip para las células hepáticas, se realizó una prueba utilizando el kit de recuento celular 8 (CCK8, DOJINDO LABORATORIES). El sobrenadante de cultivo se removió y luego se adicionó una solución obtenida mediante la preparación del reactivo CCK8 en una cantidad de 10 μ L por 100 L de DMEM que contiene 10% de FBS a 110 μ L/pocillo. A partir de entonces, las células se incubaron en una incubadora de CO₂ a 37° C durante 30 minutos. A partir de entonces, se midió la absorbancia OD 450 nm usando un lector de microplacas. Como se asume que el valor de OD 450 nm en el control negativo (NT) es 1,0, se calcularon y registraron los valores relativos de OD 450 nm para los pocillos en los que se había tratado ARNip. Los resultados se muestran en la FIGURA 11.

Estos resultados muestran que TfR2-019 y TfR2-039 tienen una toxicidad particularmente baja para las células hepáticas.

Ejemplo de Prueba 2: Cribado de células HepG2 para ARNip de TfR2 mediante método de transfección inversa

El siguiente experimento se llevó a cabo usando los compuestos de los Ejemplos como ARNip de TfR2. La detección de ARNip se realizó de la siguiente manera mediante un método de transfección inversa. En el día de la transfección, cada muestra de ARNip, un control negativo (NT) usando agua destilada en lugar de ARNip, y TfR2-061 (Ejemplo 61) o

ARNip para hTfR2 descrito en WO 2012/177921 (AD-52590), como un control positivo se prepararon para dos pocillos respectivamente.

Se adicionó 5 µL de ARNip por pocillo a una mezcla líquida de 14,8 µL de Opti-MEM y 0,2 µL de iARN MAX. La mezcla se incubó a temperatura ambiente. Para la preparación de un reactivo para el control negativo, se adicionó 5 µL de agua destilada, en lugar de ARNip, a la mezcla líquida de Opti-MEM y iARN MAX. Para la preparación de un reactivo para el control positivo, se adicionaron 5 µL de TfR2-061 (Ejemplo 61) o AD-52590 a la mezcla líquida de Opti-MEM y iARN MAX. A continuación, la mezcla líquida que contiene ARNip, el control negativo o el control positivo se adicionó a una placa de cultivo celular de 96 pocillos (fabricada por SUMIRON CO., Ltd.) a 20 µL por pocillo. En la placa de 96 pocillos a la que se ha adicionado la mezcla líquida, se sembraron 2×10^4 células/mL de células HepG2, preparadas usando DMEM que contiene 10% de FBS y calentadas por adelantado a 37°C, a 80 µL por pocillo. La concentración final de ARNip se ajustó mediante una serie de dilución de 10 veces o 50 veces de 10 nM.

Uno o dos días después de la transfección, las células se lavaron una vez con PBS. Usando el kit de RT de lisis celular Superprep para qPCR (Takara Bio Inc.), la extracción de ARN y una reacción de transcripción inversa se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo del kit de síntesis de ADNc. Usando el ADNc obtenido, se midió el nivel de expresión de ARNm de hTfR2 endógeno mediante PCR cuantitativa. Para el gen constitutivo, se midió el nivel de expresión de ARNm de h18S.

La PCR cuantitativa se realizó de la siguiente manera utilizando IDT PrimeTime Gene Expression Master Mix (fabricado por Integrated DNA Technologies, Inc.). El ADNc obtenido se usó como una solución madre. En una placa de PCR de 384 pocillos (fabricada por Applied Biosystems), 5 µL de mezcla maestra de expresión génica IDT PrimeTime, 0,25 µL de un cebador hTfR2 (Hs. PT. 58. 20599434, fabricado por Integrated DNA Technologies, Inc.) o 0,25 µL de un cebador h18S (Hs. PT. 39a. 22214856.g, fabricado por Integrated DNA Technologies, Inc.), se mezclaron 2,75 µL de agua destilada y 2 µL de ADNc (total 10 µL) por pocillo, la mezcla se preparó en una cantidad equivalente a 2 pocillos para cada ADNc, y se realizó PCR cuantitativa. El nivel de expresión de ARNm de cada uno de hTfR2 y h18S se proporcionó como un valor promedio de dos pocillos. El nivel de expresión de ARNm de hTfR2 se estandarizó con el nivel de expresión de ARNm de h18S, que es el gen de mantenimiento. Como se supone que el nivel de expresión de ARNm de hTfR2 en el control negativo es 1,0, se calcularon y registraron los niveles relativos de expresión de ARNm de

hTfR2 de las muestras tratadas con ARNip. Las Tablas 5 a 20 muestran los resultados.

Tabla 5-1

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
TfR2-061	10	0,07
	1	0,07
	0,1	0,11
TfR2-007	10	0,19
	1	0,20
	0,1	0,21
TfR2-013	10	0,11
	1	0,17
	0,1	0,14
TfR2-015	10	0,38
	1	0,47
	0,1	0,37
TfR2-019	10	0,19
	1	0,19
	0,1	0,66
TfR2-037	10	0,37
	1	0,32
	0,1	0,28
TfR2-076	10	0,39
	1	0,74
	0,1	0,28
TfR2-077	10	0,26
	1	0,19
	0,1	0,30
TfR2-081	10	0,13
	1	0,15
	0,1	0,27

Tabla 5-2

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
TfR2-061	10	0,10
	1	0,10
	0,1	0,13
TfR2-003	10	0,56
	1	0,43
	0,1	0,83
TfR2-005	10	0,36
	1	0,26
	0,1	0,27
TfR2-006	10	0,31
	1	0,37
	0,1	0,75
TfR2-022	10	0,25
	1	0,22
	0,1	0,20
TfR2-039	10	0,21
	1	0,25
	0,1	0,23
TfR2-046	10	0,30
	1	0,27
	0,1	0,24
TfR2-065	10	0,14
	1	0,15
	0,1	0,15

Tabla 6-1

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
AD-52590	1	0,05
	0,02	0,44
	0,0004	0,81
TfR2-003.5	1	0,10

	0,02	0,46
	0,0004	0,87
TfR2-005.5	1	0,07
	0,02	0,20
	0,0004	0,56
TfR2-006.5	1	0,08
	0,02	0,34
	0,0004	0,76
TfR2-007.5	1	0,12
	0,02	0,24
	0,0004	1,03
TfR2-013.5	1	0,12
	0,02	0,44
	0,0004	0,75
TfR2-019.5	1	0,05
	0,02	0,31
	0,0004	0,82
TfR2-022.5	1	0,36
	0,02	0,37
	0,0004	0,78
TfR2-037.5	1	0,16
	0,02	0,31
	0,0004	0,58

Tabla 6-2

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
AD-52590	1	0,03
	0,02	0,24
	0,0004	0,60
TfR2-039.5	1	0,09
	0,02	0,38
	0,0004	0,54

TfR2-061.5	1	0,02
	0,02	0,11
	0,0004	0,38
TfR2-065.5	1	0,22
	0,02	0,16
	0,0004	0,36
TfR2-076.5	1	0,04
	0,02	0,10
	0,0004	0,50
TfR2-077.5	1	0,06
	0,02	0,12
	0,0004	0,43
TfR2-081.5	1	0,02
	0,02	0,26
	0,0004	0,43

Tabla 7-1

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
AD-52590	0,001	0,92
	0,01	0,72
	0,1	0,44
	1	0,14
	10	0,09
TfR2-006.5	0,001	0,86
	0,01	0,69
	0,1	0,36
	1	0,20
	10	0,15
TfR2-013.5	0,001	0,84
	0,01	0,67
	0,1	0,46
	1	0,23

	10	0,16
TfR2-039.5	0,001	0,70
	0,01	0,72
	0,1	0,51
	1	0,27
	10	0,23

Tabla 7-2

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
AD-52590	0,001	0,80
	0,01	0,57
	0,1	0,26
	1	0,08
	10	0,08
TfR2-007.5	0,001	0,68
	0,01	0,53
	0,1	0,25
	1	0,19
	10	0,16
TfR2-019.5	0,001	0,58
	0,01	0,31
	0,1	0,14
	1	0,08
	10	0,07
TfR2-076.5	0,001	0,64
	0,01	0,27
	0,1	0,28
	1	0,17
	10	0,15

Tabla 8-1

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
----------------------	--------------------	----------------

NT	-	1,00
AD-52590	0,001	1,02
	0,01	0,77
	0,1	0,45
	1	0,14
	10	0,15
TfR2-006.3	0,001	1,06
	0,01	1,02
	0,1	0,67
	1	0,34
	10	0,39
TfR2-013.3	0,001	1,04
	0,01	1,16
	0,1	0,81
	1	0,45
	10	0,37
TfR2-039.3	0,001	0,95
	0,01	1,05
	0,1	0,92
	1	0,79
	10	0,81

Tabla 8-2

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
AD-52590	0,001	0,90
	0,01	0,62
	0,1	0,31
	1	0,13
	10	0,12
TfR2-007.3	0,001	0,95
	0,01	0,94
	0,1	0,86
	1	0,76

	10	0,67
TfR2-019.3	0,001	0,77
	0,01	0,55
	0,1	0,36
	1	0,25
	10	0,25
TfR2-076.3	0,001	0,80
	0,01	0,57
	0,1	0,39
	1	0,27
	10	0,28

Tabla 8-3

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
AD-52590	0,001	0,72
	0,01	0,71
	0,1	0,45
	1	0,24
	10	0,04
TfR2-006.6	0,001	0,93
	0,01	0,91
	0,1	0,39
	1	0,17
	10	0,10
TfR2-013.6	0,001	0,77
	0,01	1,16
	0,1	0,44
	1	0,15
	10	0,14
TfR2-039.6	0,001	0,91
	0,01	0,88
	0,1	0,50
	1	0,17

	10	0,22
--	----	------

Tabla 8-4

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
AD-52590	0,001	0,78
	0,01	0,44
	0,1	0,24
	1	0,04
	10	0,04
TfR2-007.6	0,001	0,91
	0,01	0,58
	0,1	0,34
	1	0,16
	10	0,07
TfR2-019.6	0,001	0,54
	0,01	0,31
	0,1	0,18
	1	0,09
	10	0,11
TfR2-076.6	0,001	0,79
	0,01	0,45
	0,1	0,27
	1	0,16
	10	0,18

Tabla 9

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
AD-52590	0,001	0,73
	0,01	0,47
	0,1	0,22
	1	0,06
	10	0,06

TfR2-039.5	0,001	0,82
	0,01	0,69
	0,1	0,36
	1	0,20
	10	0,21
TfR2-019.6	0,001	0,56
	0,01	0,32
	0,1	0,17
	1	0,09
	10	0,06
TfR2-039.5G	0,001	0,73
	0,01	0,64
	0,1	0,39
	1	0,19
	10	0,19
TfR2-019.6G	0,001	0,53
	0,01	0,33
	0,1	0,17
	1	0,08
	10	0,06

Tabla 10

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
AD-52590	0,001	0,97
	0,01	0,81
	0,1	0,34
	1	0,14
	10	0,12
TfR2-039.5	0,001	0,98
	0,01	0,83
	0,1	0,50
	1	0,28
	10	0,29

TfR2-039.10	0,001	0,87
	0,01	0,81
	0,1	0,55
	1	0,29
	10	0,26
TfR2-039.11	0,001	0,95
	0,01	0,65
	0,1	0,47
	1	0,32
	10	0,28
TfR2-039.12	0,001	0,81
	0,01	0,73
	0,1	0,53
	1	0,32
	10	0,35

Tabla 11-1

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
AD-52590	0,001	0,92
	0,01	0,74
	0,1	0,39
	1	0,14
	10	0,10
TfR2-039.5	0,001	1,09
	0,01	0,99
	0,1	0,63
	1	0,31
	10	0,40
TfR2-039.19	0,001	1,12
	0,01	0,91
	0,1	0,53
	1	0,36
	10	0,29

TfR2-039.20	0,001	1,08
	0,01	0,96
	0,1	0,63
	1	0,32
	10	0,29
TfR2-039.8	0,001	0,81
	0,01	0,75
	0,1	0,46
	1	0,31
	10	0,22

Tabla 11-2

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
TfR2-019.6	0,001	0,72
	0,01	0,51
	0,1	0,28
	1	0,22
	10	0,12
TfR2-019.8	0,001	0,84
	0,01	0,41
	0,1	0,25
	1	0,19
	10	0,11
TfR2-019.9	0,001	0,73
	0,01	0,38
	0,1	0,29
	1	0,14
	10	0,09
TfR2-019.15	0,001	0,78
	0,01	0,55
	0,1	0,28
	1	0,17
	10	0,12

TfR2-019.17	0,001	0,75
	0,01	0,42
	0,1	0,27
	1	0,15
	10	0,11

Tabla 12-1

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
AD-52590	0,001	0,91
	0,01	0,72
	0,1	0,35
	1	0,14
	10	0,10
TfR2-039.5	0,001	1,09
	0,01	0,79
	0,1	0,51
	1	0,30
	10	0,31
TfR2-039.21	0,001	1,03
	0,01	0,83
	0,1	0,60
	1	0,30
	10	0,30
TfR2-039.22	0,001	0,93
	0,01	0,96
	0,1	0,60
	1	0,33
	10	0,26
TfR2-039.23	0,001	1,05
	0,01	0,83
	0,1	0,54
	1	0,32
	10	0,36

Tabla 12-2

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
TfR2-039.5	0,001	0,81
	0,01	0,77
	0,1	0,57
	1	0,29
	10	0,36
TfR2-039.24	0,001	1,11
	0,01	1,03
	0,1	0,60
	1	0,34
	10	0,34
TfR2-039.25	0,001	1,40
	0,01	0,91
	0,1	0,73
	1	0,44
	10	0,39
TfR2-039.26	0,001	1,22
	0,01	1,10
	0,1	0,87
	1	0,42
	10	0,53

Tabla 13-1

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
AD-52590	0,01	0,46
	0,1	0,19
	1	0,03
	10	0,05
TfR2-039.5	0,01	0,60
	0,1	0,34

	1	0,22
	10	0,21
TfR2-039.9	0,01	0,64
	0,1	0,33
	1	0,17
	10	0,19
TfR2-039.9DU	0,01	0,92
	0,1	0,57
	1	0,20
	10	0,13
TfR2-039.28DU	0,01	1,44
	0,1	0,94
	1	0,29
	10	0,19

Tabla 13-2

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
AD-52590	0,01	0,52
	0,1	0,21
	1	0,07
	10	0,06
TfR2-039.9	0,01	0,81
	0,1	0,45
	1	0,31
	10	0,32
TfR2-039.29DU	0,01	1,14
	0,1	0,80
	1	0,35
	10	0,27
TfR2-039.30DU	0,01	1,08
	0,1	0,95
	1	0,32
	10	0,30

TfR2-039.31DU	0,01	1,19
	0,1	0,74
	1	0,32
	10	0,30

Tabla 13-3

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
AD-52590	0,01	0,48
	0,1	0,18
	1	0,07
	10	0,07
TfR2-039.5	0,01	0,63
	0,1	0,28
	1	0,22
	10	0,23
TfR2-039.9	0,01	0,85
	0,1	0,35
	1	0,25
	10	0,28
TfR2-039.32DU	0,01	1,05
	0,1	0,93
	1	0,43
	10	0,38

Tabla 14

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
AD-52590	0,001	0,84
	0,01	0,66
	0,1	0,31
	1	0,07
	10	0,07
TfR2-019.6	0,001	0,57

	0,01	0,37
	0,1	0,22
	1	0,12
	10	0,08
TfR2-019.29DU	0,001	0,69
	0,01	0,43
	0,1	0,22
	1	0,12
	10	0,06
TfR2-019.34DU	0,001	0,71
	0,01	0,42
	0,1	0,21
	1	0,11
	10	0,06

Tabla 15

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
TfR2-019.6	0,001	0,65
	0,01	0,36
	0,1	0,23
	1	0,14
	10	0,11
TfR2-019.22	0,001	0,66
	0,01	0,34
	0,1	0,22
	1	0,14
	10	0,08
TfR2-019.22s	0,001	0,68
	0,01	0,36
	0,1	0,21
	1	0,13
	10	0,07
TfR2-019.22DU	0,001	0,79

	0,01	0,48
	0,1	0,28
	1	0,15
	10	0,11
TfR2-019.22sDU	0,001	0,80
	0,01	0,47
	0,1	0,28
	1	0,15
	10	0,08

Tabla 16-1

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
TfR2-019.6G	0,001	0,66
	0,01	0,33
	0,1	0,18
	1	0,13
	10	0,13
TfR2-039.5G	0,001	0,93
	0,01	0,71
	0,1	0,40
	1	0,32
	10	0,29
TfR2-039.23DUG	0,001	1,02
	0,01	0,94
	0,1	0,75
	1	0,43
	10	0,39
TfR2-039.38DUG	0,001	0,93
	0,01	0,95
	0,1	0,59
	1	0,30
	10	0,24
TfR2-039.41DUG	0,001	0,96

	0,01	0,84
	0,1	0,50
	1	0,28
	10	0,26

Tabla 16-2

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
TfR2-039.23DUG	0,001	1,00
	0,01	0,95
	0,1	0,89
	1	0,49
	10	0,42
TfR2-039.35DUG	0,001	1,03
	0,01	0,93
	0,1	0,76
	1	0,42
	10	0,29
TfR2-039.36DUG	0,001	0,93
	0,01	0,93
	0,1	0,65
	1	0,32
	10	0,30
TfR2-039.37DUG	0,001	0,96
	0,01	0,89
	0,1	0,62
	1	0,31
	10	0,25
TfR2-039.38DUG	0,001	1,03
	0,01	0,92

	0,1	0,62
	1	0,30
	10	0,24

Tabla 17-1

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
TfR2-039.23DUG	0,001	0,91
	0,01	0,72
	0,1	0,60
	1	0,35
	10	0,27
TfR2-039.39DUG	0,001	0,79
	0,01	0,81
	0,1	0,42
	1	0,18
	10	0,13
TfR2-039.40DUG	0,001	0,83
	0,01	0,81
	0,1	0,47
	1	0,15
	10	0,14
TfR2-039.41DUG	0,001	0,81
	0,01	0,63
	0,1	0,31
	1	0,13
	10	0,14
TfR2-039.42DUG	0,001	0,66
	0,01	0,73
	0,1	0,37
	1	0,16
	10	0,12

Tabla 17-2

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
TfR2-039.23DUG	0,001	0,75
	0,01	0,76
	0,1	0,59
	1	0,25
	10	0,21
TfR2-039.36DUG	0,001	0,58
	0,01	0,59
	0,1	0,39
	1	0,12
	10	0,09
TfR2-039.41DUG	0,001	0,66
	0,01	0,63
	0,1	0,26
	1	0,08
	10	0,07
TfR2-039.43DUG	0,001	0,72
	0,01	0,52
	0,1	0,59
	1	0,42
	10	0,35
TfR2-039.45DUG	0,001	0,48
	0,01	0,47
	0,1	0,44
	1	0,23
	10	0,21

Tabla 18-1

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
TfR2-019.6G	0,001	0,88
	0,01	0,37
	0,1	0,20

	1	0,13
	10	0,14
TfR2-019.22DUG	0,001	0,87
	0,01	0,46
	0,1	0,23
	1	0,12
	10	0,15
TfR2-019.38DUG	0,001	0,89
	0,01	0,54
	0,1	0,30
	1	0,16
	10	0,12
TfR2-019.36DUG	0,001	0,88
	0,01	0,49
	0,1	0,25
	1	0,14
	10	0,13
TfR2-019.87DUG	0,001	0,95
	0,01	0,43
	0,1	0,25
	1	0,15
	10	0,13

Tabla 18-2

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
TfR2-019.6G	0,001	0,84
	0,01	0,44
	0,1	0,25
	1	0,12
	10	0,11
TfR2-019.22DUG	0,001	0,89
	0,01	0,51
	0,1	0,22

	1	0,13
	10	0,10
TfR2-019.85DUG	0,001	0,64
	0,01	0,36
	0,1	0,17
	1	0,15
	10	0,09
TfR2-019.86DUG	0,001	0,72
	0,01	0,34
	0,1	0,19
	1	0,15
	10	0,10
TfR2-039.41DUG	0,001	0,93
	0,01	0,89
	0,1	0,57
	1	0,33
	10	0,28

Tabla 19-1

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
TfR2-061.5	0,001	0,75
	0,01	0,50
	0,1	0,33
	1	0,15
	10	0,15
TfR2-019.22DUG	0,001	1,07
	0,01	0,61
	0,1	0,33
	1	0,25
	10	0,22
TfR2-019.71DUG	0,001	0,97
	0,01	0,88
	0,1	0,57

	1	0,32
	10	0,31
TfR2-019.88DUG	0,001	0,86
	0,01	0,76
	0,1	0,46
	1	0,28
	10	0,24
TfR2-019.89DUG	0,001	0,81
	0,01	0,71
	0,1	0,40
	1	0,30
	10	0,19

Tabla 19-2

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
TfR2-019.6G	0,001	0,84
	0,01	0,62
	0,1	0,30
	1	0,21
	10	0,16
TfR2-019.22DUG	0,001	1,09
	0,01	0,73
	0,1	0,30
	1	0,20
	10	0,15
TfR2-019.90DUG	0,001	1,02
	0,01	0,93
	0,1	0,45
	1	0,29
	10	0,22
TfR2-019.80DUG	0,001	1,06
	0,01	0,76
	0,1	0,35

	1	0,26
	10	0,21
TfR2-019.91DUG	0,001	1,02
	0,01	0,66
	0,1	0,33
	1	0,25
	10	0,17

Tabla 19-3

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
TfR2-019.6G	0,001	0,79
	0,01	0,53
	0,1	0,35
	1	0,29
	10	0,19
TfR2-019.92DUG	0,001	0,88
	0,01	0,67
	0,1	0,33
	1	0,24
	10	0,24
TfR2-019.22DUG	0,001	0,83
	0,01	0,55
	0,1	0,34
	1	0,23
	10	0,24
TfR2-019.93DUG	0,001	0,85
	0,01	0,67
	0,1	0,40
	1	0,26
	10	0,24
TfR2-046.5	0,001	0,84
	0,01	0,78
	0,1	0,55

	1	0,35
	10	0,37

Tabla 20

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
TfR2-019.92DUG	0,001	0,85
	0,01	0,52
	0,1	0,35
	1	0,16
	10	0,13
TfR2-019.93DUG	0,001	0,68
	0,01	0,42
	0,1	0,22
	1	0,11
	10	0,08
TfR2-019.94DUG	0,001	0,65
	0,01	0,48
	0,1	0,28
	1	0,15
	10	0,16
TfR2-019.95DUG	0,001	0,91
	0,01	0,53
	0,1	0,25
	1	0,18
	10	0,09

Ejemplo de prueba 2-1: actividad de inactivación de hTfR2 usando células HepG2

De la misma manera que en el Ejemplo de prueba 2, el nivel de expresión de ARNm de hTfR2 se evaluó 2 días después de que se introdujo ARNip en células HepG2 mediante un método de transfección inversa. Se usaron TfR2-019 (Ejemplo 19) y TfR2-019.94DUG (Ejemplo 169) como ARNip.

Para la evaluación del nivel de expresión de ARNm de hTfR2, se calcularon los niveles relativos de expresión de ARNm de hTfR2 de las muestras tratadas con ARNip y se registraron como valores relativos cuando se supone que el nivel de expresión de ARNm de hTfR2 en el control negativo (NT) es de 1,0. Los resultados se muestran en la FIGURA 12.

- 5 Estos resultados demuestran que TfR2-019.94DUG tiene una actividad de inactivación particularmente alta contra el ARNm de hTfR2.

Ejemplo de Prueba 3: Prueba de administración individual de ARNip de TfR2 a monos cangrejeros machos

- 10 Se midieron la concentración de hierro en plasma y la concentración de hepcidina en plasma después de la administración subcutánea de TfR2-039.5G (Ejemplo 127) o TfR2-039.23DUG (Ejemplo 144) a una dosis de 30 mg/kg. La concentración de hierro en plasma se midió usando un kit de medición de hierro Metallo-assay (fabricado por Metallogenics Co., Ltd.). La concentración de hepcidina en plasma se midió usando LC/MS. La Tabla 21 muestra los resultados para la administración de TfR2-039.5G (Ejemplo 127), y la Tabla 22 muestra los resultados para TfR2-039.23DUG (Ejemplo 144).
- 15

Tabla 21

	Mono 1	
días después de la administración	plasma Fe ug/dL	Hepcidina(nM)
0	146,5	15,5
3	209,0	11,3
7	214,0	11,6
14	271,0	11,2
21	300,0	13,1
29	285,5	13,9
35	204,0	20,0
42	219,5	17,6
49	203,5	15,6
56	187,5	18,8

Tabla 22

	Mono 2		Mono 3	
días después de la administración	plasma Fe ug/dL	Hepcidina(nM)	plasma Fe ug/dL	Hepcidina(nM)
-14	108,5	16,4	121,5	13,0
0	142,5	16,4	140,5	11,7
7	183,0	11,9	121,0	12,4
14	215,0	9,45	140,5	9,83
21	198,5	9,77	180,0	8,88
28	197,5	10,4	168,0	9,60
37	169,5	10,8	196,0	10,4
42	183,5	11,5	131,0	4,95
49	156,5	no determinado	124,0	no determinado

Ejemplo de Prueba 4: Preparación de partículas lipídicas de ácido nucleico que encapsulan ARNip usando ARNip de TfR2

(1) Preparación de partículas lipídicas de ácido nucleico que encapsulan ARNip

5 Se disolvió diestearoilfosfatidilcolina (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina: en lo sucesivo, referida como DSPC, NOF CORPORATION), colesterol(en lo sucesivo, referido como Chol, Sigma-Aldrich, Inc.), acetato de (7R,9Z)-18-({[3-(dimetilamino) propiloxi]carbonil}oxi) octacosano-9-en-7ilo (compuesto descrito en WO 2015/005253, Ejemplo 28) (en lo sucesivo, referido como LP), y 1,2-dimiristoil-sn-glicerol metoxipolietilenglicol que
10 tiene un peso molecular de aproximadamente 2000 en términos de polietilenglicol (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-metoxipolietilenglicol; en lo sucesivo, referido como PEG-DMG, NOF CORPORATION) en una relación molar de 10 : 48 : 40 : 2 en etanol a una concentración total de lípidos de 10 mM.

15 Por otro lado, como ARNip de TfR2 de ratón, se preparó AD-47882 (ARNip para TfR2 de ratón que se describe en WO 2012/177921) mediante dilución con una solución amortiguadora de citrato (amortiguador de citrato 20 mM, pH 4,0).

Se obtuvo una dispersión bruta de partículas lipídicas de ácido nucleico mezclando la solución lipídica y una solución de ARNip en microcanales con NanoAssemblr BenchTop (Precision Nanosystems Inc.), de modo que la relación en peso del lípido total con respecto al

ARNip fue de 11, y la relación en volumen de la solución lipídica y la solución de ARNip fue de 1 : 3. La dispersión de partículas lipídicas de ácido nucleico se dializó contra aproximadamente 25 a 50 veces su cantidad de una solución amortiguadora de fosfato durante 12 a 18 horas (Float-A-Lyzer G2, MWCO: 1,000 kD, Spectra/Por) para remover el etanol, obteniendo así una dispersión purificada de partículas lipídicas de ácido nucleico que encapsulan ARNip. LP se sintetizó mediante un método descrito en WO 2015/005253, Ejemplo 28.

(2) Evaluación de las características de las partículas lipídicas de ácido nucleico que encapsulan ARNip

Las siguientes características se evaluaron para la dispersión que contiene partículas lipídicas de ácido nucleico como se preparó en (1).

(2-1) Relación de encapsulación de ARNip

Usando el kit de ensayo de ARN Quant-iT RiboGreen (Invitrogen), se midió la relación de encapsulación de ARNip de acuerdo con el documento del producto. Específicamente, el ARNip en la dispersión de partículas lipídicas de ácido nucleico se cuantificó con y sin un tensioactivo Triton X-100 al 0,015%, seguido del cálculo de la relación de encapsulación a partir de la siguiente ecuación.

Relación de encapsulación (%) = $\{([\text{nivel de ARNip con tensioactivo}] - [\text{nivel de ARNip sin tensioactivo}]) / [\text{nivel de ARNip con tensioactivo}]\} \times 100(\%)$

(2-2) Relación de ARNip y lípido

Se preparó una dispersión de partículas lipídicas de ácido nucleico mediante dilución con Triton X-100 al 1,0%, y se midió la cantidad de ARNip en la dispersión de partículas lipídicas de ácido nucleico mediante cromatografía de intercambio iónico (sistema: Agilent 1260 series, columna: Dionex BioLC DNAPac PA200 (8 μm , 4,0 mm $\times$ 250 mm) (Thermo Fisher Scientific Inc.), Amortiguador A: Solución amortiguadora de Tris-HCl 10 mM, perclorato de sodio 25 mM, etanol al 20% (pH 7,0), amortiguador B: Solución amortiguadora de Tris HCl 10 mM, perclorato de sodio 250 mM, etanol al 20% (pH 7,0), (B%): 20-70% (15 min), velocidad de flujo: 0,5 mL/min, temperatura: 40°C, detección: 260 nm).

Se preparó una dispersión de partículas lipídicas de ácido nucleico mediante dilución con etanol, y se midió la cantidad de cada lípido en la dispersión de partículas lipídicas de ácido nucleico mediante cromatografía de fase inversa (sistema: DIONEX UltiMate 3000, columna: XSelect CSH C18 (130 Å, 3,5 µm, 3,0 mm × 150 mm) (Catálogo Waters # 186005263), Amortiguador A: 0,2% de ácido fórmico, Amortiguador B: 0,2% de ácido fórmico, metanol, (B%): 75-95% (15 min), 95% (2 min), velocidad de flujo: 0,45 mL/min, temperatura: 50°C, detección: Corona CAD (detector de aerosol cargado)). La relación de lípido total a ARNip se calculó a partir de la siguiente ecuación.

$$\text{Cantidad de lípido total a ARNip (peso/peso)} = [\text{concentración total de lípidos}] / [\text{concentración de ARNip}] \text{ (peso/peso)}$$

(2-3) Diámetro promedio de partícula

El diámetro de partícula de las partículas lipídicas de ácido nucleico se midió mediante Zeta Potential/Particle Sizer NICOMPTM 380ZLS (Particle Sizing Systems, LLC.). El diámetro promedio de partícula en las tablas indica un diámetro promedio de partícula en volumen, donde el número siguiente ± indica un error. La Tabla 23 muestra los resultados de la evaluación de las características.

Tabla 23

	Relación de encapsulación (%)	Diámetro de partícula (nm)	Lípido total/ARNip (p/p)
AD-47882	95	91±26	11

A partir de los resultados anteriores, se hizo evidente que en estas partículas lipídicas de ácido nucleico, aproximadamente el 95% del ARNip estaba encapsulado en las partículas lipídicas, y el diámetro promedio de partícula era de aproximadamente 90 nm.

Ejemplo de Prueba 5: Prueba de evaluación de la eficacia del fármaco para partículas lipídicas de ácido nucleico que encapsulan ARNip de TfR2 en un modelo en ratón de anemia asociada con la pérdida de la función de la médula ósea

Usando partículas lipídicas de ácido nucleico que encapsulan AD-47882 (ARNip para TfR2 de ratón que se describe en WO 2012/177921) como partículas lipídicas de ácido nucleico que encapsulan ARNip de TfR2 de ratón, se realizó el siguiente experimento. Las

partículas lipídicas de ácido nucleico se prepararon de la misma manera que en el Ejemplo de prueba 4. Para inducir la pérdida de la función de la médula ósea, se administraron 100 mg/kg de carboplatino (fabricado por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) por vía intraperitoneal (i.p.) a ratones C57BL/6NJcl macho (de CLEA Japan, Inc.). A un grupo de control en el que no se indujo la pérdida de la función de la médula ósea (control), se administró PBS i.p. en lugar de carboplatino (n = 5). Cuatro días después de la administración de carboplatino, el agrupamiento se realizó en función de la concentración de hierro en plasma y la concentración de HGB, seguido del tratamiento con el agente farmacológico (n = 5/grupo). El agente farmacológico se administró por vía intravenosa (i.v.) una vez en forma de partículas lipídicas de ácido nucleico para cada uno de 0,5 mg/kg (0,5 mpk) de AD-47882 y 0,25 mg/kg (0,25 mpk) de AD-47882. PBS se administró por vía intravenosa en lugar del agente farmacológico a un grupo de vehículo. Antes de la administración de AD-47882 (Día 0), 3 días después de la administración de AD-47882 (Día 3), 7 días después de la administración (Día 7), 10 días después de la administración (Día 10) y 11 días después de la administración (Día 11), se extrajo sangre de la vena de la cola y se midió la concentración de HGB utilizando el kit QuantiChrom Whole Blood HB (fabricado por Bioassay Systems, LLC.). En la Figura 7C se muestran los resultados para la concentración de HGB. Antes de la administración de AD-47882 (Día 0), 3 días después de la administración (Día 3) y 7 días después de la administración (Día 7), se midieron la concentración de hierro en plasma y la concentración de hepcidina en plasma. La concentración de hierro en plasma se midió usando un kit de medición de hierro Metallo-assay (fabricado por Metallogenics Co., Ltd.). La concentración de hepcidina en plasma se midió usando LC/MS. Los resultados para la concentración de hierro en plasma y la concentración de hepcidina en plasma se muestran en las Figuras 7A y 7B, respectivamente. Además, 11 días después del tratamiento con AD-47882 (Día 11), se extrajo sangre de la vena abdominal grande bajo anestesia con isoflurano, y se midió la cantidad media de hemoglobina corpuscular (MCH) utilizando un analizador de corpúsculos automático multielemento XT 2000 (fabricado por Sysmex Corporation). En la Figura 7D se muestran los resultados para la cantidad de MCH.

Los ratones se sacrificaron sin dolor mediante sangrado, luego se aisló el hígado y se midieron los niveles de expresión de ARNm de TfR2 de ratón (mTfR2) y hepcidina de ratón (mHepcidina). Utilizando el kit RNeasy Mini (fabricado por QUAGEN), se extrajo el ARN de acuerdo con el protocolo del kit. 5000 ng del ARN obtenido se sometieron a una reacción de transcripción inversa usando el kit de ARN a ADNc de alta capacidad (fabricado por Applied Biosystems). Usando el ADNc así obtenido, se midió el nivel de ARNm de TfR2 de ratón endógeno y hepcidina mediante PCR cuantitativa.

La PCR cuantitativa se realizó de la siguiente manera utilizando IDT PrimeTime Gene Expression Master Mix (fabricado por Integrated DNA Technologies, Inc.). El ADNc obtenido se diluyó 10 veces con agua destilada (se mezclaron 15 μ L de ADNc y 135 μ L de agua destilada). En una placa de PCR de 384 pocillos (fabricada por Applied Biosystems), se mezclaron 5 μ L de IDT PrimeTime Gene Expression Master Mix, 0,25 μ L de un cebador de TfR2 (mTfR2) de ratón (Mm.PT.58.7860185, fabricado por Integrated DNA Technologies, Inc.) o 0,25 μ L de un cebador de hepcidina (mHepcidina) de ratón (Mm.PT.58.43563393.g, fabricado por Integrated DNA Technologies, Inc.), 2,75 μ L de agua destilada y 2 μ L de ADNc (total 10 μ L) por pocillo, la mezcla se preparó en una cantidad equivalente a 2 pocillos para cada ADNc, y se realizó PCR cuantitativa. Para el gen de mantenimiento, un cebador de β actina de ratón (mActb) (Mm. PT. 39a, 22214843. g, fabricado por Integrated DNA Technologies, Inc.), y se mezcló para cumplir con una relación como se describió anteriormente, la mezcla se preparó en una cantidad equivalente a 2 pocillos para cada ADNc, y se realizó PCR cuantitativa. El nivel de ARNm de cada uno de mTfR2, mHepcidina y mActb se proporcionó como un valor promedio de dos pocillos. El nivel de expresión de ARNm de mTfR2 y mHepcidina se estandarizó con el nivel de expresión de ARNm de mActb que es un gen constitutivo. Como se supone que el nivel de ARNm en el grupo de control en el que no se indujo la pérdida de la función de la médula ósea es de 1,0, se calcularon y registraron los niveles de ARNm relativos en el grupo de vehículo y el grupo de tratamiento con AD-47882 ($\pm$ error estándar del valor promedio). Los resultados para los niveles de expresión de ARNm de mTfR2 y mHepcidina en el hígado se muestran en la Figura 7E y 7F, respectivamente.

Estos resultados muestran que mediante el tratamiento con ARNip de TfR2, el nivel de expresión de ARNm de TfR2 puede suprimirse para aumentar la concentración de HGB, proporcionando así un efecto terapéutico sobre enfermedades anémicas tal como anemia asociada con disfunción de la médula ósea, por ejemplo, anemia asociada con mielofibrosis.

Ejemplo de Prueba 6: Prueba de evaluación de la eficacia del fármaco para ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en modelo de ratón de anemia asociada con pérdida de la función de la médula ósea

Usando AD47882.23DUG (Ejemplo 171) como ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc, se llevó a cabo el siguiente experimento. Para inducir la pérdida de la función de la médula ósea, se administraron 100 mg/kg de carboplatino por vía intraperitoneal (i.p.). PBS se administró i.p. en lugar de carboplatino (n = 5) a un grupo de control en el que no se indujo la pérdida de la función de la médula ósea (control). Cuatro días después de la administración

de carboplatino, se realizó el agrupamiento en función de la concentración de HGB, seguido del tratamiento con el agente farmacológico (n = 9 o 10/grupo). El agente farmacológico se administró por vía subcutánea una vez a una dosis de 3 mg/kg (3 mpk) a un grupo de tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc. Se administró ActRIIB conjugado con Fc (ActRIIB-Fc) como agente farmacológico para atrapar un ligando para el receptor de activina tipo IIB (ActRIIB) por vía subcutánea a una dosis de 10 mg/kg cada 3 o 4 días a un grupo de control positivo, con la administración realizada tres veces en total. ActRIIB-Fc es una preparación de proteína obtenida mediante la unión del dominio extracelular de luspatercept (ACE-536) al dominio Fc de IgG2a de ratón (WO 2016090188, Blood. 2014; 123(25): 3864-3872), y se sabe que promueve la diferenciación de eritrocitos suprimiendo las señales de SMAD 2/3, y que exhibe un efecto terapéutico en un modelo en ratón de β talasemia y un modelo en ratón de síndrome mielodisplásico (Blood. 2014; 123(25): 3864-3872, Nature Medicine volumen 20, páginas 408-414 (2014)). PBS se administró por vía subcutánea cada 3 o 4 días a un grupo de vehículo, con la administración realizada tres veces en total. el ARNip se administró por vía subcutánea una vez y ActRIIB-Fc se administró por vía subcutánea tres veces en total como se describió anteriormente a un grupo para el tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en combinación con ActRIIB-Fc.

Antes del tratamiento con el agente farmacológico (Día 0), 3 días después del tratamiento (Día 3) y 8 días después del tratamiento (Día 8), se extrajo sangre de la vena de la cola y se midió la concentración de HGB utilizando el kit QuantiChrom Whole Blood HB (fabricado por Bioassay Systems, LLC.). Los resultados para la concentración de HGB se muestran en la Figura 8A (error $\pm$ estándar del valor promedio). La Figura 8B muestra los resultados para la concentración de HGB 3 días después del tratamiento con el agente farmacológico, que indican un efecto del uso combinado de ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc y ActRIIB-Fc. Nueve días después del tratamiento con el agente farmacológico (Día 9), se extrajo sangre de la vena abdominal grande bajo anestesia con isoflurano, y se midieron la concentración de HGB, la cantidad de MCH, el valor de hematocrito (HCT) y el número de glóbulos rojos (RBC) utilizando un analizador de corpúsculos automático de múltiples elementos XT 2000 (fabricado por Sysmex Corporation). Los resultados se muestran en las Figuras 8D a 8G (error $\pm$ estándar del valor promedio), respectivamente. Los ratones se sacrificaron sin dolor mediante sangrado, luego se aisló el hígado y se midieron los niveles de expresión de ARNm de mTfR2. La extracción de ARN y la PCR cuantitativa se realizaron de la manera descrita en el Ejemplo de prueba 5. El nivel de expresión de ARNm de mTfR2 se estandarizó con el nivel de expresión de ARNm de mActb, que es el gen de mantenimiento.

Los resultados para el nivel de expresión de ARNm de mTfR2 se muestran en la Figura 8C. Como se supone que el nivel de ARNm en el grupo de control en el que no se indujo la pérdida de la función de la médula ósea es de 1,0, se calcularon y registraron los niveles relativos de ARNm en otros grupos (error $\pm$ estándar del valor promedio).

- 5 Estos resultados muestran que mediante el tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc, el nivel de expresión de ARNm de TfR2 puede suprimirse para aumentar la concentración de HGB, proporcionando así un efecto terapéutico sobre enfermedades anémicas tal como anemia asociada con disfunción de médula ósea, por ejemplo, anemia asociada con mielofibrosis. Además, los resultados muestran que la administración
- 10 combinada de ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc y luspatercept puede permitir la provisión de un efecto terapéutico mayor que el de un agente individual sobre la enfermedad anémica, tal como la anemia asociada con mielofibrosis.

Ejemplo de Prueba 7: Prueba de evaluación de la eficacia del fármaco para ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con inflamación

- 15 Usando los compuestos de AD47882.5G (Ejemplo 131), AD47882.23G (Ejemplo 132), AD47882.23sG (Ejemplo 133), AD47882.23DUG (Ejemplo 171) y AD47882.23sDUG (Ejemplo 172) como ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc, se llevó a cabo el siguiente experimento. Cada ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc se administró por vía subcutánea a ratones C57BL/6NJcl macho (de CLEA Japan, Inc.) una vez a una dosis de 1 mg/kg (1 mpk) (Día 0).
- 20 PBS se administró por vía subcutánea a un grupo de vehículo. Cinco días después del tratamiento con ARNip o PBS (Día 5), se administró trementina por vía subcutánea a 150 μ L/ratón para inducir inflamación. PBS se administró s.c. en lugar de trementina a un grupo de control en el que no se indujo inflamación (control). En la presente prueba, n = 5/grupo.
- 25 Dos días después de la primera administración de trementina (Día 7), se midieron la concentración de hierro en plasma y la concentración de hepcidina en plasma. La concentración de hierro en plasma se midió usando un kit de medición de hierro Metallo-assay (fabricado por Metallogenics Co., Ltd.). La concentración de hepcidina en plasma se midió usando LC/MS. Los resultados se muestran en las Figuras 9A y 9B, respectivamente.

- 30 Seis días después de la primera administración de trementina (Día 11), la trementina se administró nuevamente por vía subcutánea a 150 μ L/ratón. Dos días después de la segunda administración de trementina (Día 13), se extrajo sangre de la vena abdominal grande bajo anestesia con isoflurano, y la concentración de HGB, la cantidad de MCH y el número de glóbulos rojos se midieron utilizando un analizador de corpúsculos automático de

múltiples elementos XT 2000 (fabricado por Sysmex Corporation). Los resultados se muestran en las Figuras 9C a 9I, respectivamente. Los ratones se sacrificaron sin dolor mediante sangrado, luego se aisló el hígado y se midió el nivel de expresión de ARNm de mTfR2. La extracción de ARN y la PCR cuantitativa se realizaron de la manera descrita en el Ejemplo de prueba 5. El nivel de expresión de ARNm de mTfR2 se estandarizó con el nivel de expresión de ARNm de mActb, que es el gen de mantenimiento. Los resultados para el nivel de expresión de ARNm de mTfR2 se muestran en la Figura 9F. Como se supone que el nivel de ARNm en el grupo de control en el que no se indujo inflamación es de 1,0, se calcularon y registraron los niveles relativos de ARNm en otros grupos (error $\pm$ estándar del valor promedio).

Estos resultados muestran que mediante el tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc, se puede suprimir el nivel de expresión de ARNm de TfR2 para aumentar la concentración de HGB, proporcionando así un efecto terapéutico sobre enfermedades anémicas tal como anemia asociada con inflamación, por ejemplo, anemia asociada con enfermedad renal crónica y anemia cancerosa.

Ejemplo de Prueba 8: Prueba de evaluación de la eficacia del fármaco para ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con inflamación

Usando AD47882.41DUG (Ejemplo 173), AD47882.88DUG (Ejemplo 174), AD47882.89DUG (Ejemplo 175), AD47882.91DUG (Ejemplo 176), AD47882.92DUG (Ejemplo 177) y AD47882.93DUG (Ejemplo 178) como ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc, se llevó a cabo el siguiente experimento. Cada ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc se administró a ratones C57BL/6NJcl macho (de CLEA Japan, Inc.) una vez a una dosis de 1 mg/kg (1 mpk) (Día 0). PBS se administró por vía subcutánea al grupo de vehículo. Cuatro días después del tratamiento con ARNip o PBS (Día 4), se administró trementina por vía subcutánea a 150 μ L/ratón para inducir inflamación. Se administró PBS s.c. en lugar de trementina al grupo de control que no experimentaría inducción de inflamación. En la presente prueba, n = 5/grupo. Dos días después de la primera administración de trementina (Día 6), se midió la concentración de hierro en plasma. La concentración de hierro en plasma se midió usando un kit de medición de hierro Metallo-assay (fabricado por Metallogenics Co., Ltd.). Los resultados se muestran en la Figura 10A, respectivamente.

Siete días después de la primera administración de trementina (Día 11), la trementina se administró nuevamente por vía subcutánea a 150 μ L/ratón. Tres días después de la segunda administración de trementina (Día 14), se extrajo sangre de la vena abdominal

grande bajo anestesia con isoflurano, y la concentración de HGB, la cantidad de MCH y el número de glóbulos rojos se midieron utilizando un analizador de corpúsculos automático de múltiples elementos XT 2000 (fabricado por Sysmex Corporation). Los resultados se muestran en las Figuras 10B a 10D, respectivamente. Los ratones se sacrificaron sin dolor mediante sangrado, luego se aisló el hígado y se midió el nivel de expresión de ARNm de mTfR2. La extracción de ARN y la PCR cuantitativa se realizaron de la manera descrita en el Ejemplo de prueba 5. El nivel de expresión de ARNm de mTfR2 se estandarizó con el nivel de expresión de ARNm de mActb, que es el gen de mantenimiento. Los resultados para el nivel de expresión de ARNm de mTfR2 se muestran en la Figura 10E. Como se supone que el nivel de ARNm en el grupo de control en el que no se indujo inflamación es de 1,0, se calcularon y registraron los niveles relativos de ARNm en otros grupos (error $\pm$ estándar del valor promedio).

Estos resultados muestran que mediante el tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc, se puede suprimir el nivel de expresión de ARNm de TfR2 para aumentar la concentración de HGB, proporcionando así un efecto terapéutico sobre enfermedades anémicas tal como anemia asociada con inflamación, por ejemplo, anemia asociada con enfermedad renal crónica y anemia cancerosa.

Ejemplo de Prueba 9: Cribado de células HepG2 para ARNip de TfR2 mediante un método de transfección inversa

Usando TfR2-019.94DUG (Ejemplo 169), TfR2-019.94DUG.s1 (Ejemplo 180), TfR2-019.94DUG.s2 (Ejemplo 181), TfR2-019.94DUG.e1 (Ejemplo 182), TfR2-019.94DUG.e2 (Ejemplo 183) y TfR2-019.94DUG.e3 (Ejemplo 184) como ARNip, se llevó a cabo una prueba para el nivel de expresión de ARNm de hTfR2 de la misma manera que en el Ejemplo de prueba 2. Como se supone que el nivel de expresión de ARNm de hTfR2 en el control negativo (NT) es 1,0, se calcularon y registraron los niveles relativos de expresión de ARNm de hTfR2 de las muestras tratadas con ARNip. La Tabla 24 a continuación muestra los resultados.

Tabla 24-1

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
19.94DUG	0,001	0,97
	0,01	0,58

	0,1	0,26
	1	0,05
	10	0,03
19.94DUG.s1	0,001	1,13
	0,01	0,48
	0,1	0,17
	1	0,07
	10	0,02
19.94DUG.s2	0,001	1,02
	0,01	0,53
	0,1	0,26
	1	0,08
	10	0,04
19.94DUG.e1	0,001	0,92
	0,01	0,40
	0,1	0,20
	1	0,06
	10	0,02
19.94DUG.e2	0,001	0,89
	0,01	0,51
	0,1	0,21
	1	0,08
	10	0,04

Tabla 24-2

Nombre del compuesto	Concentración (nM)	Valor relativo
NT	-	1,00
19.94DUG	0,001	0,86
	0,01	0,63
	0,1	0,30
	1	0,10
	10	0,06
19.94DUG e3	0,001	0,99
	0,01	0,60

	0,1	0,27
	1	0,09
	10	0,03

Ejemplo de Prueba 10: Prueba de evaluación de la eficacia del fármaco para ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en ratones normales

Usando AD47882.5G (Ejemplo 131) y AD47882.94DUG (Ejemplo 179) como ARNip conjugado con GalNAc, se llevó a cabo el siguiente experimento. Como ARNip conjugado con GalNAc, se administró AD47882.5G por vía subcutánea (s.c.) a ratones C57BL/6NJcl macho (de CLEA Japan, Inc.) a una dosis de 10 mg/kg (10 mpk), 3 mg/kg (3 mpk) o 1 mg/kg (1 mpk) (n = 5/grupo). Se administró PBS por vía subcutánea a un grupo de vehículo (n = 5/grupo). Antes del tratamiento con ARNip o PBS (Día 0), 7 días después del tratamiento (Día 7), 21 días después del tratamiento (Día 21) y 28 días después del tratamiento (Día 28), se extrajo sangre de la vena de la cola y se midió la concentración de hierro en plasma utilizando un kit de medición de hierro Metallo-assay (fabricado por Metallogenics Co., Ltd.). Los resultados para la concentración de hierro en plasma se muestran en la Figura 13A (error $\pm$ estándar del valor promedio).

Como ARNip conjugado con GalNAc, se administró AD47882.94DUG por vía subcutánea (s.c.) a ratones C57BL/6NJcl macho (de CLEA Japan, Inc.) a una dosis de 3 mg/kg (3 mpk), 1 mg/kg (1 mpk) o 0,3 mg/kg (0,3 mpk) (n = 5/grupo). Se administró PBS por vía subcutánea a un grupo de vehículo (n = 5/grupo). Antes del tratamiento con ARNip o PBS (Día 0), 7 días después del tratamiento (Día 7), 21 días después del tratamiento (Día 21) y 28 días después del tratamiento (Día 28), se extrajo sangre de la vena de la cola y se midió la concentración de hierro en plasma utilizando un kit de medición de hierro Metallo-assay (fabricado por Metallogenics Co., Ltd.). Los resultados para la concentración de hierro en plasma se muestran en la Figura 13B (error $\pm$ estándar del valor promedio).

Estos resultados muestran que, en particular, AD47882.94DUG suprime de forma estable el nivel de expresión de ARNm de TfR2 *in vivo* para aumentar la concentración de hierro en plasma. Como otra prueba, los ratones normales se trataron de manera similar con AD47882.88DUG (compuesto del Ejemplo 174), AD47882.89DUG (compuesto del Ejemplo 175), AD47882.91DUG (compuesto del Ejemplo 176), AD47882.92DUG (compuesto del Ejemplo 177), AD47882.93DUG (compuesto del Ejemplo 178), AD47882.71DUG (compuesto obtenido mediante la aplicación del patrón de modificación de tipo 71 al compuesto

AD47882.88DUG), AD47882.80DUG (compuesto obtenido mediante la aplicación del patrón de modificación de tipo 80 al compuesto AD47882.88DUG) o AD47882.90DUG (compuesto obtenido mediante la aplicación del patrón de modificación de tipo 90 al compuesto AD47882.88DUG), y se confirmó que la concentración de hierro en plasma aumentó 28 días después del tratamiento. Estos resultados sugieren que al aplicar el mismo patrón de modificación que los de los compuestos mencionados anteriormente al ARNip de TfR2 con diferentes secuencias diana, se puede obtener ARNip capaz de suprimir de forma estable el nivel de expresión de ARNm de TfR2 para aumentar la concentración de hierro en plasma.

Ejemplo de Prueba 11: Prueba de evaluación de la eficacia del fármaco para el ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con la pérdida de la función de la médula ósea

Usando AD47882.23DUG (Ejemplo 171) y AD47882.94DUG (Ejemplo 179) como ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc, se llevó a cabo el siguiente experimento. Para inducir la pérdida de la función de la médula ósea, se administraron 100 mg/kg de carboplatino por vía intraperitoneal (i.p.) a ratones C57BL/6NJcl macho (de CLEA Japan, Inc.). El agrupamiento se realizó en función de la concentración de HGB y la concentración de hierro en plasma 4 días después de la administración de carboplatino, seguido de tratamiento con agente farmacológico (n = 6/grupo). El agente farmacológico se administró por vía subcutánea (s.c.) una vez a una dosis de 3 mg/kg (3 mpk) a un grupo de tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc. PBS se administró por vía subcutánea una vez a un grupo de vehículo.

Antes del tratamiento con agente farmacológico (Día 0), se extrajo sangre de la vena de la cola y se midió la concentración de HGB utilizando el kit QuantiChrom Whole Blood HB (fabricado por Bioassay Systems, LLC.). Los resultados para la concentración de HGB antes del tratamiento con el agente farmacológico se muestran en la Figura 14A (error $\pm$ estándar del valor promedio). La concentración de hierro en plasma se midió usando un kit de medición de hierro Metallo-assay (fabricado por Metallogenics Co., Ltd.). Los resultados para la concentración de hierro en plasma antes del tratamiento con el agente farmacológico se muestran en la Figura 14B (error $\pm$ estándar del valor promedio). La Figura 14C muestra los resultados para la concentración de hierro en plasma 8 días después del tratamiento con el agente farmacológico (Día 8). Nueve días después del tratamiento con el agente farmacológico (Día 9), se extrajo sangre de la vena abdominal grande bajo anestesia con isoflurano y se midió la concentración de HGB, la cantidad de MCH y el número de glóbulos

rojos utilizando un analizador de corpúsculos automático de múltiples elementos XT 2000 (fabricado por Sysmex Corporation). Los resultados se muestran en las Figuras 14D a 14F (error $\pm$ estándar del valor promedio), respectivamente.

Estos resultados muestran que mediante el tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc, se puede aumentar la concentración de hierro en plasma con el fin de aumentar la concentración de HGB, proporcionando así un efecto terapéutico sobre enfermedades anémicas tal como anemia asociada con disfunción de la médula ósea, por ejemplo, anemia asociada con mielofibrosis.

Ejemplo de Prueba 12: Prueba de evaluación de la eficacia del fármaco para ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con inflamación

Usando AD47882.92DUG (Ejemplo 177) y AD47882.94DUG (Ejemplo 179) como ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc, se llevó a cabo el siguiente experimento. Para inducir la inflamación, se administró trementina por vía subcutánea (s.c.) a ratones C57BL/6NJcl macho (de CLEA Japan, Inc.) a 150 μ L/ratón tres veces por semana. Se administró PBS por vía subcutánea en lugar de trementina a un grupo de control en el que no se indujo inflamación (control). Siete días después de la primera administración de trementina (Día 0), se extrajo sangre de la vena de la cola y se midieron la concentración de hierro en plasma y la concentración de HGB. La concentración de hierro en plasma se midió usando un kit de medición de hierro Metallo-assay (fabricado por Metallogenics Co., Ltd.). La concentración de HGB se midió usando el kit QuantiChrom Whole Blood HB (fabricado por Bioassay Systems, LLC.). Los resultados se muestran en las Figuras 15A Y 15B (error $\pm$ estándar del valor promedio), respectivamente. El agente farmacológico se administró a ratones C57BL/6NJcl macho (de CLEA Japan, Inc.) (n = 5/grupo). El agente farmacológico se administró por vía subcutánea una vez a una dosis de 3 mg/kg (3 mpk) a un grupo de tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc. PBS se administró por vía subcutánea una vez a un grupo de vehículo.

Cuatro días después del tratamiento con el agente farmacológico (Día 4) y 8 días después del tratamiento (Día 8), se extrajo sangre de la vena de la cola y se midió la concentración de hierro en plasma utilizando un kit de medición de hierro Metallo-assay (fabricado por Metallogenics Co., Ltd.). Los resultados se muestran en la Figura 15A (error $\pm$ estándar del valor promedio). Además, 8 días después del tratamiento con el agente farmacológico, se extrajo sangre de la vena abdominal grande bajo anestesia con isoflurano,

y se midieron la concentración de HGB, la cantidad de MCH y el número de glóbulos rojos utilizando un analizador de corpúsculos automático de múltiples elementos XT 2000 (fabricado por Sysmex Corporation). Los resultados se muestran en las Figuras 15C a 15E (error $\pm$ estándar del valor promedio), respectivamente. Los ratones se sacrificaron sin dolor mediante sangrado bajo anestesia con isoflurano, luego se aisló el hígado y se midió el nivel de expresión de ARNm de mTfR2. La extracción de ARN y la PCR cuantitativa se realizaron de la manera descrita en el Ejemplo de prueba 5. El nivel de expresión de ARNm de mTfR2 se estandarizó con el nivel de expresión de ARNm de mActb, que es el gen de mantenimiento. Los resultados para el nivel de expresión de ARNm de mTfR2 se muestran en la Figura 15F. Como se supone que el nivel de ARNm en el grupo de control que no experimentó inducción de inflamación es de 1,0, se calcularon y registraron los niveles relativos de ARNm en otros grupos (error $\pm$ estándar del valor promedio).

Estos resultados muestran que mediante el tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc, se puede suprimir el nivel de expresión de ARNm de TfR2 para aumentar la concentración de HGB, proporcionando así un efecto terapéutico sobre enfermedades anémicas tal como anemia asociada con inflamación, por ejemplo, anemia asociada con enfermedad renal crónica y anemia cancerosa.

Ejemplo de Prueba 13: Prueba de evaluación de la eficacia del fármaco para ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en ratones NUP98-HOXD13

Los ratones NUP98-HOXD13 (C57BL/6-Tg (Vav1-NUP98/HOXD13)G2Apl/J) se conocen como un modelo en ratón del síndrome mielodisplásico (MDS) caracterizado por hematopoyesis inefectiva y diferenciación y maduración insuficientes de los eritrocitos (Nature Medicine volumen 20, páginas 408-414 (2014)). Con el fin de verificar el efecto terapéutico del ARNip de TfR2 en MDS, se llevó a cabo una prueba de administración de ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en ratones NUP98-HOXD13. El compuesto utilizado fue AD47882.23DUG (Ejemplo 171).

Se compraron ratones NUP98-HOXD13 de The Jackson Laboratory Japan, Inc., y se usaron en el experimento. Los ratones se agruparon en función de la concentración de hierro en plasma, la concentración de HGB y el peso corporal en ratones NUP98-HOXD13 de cuatro meses de edad, seguido de tratamiento con agente farmacológico (n = 8/grupo). El agente farmacológico se administró por vía subcutánea (s.c.) una vez a la semana a una dosis de 5 mg/kg (5 mpk) a un grupo de tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc. PBS se administró por vía subcutánea una vez a la semana a un grupo de vehículo.

Dos semanas, cuatro semanas y ocho semanas después del inicio del tratamiento con el agente farmacológico, se extrajo sangre de la vena de la cola y se midió la concentración de hierro en plasma utilizando un kit de medición de hierro Metallo-assay (fabricado por Metallogenics Co., Ltd.). Los resultados se muestran en la Figura 16A (error $\pm$ estándar del valor promedio). Dos semanas, cuatro semanas, seis semanas y ocho semanas después del inicio del tratamiento con el agente farmacológico, se extrajo sangre de la vena de la cola y se midió la concentración de HGB utilizando el kit QuantiChrom Whole Blood HB (fabricado por Bioassay Systems, LLC.). Los resultados se muestran en la Figura 16B (error $\pm$ estándar del valor promedio). Ocho semanas después del inicio del tratamiento con el agente farmacológico, se extrajo sangre de la vena abdominal grande bajo anestesia con isoflurano, y se midieron la concentración de HGB, la cantidad de MCH y el número de glóbulos rojos utilizando un analizador de corpúsculos automático de múltiples elementos XT 2000 (fabricado por Sysmex Corporation). Los resultados se muestran en la Figura 16C a 16E (error $\pm$ estándar del valor promedio), respectivamente. Los ratones se sacrificaron sin dolor mediante sangrado bajo anestesia con isoflurano, luego se aisló el hígado y se midió el nivel de expresión de ARNm de mTfR2. La extracción de ARN y la PCR cuantitativa se realizaron de la manera descrita en el Ejemplo de prueba 5. El nivel de expresión de ARNm de mTfR2 se estandarizó con el nivel de expresión de ARNm de mActb, que es el gen de mantenimiento. Los resultados para el nivel de expresión de ARNm de mTfR2 se muestran en la Figura 16F. Como se supone que el nivel de ARNm en el grupo de vehículo es 1,0, se calcularon y registraron los niveles relativos de ARNm en otros grupos (error $\pm$ estándar del valor promedio).

Estos resultados muestran que mediante el tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc, se puede suprimir el nivel de expresión de ARNm de TfR2 con el fin de aumentar la concentración de hierro en plasma y dar como resultado un aumento en la concentración de HGB, proporcionando de este modo un efecto terapéutico en MDS que es una enfermedad anémica asociada con la pérdida de la función de la médula ósea.

Ejemplo de Prueba 14: Prueba de evaluación de la eficacia del fármaco para ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con enfermedad renal crónica

Usando el compuesto de AD47882.94DUG (Ejemplo 179) como ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc, se llevó a cabo el siguiente experimento. Para inducir la enfermedad renal crónica y la anemia asociada con la misma, se administró un alimento preparado para

tener un contenido de adenina (010-11513 fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) de 0,2% a ratones macho C57BL/6NJcl (de CLEA Japan, Inc.). Dos semanas después de administrar el alimento con 0,2% de adenina, se extrajo sangre de la vena de la cola y se midieron la concentración de hierro en plasma y la concentración de HGB. La concentración de hierro en plasma se midió usando un kit de medición de hierro Metallo-assay (fabricado por Metallogenics Co., Ltd.). La concentración de HGB se midió usando el kit QuantiChrom Whole Blood HB (fabricado por Bioassay Systems, LLC.). Los resultados se muestran en las Figuras 17A a 17B (error $\pm$ estándar del valor promedio), respectivamente. La agrupación se realizó en función de la concentración de hierro en plasma, la concentración de HGB y el peso corporal, seguido del tratamiento con el agente farmacológico (n = 6/grupo). El agente farmacológico se administró por vía subcutánea una vez a la semana a una dosis de 3 mg/kg (3 mpk), 1 mg/kg (1 mpk) o 0,3 mg/kg (0,3 mpk) a un grupo de tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc. Se administró PBS por vía subcutánea una vez a la semana a un grupo de vehículo. Se administró un alimento libre de adenina al 0,2% a un grupo de control en el que no se indujo anemia asociada con enfermedad renal crónica (control).

Seis semanas después del inicio del tratamiento con el agente farmacológico, se extrajo sangre de la vena de la cola y se midió la concentración de hierro en plasma utilizando un kit de medición de hierro Metallo-assay (fabricado por Metallogenics Co., Ltd.). Los resultados se muestran en la Figura 17C (error $\pm$ estándar del valor promedio). Seis semanas después del inicio del tratamiento con el agente farmacológico, se midió la concentración de HGB, la cantidad de MCH y el número de glóbulos rojos mediante la aplicación de un analizador de corpúsculos automático de múltiples elementos XT 2000 (fabricado por Sysmex Corporation) en la sangre extraída de la vena abdominal grande bajo anestesia con isoflurano. Los resultados se muestran en las Figuras 17D a 17F (error $\pm$ estándar del valor promedio), respectivamente. Los ratones se sacrificaron sin dolor mediante sangrado bajo anestesia con isoflurano, luego se aisló el hígado y se midió el nivel de expresión de ARNm de mTfR2. La extracción de ARN y la PCR cuantitativa se realizaron de la manera descrita en el Ejemplo de prueba 5. El nivel de expresión de ARNm de mTfR2 se estandarizó con el nivel de expresión de ARNm de mActb, que es el gen de mantenimiento. Los resultados para el nivel de expresión de ARNm de mTfR2 se muestran en la Figura 17G. Como se supone que el nivel de ARNm en el grupo de vehículo es 1,0, se calcularon y registraron los niveles de ARNm relativos en otros grupos (error $\pm$ estándar del valor promedio).

Estos resultados muestran que mediante el tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado

con GalNAc, se puede suprimir el nivel de expresión de ARNm de TfR2 para aumentar la concentración de hierro en plasma y la concentración de HGB, proporcionando así un efecto terapéutico sobre la anemia asociada con la enfermedad renal crónica.

Ejemplo de Prueba 15: Prueba de evaluación de la eficacia del fármaco para ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en un modelo en ratón de anemia asociada con la administración de ruxolitinib (inhibidor de JAK 1/JAK 2)

Para verificar el efecto del ARNip de TfR2 sobre la anemia provocada por la administración de ruxolitinib, se llevó a cabo el siguiente experimento usando el compuesto de AD47882.23DUG (Ejemplo 171) como ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc.

Para inducir la anemia provocada por la administración de ruxolitinib, se administró un alimento preparado para tener un contenido de ruxolitinib (R-6688 fabricado por LC Laboratories) de 0,1% a ratones macho C57BL/6NJcl (de CLEA Japan, Inc.). Seis semanas después de la administración del alimento que contiene 0,1% de ruxolitinib, se extrajo sangre de la vena de la cola y se midió la concentración de HGB utilizando un analizador de corpúsculos automático multielemento XT 2000 (fabricado por Sysmex Corporation). Los resultados se muestran en la Figura 18A (error $\pm$ estándar del valor promedio). El agrupamiento se realizó en función de la concentración de HGB y el peso corporal, seguido del tratamiento con el agente farmacológico (n = 5/grupo). El agente farmacológico se administró por vía subcutánea (s.c.) una vez a la semana a una dosis de 3 mg/kg (3 mpk) a un grupo de tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc. Se administró PBS por vía subcutánea una vez a la semana a un grupo de vehículo. Se administró un alimento libre de ruxolitinib al 0,1% a un grupo de control en el que no se indujo anemia provocada por ruxolitinib (control).

Tres semanas después del inicio del tratamiento con el agente farmacológico, se extrajo sangre de la vena de la cola y se midió la concentración de hierro en plasma utilizando un kit de medición de hierro Metallo-assay (fabricado por Metallogenics Co., Ltd.). Los resultados se muestran en la Figura 18B (error $\pm$ estándar del valor promedio). Seis semanas después del inicio del tratamiento con el agente farmacológico, se midió la concentración de HGB, la cantidad de MCH y el número de glóbulos rojos mediante la aplicación de un analizador de corpúsculos automático de múltiples elementos XT 2000 (fabricado por Sysmex Corporation) en la sangre extraída de la vena abdominal grande bajo anestesia con isoflurano. Los resultados se muestran en las Figuras 18C a 18E (error $\pm$ estándar del valor promedio), respectivamente. Los ratones se sacrificaron sin dolor mediante sangrado bajo anestesia

con isoflurano, luego se aisló el hígado y se midió el nivel de expresión de ARNm de mTfR2. La extracción de ARN y la PCR cuantitativa se realizaron de la manera descrita en el Ejemplo de prueba 5. El nivel de expresión de ARNm de mTfR2 se estandarizó con el nivel de expresión de ARNm de mActb, que es el gen de mantenimiento. Los resultados para el nivel de expresión de ARNm de mTfR2 se muestran en la Figura 18F. Como se supone que el nivel de ARNm en el grupo de control al que no se le administró el alimento que contiene ruxolitinib al 0,1% es de 1,0, se calcularon y registraron los niveles relativos de ARNm en otros grupos (error $\pm$ estándar del valor promedio).

Estos resultados muestran que puede ser posible proporcionar un efecto combinado de un inhibidor de JAK 2, tal como ruxolitinib, y ARNip de TfR2 en el tratamiento de la mielofibrosis.

Ejemplo de Prueba 16: Prueba de evaluación de la eficacia del fármaco para ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en ratones que expresan TfR2 humano

Para verificar el efecto del ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc sobre el ARNm de TfR2 humano, se llevó a cabo el siguiente experimento utilizando ratones humanizados TfR2 machos o hembras que tenían un locus del gen TfR2 humano y se generaron en Institute of Immunology Co., Ltd. Los ratones humanizados TfR2 se produjeron utilizando clones de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) que incluían el locus del gen TFR2 humano (RP11-264N5). Como ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc, se utilizaron TfR2-019.88DUG (compuesto del Ejemplo 162), TfR2-019.92DUG (compuesto del Ejemplo 167), TfR2-019.93DUG (compuesto del Ejemplo 168) y TfR2-019.94DUG (compuesto del Ejemplo 169).

El ARNip se administró por vía subcutánea (s.c.) a una dosis de 3 mg/kg (3 mpk) o 0,3 mg/kg (0,3 mpk) una vez (n = 3/grupo) al grupo de tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc. PBS se administró por vía subcutánea una vez (n = 4/grupo) al grupo de vehículo.

Siete días después del inicio del tratamiento con el agente farmacológico, los ratones se sacrificaron sin dolor mediante sangrado bajo anestesia con isoflurano, luego se aisló el hígado y se midió el nivel de expresión de ARNm de hTfR2. La extracción de ARN y la PCR cuantitativa se realizaron de la manera descrita en el Ejemplo de prueba 5. El nivel de expresión de ARNm de hTfR2 se estandarizó con el nivel de expresión de ARNm de mActb, que es el gen de mantenimiento. Como cebador para hTfR2, se utilizaron los descritos en los Ejemplos de prueba 1 y 2. Los resultados para el nivel de expresión de ARNm de hTfR2

se muestran en la Figura 19. Como se supone que el nivel de ARNm en el grupo de vehículo es 1,0, se calcularon y registraron los niveles relativos de ARNm en otros grupos (error $\pm$ estándar del valor promedio).

Estos resultados demuestran que el tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc permite la supresión del nivel de expresión del ARNm de TfR2 humano. Además, indican que la supresión del nivel de expresión del ARNm de TfR2 humano puede aumentar la concentración de HGB y proporcionar un efecto terapéutico para enfermedades anémicas tal como anemia asociada con disfunción de la médula ósea, por ejemplo, anemia asociada con fibrosis de médula ósea, y enfermedades anémicas tal como anemia asociada con inflamación, por ejemplo, anemia asociada con enfermedad renal crónica. Como otra prueba, los ratones obtenidos al inactivar adicionalmente TfR2 de ratón endógeno de ratones que expresan TfR2 humano se trataron con TfR2-019.94DUG (compuesto del Ejemplo 169), y se confirmó que incluso después de 42 días, se suprimió la expresión del gen TfR2 humano, y por lo tanto TfR2-019.94DUG tuvo un efecto de supresión de la expresión del gen TfR2 humano estable.

Ejemplo de Prueba 17: Prueba de evaluación de la eficacia del fármaco para ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc utilizando células hepáticas primarias humanas

Se sabe que el ARNip conjugado con GalNAc se incorpora en el hígado a través del receptor de asialoglicoproteína 1 (ASGPR) expresado en hepatocitos hepáticos. Para verificar el efecto del ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc en condiciones que no implican el uso de un reactivo de transfección, se realizó una prueba de evaluación de la eficacia del fármaco para el ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc utilizando células hepáticas primarias humanas. Como ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc, se utilizaron TfR2-019.88DUG (Ejemplo 162), TfR2-019.89DUG (Ejemplo 163), TfR2-019.90DUG (Ejemplo 164), TfR2-019.91DUG (Ejemplo 166), TfR2-019.92DUG (Ejemplo 167), TfR2-019.93DUG (Ejemplo 168), TfR2-019.94DUG (Ejemplo 169) y TfR2-019.95DUG (Ejemplo 170).

Cultivo de células hepáticas primarias humanas

Las células hepáticas primarias humanas (HMCPIS fabricadas por Life Technologies Corporation) almacenadas en un tanque de nitrógeno líquido se descongelaron usando un baño caliente a 37°C, y se vertieron en 10 mL de un medio de recuperación de hepatocitos crioconservados (CHRM) (CM7000 fabricado por Life Technologies Corporation) calentado de antemano a 37°C, y se realizó la mezcla de inversión. A partir de entonces, la mezcla se

centrifugó (100 g, 10 minutos), y el sobrenadante se removió. Luego se preparó una suspensión celular utilizando 5 mL de un medio de siembra celular calentado previamente a 37°C. Se preparó el medio de siembra celular mediante la adición de un paquete de suplemento de siembra de hepatocitos (CM3000 fabricado por Life Technologies Corporation) al medio E de William (A1217601 fabricado por Life Technologies Corporation). A partir de entonces, se contó el número de células vivas y se ajustó a 5×10^5 células/mL utilizando el medio de siembra de células. Las células se sembraron a 5×10^4 células por pocillo de una placa de 96 pocillos recubierta con colágeno y se cultivaron en una incubadora de CO₂ durante 4 a 6 horas. Usando un microscopio, se confirmó que las células se adhirieron a la placa. A partir de entonces, se llevó a cabo un experimento de adición de ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc.

Adición de ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc

Se preparó un medio que contiene ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc usando un medio de cultivo celular calentado de antemano a 37°C. Se prepararon una cantidad equivalente a 2 pocillos de una muestra de ARNip y una cantidad equivalente a 2 pocillos de un control negativo (NT) con agua destilada utilizada en lugar de ARNip. Las muestras se prepararon de tal manera que la concentración de ARNip se cambió de 10 000 nM a una concentración final de 4,8 nM usando una relación de dilución común de 5. Se preparó el medio de cultivo celular mediante la adición de un paquete de suplemento de mantenimiento de hepatocitos (CM4000 fabricado por Life Technologies Corporation) al medio E de William (A1217601 fabricado por Life Technologies Corporation). El medio de siembra celular en cada pocillo para células hepáticas primarias humanas sembradas en la placa de 96 pocillos se removió por succión, y luego se adicionó 100 µL del medio preparado que contiene ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc a cada pocillo. Tres días después de adicionar el compuesto, las células se lavaron una vez con PBS y se extrajo el ARN.

Extracción de ARN y qPCR

La extracción de ARN y la PCR cuantitativa se realizaron de la manera descrita en el Ejemplo de prueba 1. El nivel de expresión de ARNm de cada uno de hTfR2 y h18S se proporcionó como un valor promedio de dos pocillos. El nivel de expresión de ARNm de hTfR2 se estandarizó con el nivel de expresión de ARNm de h18S, que es el gen de mantenimiento. Como se supone que el nivel de expresión de ARNm de hTfR2 en el control negativo (NT) es 1,0, se calcularon y registraron los niveles relativos de expresión de ARNm

de hTfR2 de las muestras tratadas con ARNip (error $\pm$ estándar del valor promedio). Los resultados se muestran en las FIGURAS 20A a 20C, respectivamente.

Estos resultados muestran que mediante el tratamiento con ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc, el ARNip de TfR2 conjugado con GalNAc se incorpora en hepatocitos hepáticos humanos, suprimiendo así el nivel de expresión de ARNm de TfR2 humano. La supresión del nivel de expresión de ARNm de TfR2 humano puede aumentar la concentración de HGB, proporcionando así un efecto terapéutico sobre enfermedades anémicas tal como anemia asociada con disfunción de médula ósea, por ejemplo, anemia asociada con mielofibrosis, y enfermedades anémicas tal como anemia asociada con inflamación, por ejemplo anemia asociada con enfermedad renal crónica.

Ejemplo de Prueba 18: Efecto del ARNip de TfR2 con células HepG2 sobre la expresión génica de hepcidina

El nivel de expresión de ARNm de hepcidina se evaluó 2 días después de la introducción de ARNip en células HepG2 mediante un método de transfección inversa de la misma manera que en el Ejemplo de prueba 2. Como cebador para hepcidina, se usó Hs00221783_m1 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Como ARNip, se utilizaron TfR2-019 (Ejemplo 19), TfR2-039 (Ejemplo 39), TfR2-019.94DUG (Ejemplo 169) y TfR2-039.23DUG (Ejemplo 144).

Para evaluar el nivel de expresión de ARNm de hepcidina, se calcularon los niveles relativos de expresión de ARNm de hepcidina de las muestras tratadas con ARNip y se registraron como valores relativos, ya que se supone que el nivel de expresión de ARNm de hepcidina en el control negativo (NT) es de 1,0. Los resultados se muestran en la FIGURA 21.

Aplicabilidad industrial

El ARNip de la presente invención es capaz de suprimir la expresión del ARNm de TfR2 y puede suprimir la producción de hepcidina, que desempeña un papel clave en el metabolismo del hierro. El ARNip de la presente invención es beneficioso en el tratamiento o prevención de una enfermedad que se puede tratar o prevenir mediante la supresión de la expresión de ARNm de TfR2 y/o la producción de hepcidina.

Texto libre del Listado de Secuencias

SEQ ID NO: 1 - Secuencia de nucleótidos del ARNm de hTfR2

SEQ ID NO: 2 a 24 - Secuencias de nucleótidos de oligonucleótidos de hebra individual

SEQ ID NO: 25 a 28 - Secuencias de nucleótidos de regiones de hebra homosentido de oligonucleótidos de doble hebra

5 SEQ ID NO: 29 a 35 - Secuencias de nucleótidos de regiones de hebra antisentido de oligonucleótidos de hebra doble

SEQ ID NO: 36 y 37 - Secuencias de nucleótidos de regiones de hebra homosentido de oligonucleótidos de doble hebra

10 SEQ ID NO: 38 a 42 - Secuencias de nucleótidos de regiones de hebra antisentido de oligonucleótidos de hebra doble

SEQ ID NO: 43 - Secuencia de nucleótidos de una región complementaria de una región de hebra homosentido en TfR2-019

SEQ ID NO: 44 - Secuencia de nucleótidos de una región complementaria de una región de hebra antisentido en TfR2-019

15 SEQ ID NO: 45 - Secuencia de nucleótidos de una región complementaria de una región de hebra homosentido en TfR2-039

SEQ ID NO: 46 - Secuencia de nucleótidos de una región complementaria de una región de hebra antisentido en TfR2-039

20 SEQ ID NO: 47 - Secuencia de nucleótidos de una región de hebra homosentido de un oligonucleótido de doble hebra