



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020017769-5 A2



(22) Data do Depósito: 29/03/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 05/01/2021

(54) **Título:** MÉTODO E KIT PARA PRODUZIR UMA MOLÉCULA DE RNA DE FITA SIMPLES, E, MOLÉCULA DE OLIGORNA DE FITA SIMPLES.

(51) **Int. Cl.:** C12N 15/00; C12N 15/10; C12P 19/34; C12N 15/113.

(30) **Prioridade Unionista:** 30/03/2018 JP 2018-070423.

(71) **Depositante(es):** TORAY INDUSTRIES, INC..

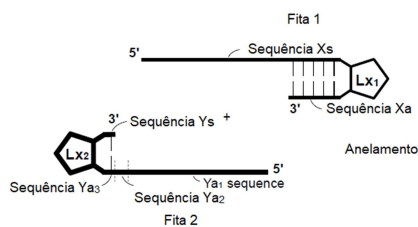
(72) **Inventor(es):** HIDEAKI INADA; KATSUHIKO ISEKI; KEIICHI OKIMURA; MASATO SANOSAKA; AYUMI TAKASHINA.

(86) **Pedido PCT:** PCT JP2019013923 de 29/03/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/189722 de 03/10/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 31/08/2020

(57) **Resumo:** A presente invenção provê um método para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo que inibe a expressão de um gene alvo. O método inclui (i) uma etapa de anelamento para anelar uma primeira molécula de oligoRNA de fita simples com uma segunda molécula de oligoRNA de fita simples e (ii) uma etapa de ligação para ligar, com o uso de uma ligase na família Rnl2, a extremidade 3' da primeira molécula de oligoRNA de fita simples à extremidade 5' da segunda molécula de oligoRNA de fita simples. A sequência produzida por meio da ligação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples à segunda molécula de oligoRNA de fita simples contém uma sequência de inibição de expressão de gene dirigida ao gene alvo.



MÉTODO E KIT PARA PRODUZIR UMA MOLÉCULA DE RNA DE FITA SIMPLES, E, MOLÉCULA DE OLIGORNA DE FITA SIMPLES
CAMPO DA TÉCNICA

[001] A presente invenção refere-se a um método para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo.

FUNDAMENTOS DA TÉCNICA

[002] Como uma tecnologia de inibição de expressão de gene, a interferência de RNA (RNAi), por exemplo, é conhecida (Literatura de Não Patente 1). Para inibição da expressão de gene mediada por interferência de RNA, é amplamente usado um protocolo com o uso de uma molécula de RNA de fita dupla curta chamada siRNA (RNA interferente pequeno). Além disso, foi relatada uma técnica para inibir a expressão de gene com o uso de uma molécula de RNA circular em que uma fita dupla é parcialmente formada por anelamento intramolecular (Literatura de Patente 1).

[003] Entretanto, o siRNA tem baixa estabilidade *in vivo*, e o siRNA é facilmente dissociado em RNAs de fita simples. Dessa forma, é difícil inibir de forma estável a expressão de gene. A Literatura de Patente 2 relata que uma molécula de RNA de cadeia longa de fita simples em forma de grampo preparada por meio da conexão de uma fita sentido e uma fita antissentido de siRNA em uma fita simples, com o uso de um ou dois ligantes formados com o uso de um derivado de amina cíclica, pode estabilizar o siRNA. Essa molécula de RNA de cadeia longa de fita simples em forma de grampo, entretanto, não pode ser sintetizada de modo eficaz por meio de um método de fosforamidita com o uso de amiditas universais, como amiditas TBDMS. Desta maneira, é necessário usar amiditas de RNA especiais (por exemplo, Literatura de Patente 2 e 3) para a síntese.

[004] A Literatura de Patente 4 descreve um método para ligar uma primeira fita de ácido nucleico e uma segunda fita de ácido nucleico com o uso de um ácido nucleico auxiliar como uma terceira fita de ácido nucleico e

T4 RNA ligase 2. Entretanto, a Literatura de Patente 4 mostra que à medida que o ácido nucleico auxiliar se torna mais longo, a reação prossegue mais lentamente, indicando que apenas ácidos nucleicos auxiliares limitados proveem eficiência de ligação favorável no método acima.

LISTA DE CITAÇÕES

LITERATURA DE PATENTE

[005] Literatura de Patente 1: Publicação de pedido de patente n° US 2004/058886

Literatura de Patente 2: Publicação internacional WO 2013/027843

Literatura de Patente 3: Publicação internacional WO 2016/159374

Literatura de Patente 4: Publicação internacional WO 2011/052013

Literatura de Não Patente

[006] Literatura Não Patente 1: Fire *et al.*, Nature, (1998) 19 de fevereiro; 391 (6669): 806-811.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

PROBLEMA DA TÉCNICA

[007] O problema subjacente à presente invenção é prover um método eficaz para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo capaz de inibir a expressão de um gene alvo.

SOLUÇÃO PARA O PROBLEMA

[008] Os presentes inventores conduziram estudos intensivos para solucionar o problema acima e, então, constataram que uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo que contém uma sequência de inibição de expressão de gene alvo pode ser produzida de modo eficaz, sem qualquer ácido nucleico auxiliar ou amidita de RNA especial, segmentando a molécula de RNA de fita simples em forma de grampo em duas moléculas de

oligoRNA de fita simples, em que cada um tem um ligante como um ligante de não nucleotídeo ou um ligante de nucleotídeo, e sintetizando as mesmas, e então anelando e ligando as moléculas; e as condições de ligação podem ser moduladas para aumentar ainda mais a eficiência de produção da molécula de RNA de fita simples em forma de grampo em relação à quantidade de enzima usada.

[009] Especificamente, a invenção inclui os seguintes.

[0010] [1] Um método para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo capaz de inibir a expressão de um gene alvo, sendo que o método compreende:

uma etapa de anelamento para anelar uma primeira molécula de oligoRNA de fita simples e uma segunda molécula de oligoRNA de fita simples; e

uma etapa de ligação para ligar a extremidade 3' da primeira molécula de oligoRNA de fita simples e a extremidade 5' da segunda molécula de oligoRNA de fita simples por uma ligase da família Rnl2,

em que a primeira molécula de oligoRNA de fita simples compreende uma primeira região de RNA e uma segunda região de RNA que são conectadas através de um primeiro ligante, e uma dentre a primeira região de RNA e a segunda região de RNA é capaz de se ligar de modo complementar à outra,

a segunda molécula de oligoRNA de fita simples compreende uma terceira região de RNA e uma quarta região de RNA que são conectadas através de um segundo ligante, e uma dentre a terceira região de RNA e a quarta região de RNA é capaz de se ligar de modo complementar à outra,

a primeira molécula de oligoRNA de fita simples e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples são capazes de formar uma fita dupla intermolecular entre sequências complementares na extremidade 5' ou extremidade 3' das mesmas,

quando a fita dupla é formada entre a primeira molécula de oligoRNA de fita simples e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples durante a etapa de anelamento, um corte ocorre entre o resíduo de ribonucleotídeo de extremidade 3' da primeira molécula de oligoRNA de fita simples e o resíduo de ribonucleotídeo de extremidade 5' da segunda molécula de oligoRNA de fita simples, e um interstício de pelo menos um resíduo de ribonucleotídeo está presente entre o resíduo de ribonucleotídeo de extremidade 5' da primeira molécula de oligoRNA de fita simples e o resíduo de ribonucleotídeo de extremidade 3' da segunda molécula de oligoRNA de fita simples, e

uma sequência produzida por meio da ligação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples compreende uma sequência de inibição de expressão de gene para o gene alvo.

[0011] [2] O método, de acordo com [1] acima, em que a primeira molécula de oligoRNA de fita simples é representada pela seguinte fórmula (I) e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples é representada pela seguinte fórmula (II):

$5'-X_s-L_{X_1}-X_a-3'$ --- fórmula (I)

$5'-Y_{a_1}-Y_{a_2}-Y_{a_3}-L_{X_2}-Y_s-3'$ --- fórmula (II)

em que X_s , X_a , Y_{a_1} , Y_{a_2} , Y_{a_3} , e Y_s representam, cada um, um ou mais resíduos de ribonucleotídeo,

L_{X_1} e L_{X_2} representam o primeiro ligante e o segundo ligante, respectivamente,

Y_{a_3} é complementar a Y_s ,

$X_a-Y_{a_1}$, que é gerado pela etapa de ligação, é complementar a X_s , e

$X_a-Y_{a_1}-Y_{a_2}-Y_{a_3}$, que é gerado pela etapa de ligação, compreende uma sequência de inibição de expressão de gene para o gene

alvo.

[0012] [3] O método, de acordo com [1] ou [2] acima, em que a primeira molécula de oligoRNA de fita simples tem uma uracila (U) ou adenina (A) na extremidade 3', e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples tem uma uracila (U) ou adenina (A) na extremidade 5'.

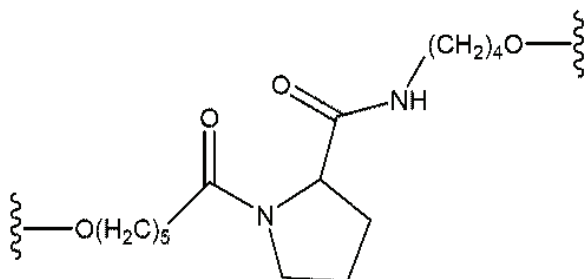
[0013] [4] Método, de acordo com qualquer um de [1] a [3] acima, em que o primeiro ligante e o segundo ligante são, cada um, independentemente (i) um ligante de não nucleotídeo que compreende pelo menos um selecionado a partir de uma cadeia principal de pirrolidina e uma cadeia principal de piperidina ou (ii) um ligante de nucleotídeo.

[0014] [5] O método, de acordo com qualquer um de [1] a [4] acima, em que a ligase da família Rnl2 é T4 RNA ligase 2.

[0015] [6] O método, de acordo com qualquer um de [1] a [5] acima, em que a ligação é realizada em uma solução de reação em pH 7,4 a 8,6.

[0016] [7] O método, de acordo com qualquer um de [1] a [6] acima, em que a ligação é realizada em uma solução de reação que compreende íon de metal divalente 2 a 10 mM.

[0017] [8] O método, de acordo com qualquer um de [1] a [7] acima, em que o primeiro ligante e o segundo ligante são, cada um, independentemente um ligante de não nucleotídeo representado pela seguinte fórmula (VI):



Fórmula (VI)

[0018] [9] O método, de acordo com qualquer um de [1] a [8] acima, em que o gene alvo é o gene TGF- β 1, gene GAPDH, gene LAMA1 ou gene LMNA.

[0019] [10] O método, de acordo com qualquer um de [1] a [9] acima, em que a molécula de RNA de fita simples em forma de grampo consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 1, e os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante e os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 50 e 51 são conectados através do segundo ligante.

[0020] [11] O método, de acordo com qualquer um de [1] a [10] acima, em que a primeira molécula de oligoRNA de fita simples e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples são qualquer um dentre os seguintes (1) a (6):

(1) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 7, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante, e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 6, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 10 e 11 são conectados através do segundo ligante;

(2) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 19, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante, e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 18, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 16 e 17 são conectados através do segundo ligante;

(3) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 27, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante, e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ

ID NO: 26, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 20 e 21 são conectados através do segundo ligante;

(4) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 29, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante, e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 28, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 21 e 22 são conectados através do segundo ligante;

(5) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 31, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante, e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 30, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 22 e 23 são conectados através do segundo ligante;

(6) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 33, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante, e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 32, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 23 e 24 são conectados através do segundo ligante.

[0021] [12] Uma molécula de oligoRNA de fita simples que é qualquer uma dentre as seguintes (a) a (l):

(a) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 7, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um ligante;

(b) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na

sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 6, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 10 e 11 são conectados através de um ligante;

(c) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 19, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um ligante;

(d) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 18, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 16 e 17 são conectados através de um ligante;

(e) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 27, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um ligante;

(f) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 26, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 20 e 21 são conectados através de um ligante;

(g) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 29, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um ligante;

(h) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 28, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 21 e 22 são conectados através de um ligante;

(i) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 31, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de

um ligante;

(j) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 30, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 22 e 23 são conectados através de um ligante;

(k) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 33, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um ligante; e

(l) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 32, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 23 e 24 são conectados através de um ligante.

[0022] [13] Um kit para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo para inibir a expressão de gene TGF- β 1, que compreende uma combinação de moléculas de oligoRNA de fita simples de qualquer uma dentre as seguintes (1) a (6):

(1) uma combinação de uma primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 7, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um primeiro ligante e uma segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 6, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 10 e 11 são conectados através de um segundo ligante;

(2) uma combinação de uma primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 19, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um primeiro ligante e uma segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos

apresentada na SEQ ID NO: 18, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 16 e 17 são conectados através de um segundo ligante;

(3) uma combinação de uma primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 27, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um primeiro ligante e uma segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 26, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 20 e 21 são conectados através de um segundo ligante;

(4) uma combinação de uma primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 29, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um primeiro ligante e uma segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 28, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 21 e 22 são conectados através de um segundo ligante;

(5) uma combinação de uma primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 31, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um primeiro ligante e uma segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 30, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 22 e 23 são conectados através de um segundo ligante; e

(6) uma combinação de uma primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste em uma sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 33, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um primeiro ligante e uma segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 32, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas

posições 23 e 24 são conectados através de um segundo ligante.

[0023] A presente descrição inclui o conteúdo descrito no pedido de patente japonês nº 2018-070423 do qual o presente descrição reivindica a prioridade.

EFEITOS VANTAJOSOS DA INVENÇÃO

[0024] De acordo com a invenção, uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo capaz de inibir a expressão de um gene alvo pode ser produzida de modo eficaz.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0025] [Figura 1] A Figura 1 é um desenho esquemático que ilustra um método de ligação como uma modalidade da invenção.

[0026] [Figura 2] A Figura 2 é um desenho esquemático de uma molécula de ssTbRNA (SEQ ID NO: 1). P representa um derivado de prolina. As posições 29 (U) a 47 (C) da SEQ ID NO: 1 correspondem a uma sequência ativa (uma sequência de inibição de expressão de gene para o gene TGF- β 1; uma sequência antissentido).

[0027] [Figura 3] A Figura 3 mostra a eficiência de ligação após o anelamento e a reação de ligação com T4 RNA ligase 2 de um conjunto (par) de moléculas de oligoRNA de fita simples (fitas 1 e 2) designadas como 004 a 019 na Tabela 1.

[0028] [Figura 4] A Figura 4 mostra as estruturas de moléculas de oligoRNA de fita simples (fitas 1 e 2) projetadas como 011, 016 e 018. A fita 1 é mostrada no lado direito e a fita 2 é mostrada no lado esquerdo em cada par.

[0029] [Figura 5] A Figura 5 mostra uma alteração em curso do tempo em eficiência de ligação quando ácidos oligo-nucleicos designados como 016 foram ligados em concentrações de oligoRNA diferentes e temperaturas de reação diferentes.

[0030] [Figura 6] A Figura 6 mostra uma alteração em curso do tempo

em eficiência de ligação quando oligoRNAs (100 μM) designados como 011, 016 e 018 foram ligados em temperaturas de reação diferentes. A e B mostram os resultados da ligação a 25°C e 37°C, respectivamente.

[0031] [Figura 7] A Figura 7 mostra os resultados da análise de PAGE de desnaturação quando oligoRNAs de 011 foram ligados sob as condições de concentrações de ATP diferentes.

[0032] [Figura 8] A Figura 8 mostra a eficiência de ligação quando oligoRNAs de 011 foram ligados sob as condições de concentrações de ATP diferentes.

[0033] [Figura 9] A Figura 9 mostra uma alteração em curso do tempo em eficiência de ligação quando oligoRNAs de 016 foram ligados sob as condições de concentrações de oligoRNA diferentes e sob condições de pH diferentes.

[0034] [Figura 10] A Figura 10 mostra eficiência de ligação quando oligoRNAs de 016 foram ligados sob condições de pH diferentes.

[0035] [Figura 11] A Figura 11 mostra a eficiência de ligação quando oligoRNAs de 016 foram ligados sob as condições de concentrações de oligoRNA diferentes e de concentrações de MgCl_2 diferentes. A e B mostram os resultados de ligação na presença de oligoRNAs a 10 μM ou 100 μM e oligoRNAs a 10 μM ou 200 μM , respectivamente.

[0036] [Figura 12] A Figura 12 mostra a eficiência de ligação quando oligoRNAs de 016 foram ligados sob as condições de concentrações de MgCl_2 diferentes e sob condições de pH diferentes. A e B mostram os resultados da ligação em pH 7,5 e pH 8,0, respectivamente.

[0037] [Figura 13] A Figura 13 mostra a eficiência de ligação quando a ligação foi realizada enquanto quantidades diferentes de enzima foram usadas e PEG foi adicionado.

[0038] [Figura 14] A Figura 14 mostra um curso do tempo da reação de ligação com o uso de concentrações de oligoRNA diferentes.

[0039] [Figura 15] A Figura 15 indica a quantidade de molécula de ssTbRNA, que é um produto de interesse, produzida durante uma reação de ligação, enquanto a concentração de oligoRNA inicial foi definida para 100 μM e oligoRNAs foram sequencialmente adicionados. Quantidade de molécula de ssTbRNA produzida (nmol) = (Quantidade de molécula de oligoRNA de fita simples adicionada) x (FLP (Produto de comprimento total)(%)) / 100. O eixo geométrico horizontal (h) do gráfico representa tempo após o início da ligação. No início da ligação, a concentração de oligoRNA foi de 100 μM (10 nmol) e a concentração de enzima foi de 4 unidades/nmol de oligoRNA. Após a adição inicial de oligoRNAs, a concentração de oligoRNA foi de 300 μM (40 nmol) e a concentração de enzima foi de 1 unidade/nmol de oligoRNA.

[0040] [Figura 16] A Figura 16 mostra a quantidade de molécula de ssTbRNA, que é um produto de interesse, produzida durante uma reação de ligação, enquanto a concentração de oligoRNA inicial foi definida para 200 μM e oligoRNAs foram sequencialmente adicionados. Quantidade de molécula de ssTbRNA produzida (nmol) = (Quantidade de molécula de oligoRNA de fita simples adicionada) x (FLP (%)) / 100. O eixo geométrico horizontal (h) do gráfico representa tempo após o início da ligação. No início da ligação, a concentração de oligoRNA foi de 200 μM (20 nmol) e a concentração de enzima foi de 4 unidades/nmol de oligoRNA. Após a adição inicial de oligoRNAs, a concentração de oligoRNA foi de 480 μM (80 nmol) e a concentração de enzima foi de 0,5 unidade/nmol de oligoRNA.

[0041] [Figura 17] A Figura 17 mostra moléculas de RNA de fita simples em forma de grampo que contêm uma sequência de inibição de expressão de gene para gene GAPDH, gene LAMA1 ou gene LMNA e suas posições de segmentação. (1) a (7) indicam as posições de segmentação. A sequência de inibição de expressão de gene (sequência ativa/sequência antissentido) para cada gene está em caixa.

[0042] [Figura 18] A Figura 18 mostra a eficiência de ligação após o anelamento e a reação de ligação de um par de moléculas de oligoRNA de fita simples (fitas 1 e 2), que são fragmentos de segmentação de uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo que contém uma sequência de inibição de expressão de gene para gene GAPDH, gene LAMA1 ou gene LMNA.

[0043] [Figura 19] A Figura 19 mostra a eficiência de ligação após o anelamento e a reação de ligação de um conjunto (par) de fitas 1 e 2 listado na Tabela 1 com o uso de T4 RNA ligase.

DESCRIÇÃO DAS MODALIDADES

[0044] Doravante, a invenção será descrita em detalhes.

[0045] A presente invenção se refere a um método para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo capaz de inibir a expressão de um gene alvo. Uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo produzida por um método da presente invenção tem uma estrutura de fita simples, em que a extremidade 3' da fita sentido e a extremidade 5' da fita antissentido de um RNA de fita dupla que contém uma sequência de inibição de expressão de gene são conectadas através de uma sequência que contém um ligante como um ligante de não nucleotídeo ou um ligante de nucleotídeo e pelo menos um resíduo de ribonucleotídeo é adicionalmente conectado, através de uma sequência que contém um ligante como um ligante de não nucleotídeo ou um ligante de nucleotídeo, à extremidade 3' da fita antissentido. A extremidade 5' e a extremidade 3' da molécula de RNA de fita simples em forma de grampo produzida pelo método da presente invenção não são ligadas entre as mesmas. Como usado aqui, "em forma de grampo" significa que uma molécula de RNA de fita simples é anelada de modo intramolecular (autoanelada) para formar pelo menos uma estrutura de fita dupla. Na molécula de RNA de fita simples em forma de grampo produzida pelo método da invenção, tipicamente, uma região lateral 5' que contém a

extremidade 5' e uma região lateral 3' que contém a extremidade 3' são, cada uma, de modo individual e intramolecular aneladas para formar duas estruturas de fita dupla. Como usado aqui, o "RNA", "molécula de RNA", "molécula de ácido nucleico" e "ácido nucleico" podem ser composto de apenas nucleotídeos ou podem ser compostos de nucleotídeos e substâncias de não nucleotídeos (por exemplo, um derivado de amina cíclica como um derivado de prolina).

[0046] Na invenção, uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo capaz de inibir a expressão de genes alvos é segmentada em dois fragmentos de segmentação, dentro de uma sequência entre dois ligantes (por exemplo, um ligante de não nucleotídeo, um ligante de nucleotídeo ou um ligante de combinação dos mesmos) da molécula, e os fragmentos de segmentação são sintetizados, anelados e, então, ligados, produzindo assim a molécula de RNA de fita simples em forma de grampo. A ligação significa que dois ácidos nucleicos (na invenção, tipicamente RNAs) são conectados por meio de ligação (isto é, por uma ligação de fosfodiéster) do grupo fosfato de extremidade 5' e do grupo hidroxila de extremidade 3'. Em um método da invenção, uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo relativamente longa pode ser produzida por meio da ligação de um par de moléculas de RNA de fita simples mais curtas. Esse método possibilita que a molécula de RNA de fita simples em forma de grampo seja produzida com sucesso em um alto rendimento.

[0047] Mais especificamente, a invenção se refere a um método para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo capaz de inibir a expressão de um gene alvo, sendo que o método compreende:

uma etapa de anelamento para anelar uma primeira molécula de oligoRNA de fita simples e uma segunda molécula de oligoRNA de fita simples; e

uma etapa de ligação para ligar a extremidade 3' da primeira

molécula de oligoRNA de fita simples e a extremidade 5' da segunda molécula de oligoRNA de fita simples por uma ligase da família Rnl2,

em que uma sequência produzida por meio da ligação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples compreende uma sequência de inibição de expressão de gene para o gene alvo.

[0048] No método da invenção, a primeira molécula de oligoRNA de fita simples compreende uma primeira região de RNA e uma segunda região de RNA que são conectadas através de um primeiro ligante, e uma dentre a primeira região de RNA e a segunda região de RNA está se ligando de modo complementar à outra. A ligação complementar faz com que o primeiro ligante forme uma alça. A primeira região de RNA e a segunda região de RNA podem formar uma haste adjacente à alça. Na primeira molécula de oligoRNA de fita simples, a primeira região de RNA está situada no lado de extremidade 5' e a segunda região de RNA está situada no lado de extremidade 3'. Além disso, a segunda molécula de oligoRNA de fita simples compreende uma terceira região de RNA e uma quarta região de RNA que são conectadas através de um segundo ligante, e uma dentre a terceira região de RNA e a quarta região de RNA é capaz de se ligar de modo complementar à outra, A ligação complementar faz com que o segundo ligante forme uma alça. A terceira região de RNA e a quarta região de RNA podem formar uma haste adjacente à alça. Na segunda molécula de oligoRNA de fita simples, a terceira região de RNA está situada no lado de extremidade 5' e a quarta região de RNA está situada no lado de extremidade 3'. A primeira até a quarta regiões de RNA compreendem, cada uma, um, dois ou mais resíduos de ribonucleotídeo. Desse modo, a primeira molécula de oligoRNA de fita simples e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples contêm, cada uma, uma sequência autocomplementar e são, cada uma, aneladas de modo intramolecular (autoaneladas) para formar uma estrutura em forma de

grampo. Uma dentre a primeira região de RNA ou a segunda região de RNA tem, de preferência, um comprimento de nucleotídeo mais longo que a outra. Além disso, uma dentre a terceira região de RNA ou a quarta região de RNA tem, de preferência, um comprimento de nucleotídeo mais longo que a outra. Quando a primeira região de RNA tem um comprimento de nucleotídeo mais longo que a segunda região de RNA, a terceira região de RNA tem, de preferência, um comprimento de nucleotídeo mais longo que a quarta região de RNA. Quando a segunda região de RNA tem um comprimento de nucleotídeo mais longo que a primeira região de RNA, a quarta região de RNA tem, de preferência, um comprimento de nucleotídeo mais longo que a primeira região de RNA. Da primeira região de RNA ou da segunda região de RNA, uma região de RNA que em um comprimento de nucleotídeo mais longo contém, de preferência, um(uns) resíduo(s) de ribonucleotídeo ou uma sequência do(s) mesmo(s) complementar à outra região de RNA que tem um comprimento de nucleotídeo mais curto, adjacente ao primeiro ligante. Da terceira região de RNA ou da quarta região de RNA, uma região de RNA que em um comprimento de nucleotídeo mais longo contém, de preferência, um(uns) resíduo(s) de ribonucleotídeo ou uma sequência do(s) mesmo(s) complementar à outra região de RNA que tem um comprimento de nucleotídeo mais curto, adjacente ao segundo ligante.

[0049] Na invenção, o fato de que uma das duas regiões de RNA (a primeira e a segunda regiões de RNA, ou a terceira e a quarta regiões de RNA) compreendidas na molécula de oligoRNA de fita simples é “capaz de se ligar de modo complementar à” outra significa que o comprimento total de uma das duas região de RNA (normalmente uma região de RNA que tem um comprimento de nucleotídeo mais curto) é capaz de se ligar à outra região de RNA (normalmente, uma região de RNA que tem um comprimento de nucleotídeo mais longo) enquanto forma um pareamento de bases estável. Nesse caso, o comprimento total da primeira região de RNA é complementar

a um(uns) resíduo(s) de ribonucleotídeo correspondente(s) ou sequência do(s) mesmo(s) dentro da última região de RNA. É mais preferencial que uma das duas regiões de RNA compreendidas na molécula de oligoRNA de fita simples seja completamente complementar a um(uns) resíduo(s) de ribonucleotídeo correspondente(s) ou sequência do(s) mesmo(s) dentro da outra região de RNA (isto é, todos os resíduos de ribonucleotídeo de uma das regiões de RNA não têm incompatibilidade com os resíduos de ribonucleotídeo correspondentes da outra região de RNA). Alternativamente, uma das duas regiões de RNA compreendidas na molécula de oligoRNA de fita simples pode conter uma ou mais, por exemplo, uma ou duas incompatibilidades de resíduos de ribonucleotídeo com a outra região de RNA, contanto que um pareamento de base estável possa ser formado. A expressão “capaz de se ligar de modo complementar a” também pode se aplicar a esse caso. Nesse sentido, entretanto, tais incompatibilidades, de preferência, não estão presentes em resíduos de ribonucleotídeo na(s) extremidade(s) de moléculas a serem ligadas no método da invenção.

[0050] Em uma modalidade, uma dentre a primeira região de RNA ou a quarta região de RNA é mais curta que a outra e tem, de preferência, 1 a 7, por exemplo, 1 a 6, 1 a 4, 1 a 3 ou 1 ou 2 nucleotídeos de comprimento. Nesse caso, uma mais longa (isto é, a outra) dentre a primeira região de RNA ou a quarta região de RNA pode ter de 19 a 28, por exemplo, de 19 a 27, de 19 a 25, de 19 a 23, de 20 a 28, de 21 a 27, de 20 a 25, de 22 a 27, de 23 a 26, de 24 a 28 ou de 26 a 28 nucleotídeos de comprimento.

[0051] Quando a primeira região de RNA é mais longa que a quarta região de RNA, a segunda região de RNA pode ter, porém sem limitação, de 1 a 20, por exemplo, de 2 a 20, de 2 a 15, de 3 a 10, de 3 a 6, de 5 a 12 ou de 9 a 12 nucleotídeos de comprimento. Quando a primeira região de RNA é mais curta que a quarta região de RNA, a segunda região de RNA pode ter, porém sem limitação, de 8 a 38, por exemplo de 8 a 36, de 12 a 36, de 14 a 34, de 14

a 33, de 14 a 36 ou de 20 a 34 nucleotídeos de comprimento.

[0052] A sequência de nucleotídeos da primeira região de RNA pode conter CC (citosina-citosina) adjacente a um ligante e, nesse caso, a sequência de nucleotídeos da segunda região de RNA contém, de preferência, GG (guanina-guanina) adjacente a um ligante para que seja complementar à sequência acima. Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos da primeira região de RNA pode conter ACC (adenina-citosina-citosina), GCC (guanina-citosina-citosina) ou UCC (uracila-citosina-citosina) adjacente a um ligante, e nesse caso, a sequência de nucleotídeos da segunda região de RNA contém, de preferência, GGU (guanina-guanina-uracila), GGC (guanina-guanina-citosina) ou GGA (guanina-guanina-adenina) adjacente a um ligante para que seja complementar à sequência acima. A sequência de nucleotídeos da terceira região de RNA pode conter C (citosina) adjacente a um ligante, e nesse caso, a sequência de nucleotídeos da quarta região de RNA contém, de preferência, G (guanina) adjacente a um ligante para que seja complementar ao resíduo acima.

[0053] O comprimento de nucleotídeo da primeira ou da segunda molécula de oligoRNA de fita simples, ou seja, o comprimento de nucleotídeo total das duas regiões de RNA (sem uma porção de ligante) é, porém sem limitação, de preferência, de 13 a 48 nucleotídeos de comprimento. Quando a primeira região de RNA é mais longa que a quarta região de RNA, o comprimento de nucleotídeo da primeira molécula de oligoRNA de fita simples, ou seja, o comprimento de nucleotídeo total da primeira e da segunda regiões de RNA (sem uma porção de ligante) é, de preferência, de 21 a 48, por exemplo, de 21 a 45, de 25 a 45, de 26 a 35, de 26 a 30, de 26 a 28 ou de 33 a 36 nucleotídeos de comprimento. Quando a primeira região de RNA é mais curta que a quarta região de RNA, o comprimento de nucleotídeo da primeira molécula de oligoRNA de fita simples, ou seja, o comprimento de nucleotídeo total da primeira e da segunda regiões de RNA (sem uma porção

de ligante) é, de preferência, de 13 a 45, por exemplo, de 13 a 43, de 15 a 41, de 15 a 30, de 17 a 25 ou de 20 a 25 nucleotídeos de comprimento.

[0054] Uma sequência de extremidade 5' e/ou uma sequência de extremidade 3' da primeira molécula de oligoRNA de fita simples e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples usadas em um método da invenção, são complementares uma à outra. A primeira molécula de oligoRNA de fita simples e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples são capazes de formar uma fita dupla intermolecular entre sequências complementares (de preferência entre sequências completamente complementares) na extremidade 5' ou extremidade 3' das moléculas de oligoRNA de fita simples. Mais especificamente, em uma modalidade, uma fita dupla intermolecular pode ser formada em virtude do fato de que uma sequência de extremidade 5' da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que tem uma estrutura em forma de grampo (uma sequência de extremidade 5' da primeira região de RNA, fora de uma haste-alça da estrutura em forma de grampo) e uma sequência de extremidade 5' da segunda molécula de oligoRNA de fita simples que tem uma estrutura em forma de grampo (uma sequência de extremidade 5' da terceira região de RNA, fora de uma haste-alça da estrutura em forma de grampo) são complementares uma à outra. Em uma outra modalidade, uma fita dupla intermolecular pode ser formada em virtude do fato de que uma sequência de extremidade 3' da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que tem uma estrutura em forma de grampo (uma sequência de extremidade 3' da segunda região de RNA, fora de uma haste-alça da estrutura em forma de grampo) e uma sequência de extremidade 3' da segunda molécula de oligoRNA de fita simples que tem uma estrutura em forma de grampo (uma estrutura de extremidade 3' da quarta região de RNA, fora de uma haste-alça da estrutura em forma de grampo) são complementares uma à outra. Em uma etapa de anelamento em um método da invenção, a primeira molécula de

oligoRNA de fita simples e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples podem formar uma fita dupla intermolecular entre as sequências complementares na extremidade 5' ou extremidade 3' para produzir um oligoRNA de fita dupla.

[0055] Em uma modalidade, o comprimento de sequências complementares entre a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples (sem uma porção de interstício descrita a seguir) pode ser, porém sem limitação, normalmente de 6 ou mais longo, por exemplo, 7 ou mais longo, 10 ou mais longo, 12 ou mais longo, 14 ou mais longo, ou 18 ou mais longo e, por exemplo, de 6 a 27, de 7 a 25, de 10 a 25, de 12 a 23, de 12 a 22, de 12 a 15 ou de 18 a 23 nucleotídeos de comprimento.

[0056] Quando uma fita dupla é formada entre a primeira molécula de oligoRNA de fita simples e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples durante uma etapa de anelamento em um método da invenção, ocorre um corte entre o resíduo de ribonucleotídeo de extremidade 3' da primeira molécula de oligoRNA de fita simples e o resíduo de ribonucleotídeo de extremidade 5' da segunda molécula de oligoRNA de fita simples. Mais especificamente, durante a etapa de anelamento, as sequências complementares entre a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples são aneladas de modo intermolecular para formar uma fita dupla (fita dupla intermolecular) entre a primeira molécula de oligoRNA de fita simples e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples. Além disso, a primeira e a segunda regiões de RNA e a terceira e a quarta regiões de RNA são, cada uma, aneladas de modo intramolecular para formar uma fita dupla (uma fita dupla intramolecular, ou seja, uma estrutura em forma de grampo); e ocorre um corte entre a segunda região de RNA e a terceira região de RNA. Como usado aqui, o “corte” se refere a um estado em que uma ligação de fosfodiéster é clivada entre dois resíduos de nucleotídeo de uma dentre as fitas de nucleotídeo de uma fita dupla de ácido nucleico e o grupo hidroxila 3' e o

grupo fosfato 5' são dissociados. O corte pode ser unido por uma reação de ligação.

[0057] Quando uma fita dupla é formada entre a primeira molécula de oligoRNA de fita simples e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples durante a etapa de anelamento em um método da invenção, um interstício de pelo menos um resíduo de ribonucleotídeo está presente entre o resíduo de ribonucleotídeo de extremidade 5' da primeira molécula de oligoRNA de fita simples e o resíduo de ribonucleotídeo de extremidade 3' da segunda molécula de oligoRNA de fita simples. Esse interstício não é preenchido por uma reação de ligação. Dessa forma, a primeira molécula de oligoRNA de fita simples e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples são ligadas para formar uma molécula de RNA de fita simples. O interstício de pelo menos um resíduo de ribonucleotídeo pode ser um interstício de 1 a 4 resíduos (1, 2, 3 ou 4 resíduos). Nesse interstício, nenhum pareamento de base é formado.

[0058] Esse interstício entre o resíduo de ribonucleotídeo de extremidade 5' da primeira molécula de oligoRNA de fita simples e o resíduo de ribonucleotídeo de extremidade 3' da segunda molécula de oligoRNA de fita simples pode ser posicionado próximo ao primeiro ligante ou pode ser posicionado próximo ao segundo ligante em uma fita dupla que tem a primeira molécula de oligoRNA de fita simples e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples aneladas.

[0059] Uma sequência produzida por meio da ligação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples compreende uma sequência de inibição de expressão de gene para um gene alvo. A primeira região de RNA ou a quarta região de RNA pode conter uma sequência de inibição de expressão de gene (uma sequência sentido ou uma sequência antissentido; por exemplo, uma sequência sentido) para um gene alvo. Uma sequência em que a segunda região de RNA e a terceira região de RNA são ligadas por meio de ligação podem conter uma

sequência de inibição de expressão de gene (uma sequência antissentido ou uma sequência sentido; por exemplo, uma sequência antissentido) para um gene alvo. Em uma modalidade, a segunda região de RNA ou a terceira região de RNA pode conter uma sequência de inibição de expressão de gene (uma sequência antissentido ou uma sequência sentido; por exemplo, uma sequência antissentido) para um gene alvo.

[0060] Em um método da invenção, um ligante, por exemplo, o primeiro ligante ou o segundo ligante pode ser um ligante de não nucleotídeo, um ligante de nucleotídeo ou uma combinação dos mesmos.

[0061] Em uma modalidade, a primeira molécula de oligoRNA de fita simples tem uma uracila (U) ou adenina (A) na extremidade 3', e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples tem uma uracila (U) ou adenina (A) na extremidade 5'. Aqui, o fato de que uma molécula de oligoRNA de fita simples tem uma uracila (U) ou adenina (A) na extremidade 3' ou na extremidade 5' significa que o resíduo de ribonucleotídeo de extremidade 3' ou 5' da molécula de oligoRNA de fita simples contém, como um nucleotídeo, uma uracila (U) ou adenina (A). Especificamente, U-A, U-U, A-U ou A-A pode ser uma combinação preferencial de um nucleotídeo do resíduo de ribonucleotídeo de extremidade 3' da primeira molécula de oligoRNA de fita simples e um nucleotídeo do resíduo de ribonucleotídeo de extremidade 5' da segunda molécula de oligoRNA de fita simples.

[0062] A Figura 1 é um desenho esquemático que ilustra um método de acordo com uma modalidade da invenção. Na Figura 1, Lx_1 e Lx_2 são, cada um, um ligante (por exemplo, um ligante de não nucleotídeo, um ligante de nucleotídeo ou uma combinação dos mesmos). Em um método da invenção, uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo relativamente longa pode ser produzida por meio da ligação de um par de moléculas de RNA de fita simples mais curtas. Isso permite um alto rendimento.

[0063] Em uma modalidade, um método para produzir uma molécula

de RNA de fita simples em forma de grampo capaz de inibir a expressão de um gene alvo de acordo com a invenção compreende

uma etapa de anelamento para anelar uma primeira molécula de oligoRNA de fita simples (Fita 1 na Figura 1) representada pela seguinte fórmula (I):

5'-Xs-L_{X1}-Xa-3' --- fórmula (I)

uma segunda molécula de oligoRNA de fita simples (fita 2 na Figura 1) representada pela seguinte fórmula (II):

5'-Ya₁-Ya₂-Ya₃-L_{X2}-Ys-3' --- fórmula (II), e

uma etapa de ligação para ligar a extremidade 3' da primeira molécula de oligoRNA de fita simples à extremidade 5' da segunda molécula de oligoRNA de fita simples. Essa ligação pode ser realizada com o uso de uma ligase da família Rnl2.

[0064] Em uma outra modalidade, um método para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo capaz de inibir a expressão de um gene alvo de acordo com a invenção compreende:

uma etapa de anelamento para anelar uma primeira molécula de oligoRNA de fita simples representada pela seguinte fórmula (A):

5'-XXs-L_{X1}-XXa₃-XXa₂-XXa₁-3' --- fórmula (A); e

uma segunda molécula de oligoRNA de fita simples representada pela seguinte fórmula (B):

5'-YYa-L_{X2}-YYs-3' --- fórmula (B), e

uma etapa de ligação para ligar a extremidade 3' da primeira molécula de oligoRNA de fita simples à extremidade 5' da segunda molécula de oligoRNA de fita simples. Essa ligação pode ser realizada com o uso de uma ligase da família Rnl2.

[0065] Como usado aqui, o “oligoRNA” e “molécula de oligoRNA” se referem a uma molécula de RNA que tem uma sequência de nucleotídeos com um comprimento de nucleotídeo de 49 ou menos (o número de resíduos

em uma porção de ligante como um ligante de não nucleotídeo e um ligante de nucleotídeo não é contabilizado). Como usado aqui, os termos “oligoRNA” e “molécula de oligoRNA” são usados comumente e de forma intercambiável. A molécula de oligoRNA de fita simples na invenção é às vezes chamada de um oligoRNA de fita simples, ácido oligo nucleico, molécula de ácido nucleico de fita simples, oligoRNA ou molécula de oligoRNA.

[0066] Nas fórmulas (I) e (II), Xs, Xa, Ya₁, Ya₂, Ya₃, e Ys representam, cada um, um ou mais resíduos de ribonucleotídeo. Nas fórmulas (I) e (II), Lx₁ e Lx₂ representam, cada um, independentemente um ligante como um ligante de não nucleotídeo, um ligante de nucleotídeo ou uma combinação dos mesmos.

[0067] A fórmula (I) representa uma estrutura em que as regiões Xs e Xa são conectadas através de Lx₁. A fórmula (II) representa uma estrutura em que uma sequência de ribonucleotídeos (Ya₁-Ya₂-Ya₃) que tem regiões Ya₁, Ya₂ e Ya₃ conectadas nessa ordem e uma região Ys são conectadas através de Lx₂.

[0068] Nas fórmulas (A) e (B), XXs, XXa₃, XXa₂, XXa₁, YYa e YYS representam, cada um, um ou mais resíduos de ribonucleotídeo. Nas fórmulas (A) e (B), Lx₁ e Lx₂ representam, cada um, independentemente um ligante como um ligante de não nucleotídeo, um ligante de nucleotídeo ou uma combinação dos mesmos.

[0069] A fórmula (A) representa uma estrutura em que uma sequência de ribonucleotídeos (XXa₃-XXa₂-XXa₁) que tem regiões XXa₃, XXa₂ e XXa₁ conectadas nessa ordem e uma região XXs são conectadas através de Lx₁. A fórmula (B) representa uma estrutura em que as regiões YYa e YYS são conectadas através de Lx₂.

[0070] Xs, Xa, Ya₁, Ya₂, Ya₃, Ys, XXs, XXa₃, XXa₂, XXa₁, YYa e YYS são, cada um, compostos de um(uns) resíduo(s) de ribonucleotídeo. O(s) resíduo(s) de ribonucleotídeo pode(m) conter nucleobase(s) selecionada(s) a

partir de adenina, uracila, guanina ou citosina. O(s) resíduo(s) de ribonucleotídeo também pode(m) ter um(uns) resíduo(s) de ribonucleotídeo modificado(s) e tem(têm), por exemplo, uma(s) nucleobase(s) modificada(s) (base(s) modificada(s)). Os exemplos da modificação incluem, porém sem limitação, identificação com corante fluorescente, metilação, halogenação, pseudouridilação, aminação, desaminação, tiolação ou di-hidroxilação. Cada um dentre Xs, Xa, Ya₁, Ya₂, Ya₃ e Ys independentemente pode consistir em apenas um(uns) resíduo(s) de ribonucleotídeo não modificado(s), pode conter um(uns) resíduo(s) de ribonucleotídeo não modificado(s) e um(uns) resíduo(s) de ribonucleotídeo modificado(s) ou pode conter apenas um(uns) resíduo(s) de ribonucleotídeo modificado(s). A extremidade 5' de Xs pode conter um resíduo de ribonucleotídeo modificado. A extremidade 3' de Ys pode conter um resíduo de ribonucleotídeo modificado. De modo semelhante, cada um dentre XXs, XXa₃, XXa₂, XXa₁, YYa e YYs independentemente pode consistir em apenas um(uns) resíduo(s) de ribonucleotídeo não modificado(s), pode conter um(uns) resíduo(s) de ribonucleotídeo não modificado(s) e um(uns) resíduo(s) de ribonucleotídeo modificado(s) ou pode conter apenas um(uns) resíduo(s) de ribonucleotídeo modificado(s). A extremidade 5' de XXs pode conter um resíduo de ribonucleotídeo modificado. A extremidade 3' de YYs pode conter um resíduo de ribonucleotídeo modificado.

[0071] O Xa-Ya₁ produzido na etapa de ligação na invenção (uma sequência de nucleotídeos em que Xa e Ya₁ são ligados por meio de ligação) é complementar a Xs. Em uma modalidade, Xs pode ter de 19 a 28, por exemplo, de 19 a 27, de 19 a 25, de 19 a 23, de 20 a 28, de 21 a 27, de 21 a 25, de 22 a 27, de 23 a 26, de 24 a 28 ou de 26 a 28 nucleotídeos de comprimento.

[0072] O XXa₁-YYa produzido na etapa de ligação na invenção (uma sequência de nucleotídeos em que XXa₁ e YYa são ligados por meio de ligação) é complementar a YYs. Em uma modalidade, YYs pode ter de 19 a

28, por exemplo, de 19 a 27, de 19 a 25, de 19 a 23, de 20 a 28, de 21 a 27, de 21 a 25, de 22 a 27, de 23 a 26, de 24 a 28 ou de 26 a 28 nucleotídeos de comprimento.

[0073] Na invenção, Xa é complementar a um(uns) resíduo(s) correspondente(s) ou sequência em Xs. Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos de Xs na fórmula (I) pode conter C (citosina) adjacente a um ligante. Nesse caso, a sequência de nucleotídeos de Xa contém G (guanina) que é complementar a Xs e adjacente ao ligante. Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos de Xs na fórmula (I) pode conter CC (citosina-citosina) adjacente a um ligante. Nesse caso, a sequência de nucleotídeos de Xa contém GG (guanina-guanina) que é complementar a Xs e adjacente ao ligante. Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos de Xs na fórmula (I) pode conter ACC (adenina-citosina-citosina) adjacente a um ligante. Nesse caso, a sequência de nucleotídeos de Xa contém GGU (guanina-guanina-uracila) que é complementar a Xs e adjacente ao ligante. Em uma modalidade, Xa pode conter um nucleotídeo uracila (U) ou adenina (A) na extremidade 3'. Xa pode ter de 1 a 20, por exemplo, de 2 a 20, de 2 a 15, de 3 a 10, de 3 a 6, de 5 a 12 ou de 9 a 12 nucleotídeos de comprimento.

[0074] Na invenção, XXa₃ é complementar a XXs. Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos de XXs na fórmula (A) pode conter C (citosina) adjacente a um ligante. Nesse caso, a sequência de nucleotídeos de XXa₃ contém G (guanina) que é complementar a XXs e adjacente ao ligante. Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos de XXs na fórmula (A) pode conter CC (citosina-citosina) adjacente a um ligante. Nesse caso, a sequência de nucleotídeos de XXa₃ contém GG (guanina-guanina) que é complementar a XXs e adjacente ao ligante. Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos de XXs na fórmula (A) pode conter ACC (adenina-citosina-citosina; em uma direção 5' a 3') adjacente a um ligante. Nesse caso, a sequência de nucleotídeos de XXa₃ contém GGU (guanina-guanina-uracila;

em uma direção 5' a 3') que é complementar a XXs e adjacente ao ligante. Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos de XXa₁ pode conter um nucleotídeo uracila (U) ou adenina (A) na extremidade 3'. XXa₃ e XXs têm, cada um, de preferência, de 1 a 7, por exemplo de 1 a 4 ou 1 ou 2 nucleotídeos de comprimento. Em uma modalidade, quando YYs tem de 26 a 28 nucleotídeos de comprimento, XXa₃ e XXs podem ter, cada um, 1 nucleotídeo de comprimento.

[0075] Na invenção, Ya₃ é complementar a Ys. Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos de Ya₃ pode conter C (citosina) adjacente a um ligante. Nesse caso, a sequência de nucleotídeos de Ys contém G (guanina) que é complementar a Ya₃ e adjacente ao ligante. Ya₃ e Ys têm, cada um, de preferência, de 1 a 7, por exemplo, de 1 a 4 ou 1 ou 2 nucleotídeos de comprimento. Em uma modalidade, quando Xs tem de 26 a 28 nucleotídeos de comprimento, Ya₃ e Ys podem ter, cada um, 1 nucleotídeo de comprimento.

[0076] Na invenção, YYa é complementar a um(uns) resíduo(s) correspondente(s) ou sequência em YYs. Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos de YYa pode conter C (citosina) adjacente a um ligante. Nesse caso, a sequência de nucleotídeos de YYs contém G (guanina) que é complementar a YYa e adjacente ao ligante. YYa pode ter de 2 a 20, por exemplo, de 2 a 15, de 3 a 10, de 3 a 6, de 5 a 12 ou de 9 a 12 nucleotídeos de comprimento.

[0077] Como usado aqui, o “complementar” significa que um pareamento de base estável pode ser formado entre dois ácidos nucleicos ou nucleotídeos. Os dois ácidos nucleicos complementares têm o mesmo comprimento de nucleotídeo. Os dois ácidos nucleicos complementares tipicamente consistem em sequências complementares uma à outra (fitas complementares), ou seja, são completamente complementares. Alternativamente, os dois ácidos nucleicos complementares podem

compreender um(uns) nucleotídeo(s) modificado(s) e um(uns) nucleotídeo(s) que podem formar um pareamento de base com os mesmos em uma(s) posição(ões) correspondente(s) durante o anelamento.

[0078] Y_{a_2} deixa de formar qualquer pareamento de base com Xs ou Ys quando uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo após a ligação na invenção é anelada de modo intramolecular (autoanelada). Y_{a_2} tem, de preferência, de 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, por exemplo, 1, 2 ou 3 nucleotídeos de comprimento. De modo semelhante, XX_{a_2} deixa de formar qualquer pareamento de base com XXs ou YYs quando uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo após a ligação na invenção é anelada de modo intramolecular (autoanelada). XX_{a_2} tem, de preferência, de 1 a 4, por exemplo, 1, 2 ou 3 nucleotídeos de comprimento.

[0079] Em relação à primeira molécula de oligoRNA de fita simples (fita 1), o comprimento de nucleotídeo total de Xs e Xa (sem uma porção de ligante, como um ligante de não nucleotídeo, um comprimento de nucleotídeo ou uma combinação dos mesmos) na fórmula (I) é, de preferência, de 21 a 48, por exemplo, de 21 a 45, de 25 a 45, de 26 a 35, de 26 a 30, de 26 a 28 ou de 33 a 36 nucleotídeos de comprimento.

[0080] Em relação à segunda molécula de oligoRNA de fita simples (fita 2), Y_{a_1} na fórmula (II) tem, de preferência, de 6 a 27, por exemplo, de 7 a 25, de 10 a 25, de 12 a 23, de 12 a 22, de 12 a 15 ou de 18 a 23 nucleotídeos de comprimento.

[0081] Em relação à segunda molécula de oligoRNA de fita simples (fita 2), o comprimento de nucleotídeo total de Y_{a_1} , Y_{a_2} , Y_{a_3} e Ys (sem uma porção de ligante, como um ligante de não nucleotídeo, um comprimento de nucleotídeo ou uma combinação dos mesmos) na fórmula (II) é, de preferência, de 13 a 45, por exemplo, de 13 a 43, de 15 a 41, de 15 a 30, de 17 a 25 ou de 20 a 25 nucleotídeos de comprimento.

[0082] Em relação à primeira molécula de oligoRNA de fita simples

(fita 1), o comprimento de nucleotídeo total de XXs, XXa₃, XXa₂ e XXa₁ (sem uma porção de ligante, como um ligante de não nucleotídeo, um comprimento de nucleotídeo ou uma combinação dos mesmos) na fórmula (A) é, de preferência, de 13 a 45, por exemplo, de 13 a 43, de 15 a 41, de 15 a 30, de 17 a 25 ou de 20 a 25 nucleotídeos de comprimento.

[0083] XXa₁ tem, de preferência, de 6 a 27, por exemplo, de 7 a 25, de 10 a 25, de 12 a 23, de 12 a 22, de 12 a 15 ou de 18 a 23 nucleotídeos de comprimento.

[0084] Em relação à segunda molécula de oligoRNA de fita simples (fita 2), o comprimento de nucleotídeo total de YYa e YYs (sem uma porção de ligante, como um ligante de não nucleotídeo, um comprimento de nucleotídeo ou uma combinação dos mesmos) na fórmula (B) é, de preferência, de 21 a 48, por exemplo, de 21 a 45, de 25 a 45, de 26 a 35, de 26 a 30, de 26 a 28 ou de 33 a 36 nucleotídeos de comprimento.

[0085] Na invenção, os ligantes como o primeiro ligante e o segundo ligante não são particularmente limitados e podem ser, cada um, independentemente, por exemplo, um ligante de não nucleotídeo, um ligante de nucleotídeo ou uma combinação dos mesmos. O ligante de nucleotídeo compreende um ou mais resíduos de nucleotídeo (resíduos de ribonucleotídeo ou resíduos de desoxirribonucleotídeo; de preferência, resíduos de ribonucleotídeo). O ligante de não nucleotídeo não contém nenhum resíduo de nucleotídeo. A unidade constituinte de um ligante usado na invenção não é particularmente limitada e pode ser um(uns) resíduo(s) de nucleotídeo e/ou um(uns) resíduo(s) de não nucleotídeo. O ligante de combinação de um ligante de não nucleotídeo e um ligante de nucleotídeo contém tanto um(uns) resíduo(s) de nucleotídeo e um(uns) resíduo(s) de não nucleotídeo. Um ligante na invenção pode ser composto de, por exemplo, qualquer um dos seguintes resíduos (1) a (7):

(1) um(uns) resíduo(s) de nucleotídeo não modificado(s);

- (2) um(uns) resíduo(s) de nucleotídeo modificado(s);
- (3) uma combinação de um(uns) resíduo(s) de nucleotídeo não modificado(s) e um(uns) resíduo(s) de nucleotídeo modificado(s);
- (4) um(uns) resíduo(s) de não nucleotídeo(s);
- (5) uma combinação de um(uns) resíduo(s) de não nucleotídeo e um(uns) resíduo(s) de nucleotídeo não modificado(s);
- (6) uma combinação de um(uns) resíduo(s) de não nucleotídeo e um(uns) resíduo(s) de nucleotídeo modificado(s); e
- (7) uma combinação de um(uns) resíduo(s) de não nucleotídeo, um(uns) resíduo(s) de nucleotídeo não modificado(s) e um(uns) resíduo(s) de nucleotídeo modificado(s).

[0086] Em uma modalidade, tanto o primeiro ligante como o segundo ligante podem consistir em um(uns) resíduo(s) de nucleotídeo (um ligante de nucleotídeo) ou podem consistir em um(uns) resíduo(s) de não nucleotídeo (um ligante não nucleotídeo). Alternativamente, um dentre o primeiro ligante ou o segundo ligante pode consistir em um(uns) resíduo(s) de nucleotídeo e o outro pode consistir em um(uns) resíduo(s) de não nucleotídeo. O primeiro ligante e o segundo ligante (como ligantes Lx_1 e Lx_2 nas fórmulas acima) podem ter a mesma estrutura ou podem ter estruturas diferentes.

[0087] Um ligante, como o primeiro ligante ou o segundo ligante (Lx_1 ou Lx_2 nas fórmulas acima) usado na invenção contém um(uns) resíduo(s) de não nucleotídeo. Nesse caso, o número de resíduos de não nucleotídeo não é particularmente limitado e pode ser, por exemplo, de 1 a 8, de 1 a 6, de 1 a 4 ou 1, 2 ou 3. O “resíduo(s) de não nucleotídeo” se refere a uma unidade constituinte do ligante de não nucleotídeo. Os exemplos do(s) resíduo(s) de não nucleotídeo incluem, porém sem limitação, um derivado de amina cíclica que tem uma cadeia principal de pirrolidina ou uma cadeia principal de piperidina. O(s) resíduo(s) de não nucleotídeo pode(m) ter, por exemplo, uma estrutura representada pela fórmula (III) descrita abaixo como uma unidade

(uma estrutura).

[0088] Em uma modalidade da invenção, um ligante, como o primeiro ligante ou o segundo ligante (Lx_1 ou Lx_2 nas fórmulas acima) pode ser um ligante de não nucleotídeo que contém pelo menos uma dentre uma cadeia principal de pirrolidina e/ou uma cadeia principal de piperidina. O primeiro ligante e o segundo ligante (como Lx_1 e Lx_2 nas fórmulas acima) podem ter a mesma estrutura ou podem ter estruturas diferentes. O primeiro ligante e o segundo ligante (como Lx_1 e Lx_2 nas fórmulas acima), cada um, independentemente, podem ter uma estrutura de não nucleotídeo que contém uma cadeia principal de pirrolidina, podem ter uma estrutura de não nucleotídeo que contém uma cadeia principal de piperidina ou podem ter tanto a estrutura de não nucleotídeo que contém uma cadeia principal de pirrolidina como a estrutura de não nucleotídeo que contém uma cadeia principal de piperidina. Uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo produzida por um método da invenção se destaca em resistência à nuclease em virtude do fato de que a fita sentido e a fita antissentido da mesma são conectadas através de tais ligantes.

[0089] Em uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo na invenção, a cadeia principal de pirrolidina, por exemplo, pode ser uma cadeia principal de derivado de pirrolidina na qual pelo menos um átomo de carbono do anel de pirrolidina de 5 membros é substituído. Se substituído(s), por exemplo, o(s) átomo(s) de carbono além do átomo de carbono na posição 2 (C-2) é(são), de preferência, substituído(s). O(s) átomo(s) de carbono acima pode(m) ser substituído(s) por, por exemplo, um(uns) átomo(s) de nitrogênio, um(uns) átomo(s) de oxigênio ou um(uns) átomo(s) de enxofre. A cadeia principal de pirrolidina pode conter, por exemplo, uma ligação dupla carbono-carbono ou uma ligação dupla carbono-nitrogênio no anel de pirrolidina de 5 membros. Na cadeia principal de pirrolidina acima, por exemplo, um(uns) átomo(s) de hidrogênio ou o(s)

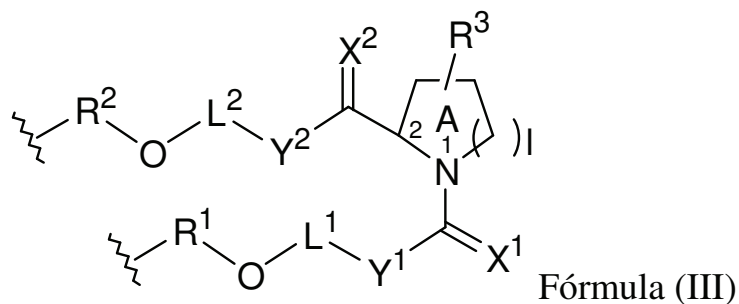
substituinte(s) descrito(s) pode(m) ser ligado(s) ao(s) átomo(s) de carbono e ao átomo de nitrogênio que constituem o anel de pirrolidina de 5 membros. O ligante Lx_1 pode ser ligado a Xs e Xa na fórmula (I) e XXs e XXa_3 na fórmula (A) através, por exemplo, de qualquer um dos grupos na cadeia principal de pirrolidina acima. O ligante Lx_2 pode ser ligado a Ya_3 e Ys na fórmula (II) e YYa e YYs na fórmula (B) através, por exemplo, de qualquer um dos grupos na cadeia principal de pirrolidina acima. Os mesmos podem ser ligados através de qualquer um dentre os átomos de carbono e o átomo de nitrogênio no anel de 5 membros acima e, de preferência, através do átomo de carbono na posição 2 (C-2) e do átomo de nitrogênio no anel de 5 membros acima. Os exemplos das cadeias principais de pirrolidina acima incluem uma cadeia principal de prolina ou uma cadeia principal de prolinol.

[0090] A cadeia principal de piperidina acima pode ser uma cadeia principal de derivado de piperidina na qual pelo menos um carbono do anel de piperidina de 6 membros, por exemplo, é substituído. Se substituído(s), por exemplo, o(s) átomo(s) de carbono além do átomo de carbono C-2 é(são), de preferência, substituído(s). O(s) átomo(s) de carbono acima pode(m) ser substituído(s) por, por exemplo, um(uns) átomo(s) de nitrogênio, um(uns) átomo(s) de oxigênio ou um(uns) átomo(s) de enxofre. A cadeia principal de piperidina pode conter, por exemplo, uma ligação dupla carbono-carbono ou uma ligação dupla carbono-nitrogênio no anel de piperidina de 6 membros. Na cadeia principal de piperidina acima, por exemplo, um(uns) átomo(s) de hidrogênio ou o(s) substituinte(s) descrito(s) pode(m) ser ligado(s) ao(s) átomo(s) de carbono e ao átomo de nitrogênio que constituem o anel de piperidina de 6 membros. O ligante Lx_1 pode ser ligado a Xs e Xa na fórmula (I) ou XXs e XXa_3 na fórmula (A) através, por exemplo, de qualquer um dos grupos na cadeia principal de piperidina acima. O ligante Lx_2 pode ser usado para ligar a Ya_3 e Ys na fórmula (II) e YYa e YYs na fórmula (B) através, por exemplo, de qualquer um dos grupos na cadeia principal de piperidina acima.

Os mesmos podem ser ligados através de qualquer um dentre os átomos de carbono e o átomo de nitrogênio no anel de 6 membros acima e, de preferência, através do átomo de carbono na posição 2 (C-2) e do átomo de nitrogênio no anel de 6 membros acima.

[0091] O ligante acima pode compreender, por exemplo, apenas um(uns) resíduo(s) de não nucleotídeo composto(s) pela estrutura de não nucleotídeo acima.

[0092] A região de ligante acima pode ser representada pela seguinte fórmula (III) ou pode conter um ou dois ou mais resíduos de não nucleotídeo representados pela seguinte fórmula (III):



em que

X^1 e X^2 são, cada um, independentemente H_2 , O, S ou NH;

Y^1 e Y^2 são, cada um, independentemente uma ligação simples, CH_2 , NH, O ou S;

R^3 é um átomo de hidrogênio ou um substituinte ligado a C-3, C-4, C-5 ou C-6 no anel A;

L^1 é uma cadeia de alquilenos que contém n átomos, em que um átomo de hidrogênio em qualquer átomo de carbono de alquilenos é opcionalmente não substituído ou substituído por OH, OR^a , NH_2 , NHR^a , NR^aR^b , SH ou SR^a ou

L^1 é uma cadeia de poliéter em que pelo menos um átomo de carbono da cadeia de alquilenos é substituído por um átomo de oxigênio,

em que, quando Y^1 é NH, O ou S, um átomo de L^1 ligado a Y^1 é carbono e um átomo de L^1 ligado a OR^1 é carbono, enquanto os átomos de

oxigênio não estão próximos um ao outro;

L^2 é uma cadeia de alquileno que contém m átomos, em que um átomo de hidrogênio em qualquer átomo de carbono de alquileno é opcionalmente não substituído ou substituído por OH, OR^c , NH_2 , NHR^c , NR^cR^d , SH ou SR^c ou

L^2 é uma cadeia de poliéter em que pelo menos um átomo de carbono da cadeia de alquileno é substituído por um átomo de oxigênio,

em que, quando Y^2 é NH, O ou S, um átomo de L^2 ligado a Y^2 é carbono e um átomo de L^2 ligado a OR^2 é carbono, enquanto os átomos de oxigênio não estão próximos um ao outro;

R^a , R^b , R^c e R^d são, cada um, independentemente um substituinte ou um grupo de proteção;

l é 1 ou 2;

m é um número inteiro de 0 a 30;

n é um número inteiro de 0 a 30;

o anel A é provido de modo que um átomo de carbono além de C-2 no anel A seja opcionalmente substituído por um átomo de nitrogênio, um átomo de oxigênio ou um átomo de enxofre, e

o anel A contém opcionalmente uma ligação dupla de carbono-carbono ou uma ligação dupla de carbono-nitrogênio; e

em que R^1 e R^2 estão opcionalmente presentes ou ausentes e quando presentes, R^1 e R^2 são, cada um, independentemente um resíduo de não nucleotídeo representado pela fórmula (III), em que nem R^1 e nem R^2 está presente.

[0093] X_s ou X_a na fórmula (I) ou XX_s ou XXa_3 na fórmula (A) pode ser ligado, através de $-OR^1-$ ou $-OR^2-$ na fórmula (III), ao ligante Lx_1 . Em uma modalidade, X_s pode ser ligado, através de $-OR^1-$, e X_a pode ser ligado, através de $-OR^2-$, ao ligante Lx_1 . Em uma outra modalidade, X_s pode ser ligado, através de $-OR^2-$, e X_a pode ser ligado, através de $-OR^1-$, ao ligante

Lx_1 . Em uma outra modalidade, XXs pode ser ligado, através de $-OR^1-$, e XXa_3 pode ser ligado, através de $-OR^2-$, ao ligante Lx_1 . Em uma outra modalidade, XXs pode ser ligado, através de $-OR^2-$, e XXa_3 pode ser ligado, através de $-OR^1-$, ao ligante Lx_1 .

[0094] Ya_3 ou Ys na fórmula (II) ou YYa ou YYs na fórmula (B) pode ser ligado, através de $-OR^1-$ ou $-OR^2-$ na fórmula (III), ao ligante Lx_2 . Em uma modalidade, Ya_3 pode ser ligado, através de $-OR^1-$, e Ys pode ser ligado, através de $-OR^2-$, ao ligante Lx_2 . Em uma outra modalidade, Ya_3 pode ser ligado, através de $-OR^2-$, e Ys pode ser ligado, através de $-OR^1-$, ao ligante Lx_2 . Em uma outra modalidade, YYa pode ser ligado, através de $-OR^1-$, e YYs pode ser ligado, através de $-OR^2-$, ao ligante Lx_2 . Em uma outra modalidade, YYa pode ser ligado, através de $-OR^2-$, e YYs pode ser ligado, através de $-OR^1-$, ao ligante Lx_2 .

[0095] Em uma modalidade preferencial, Xs pode ser ligado, através de $-OR^2-$, e Xa pode ser ligado, através de $-OR^1-$, ao ligante Lx_1 , e, além disso, Ya_3 pode ser ligado, através de $-OR^2-$, e Ys pode ser ligado, através de $-OR^1-$, ao ligante Lx_2 . Em uma outra modalidade preferencial, XXs pode ser ligado, através de $-OR^2-$, e XXa_3 pode ser ligado, através de $-OR^1-$, ao ligante Lx_1 , e, além disso, YYa pode ser ligado, através de $-OR^2-$, e YYs pode ser ligado, através de $-OR^1-$, ao ligante Lx_2 .

[0096] Por exemplo, X^1 e X^2 na fórmula (III) acima são, cada um, independentemente H_2 , O , S ou NH . O fato de que X^1 é H_2 na fórmula (III) acima significa que X^1 e um átomo de carbono ligado a X^1 formam, em conjunto, CH_2 (um grupo metileno). O mesmo se aplica a X^2 .

[0097] Y^1 e Y^2 na fórmula (III) acima são, cada um, independentemente uma ligação simples, CH_2 , NH , O ou S .

[0098] No anel A da fórmula (III) acima, l é 1 ou 2. Quando $l = 1$, o anel A é um anel de 5 membros, por exemplo, a cadeia principal de pirrolidina acima. Os exemplos da cadeia principal de pirrolidina acima

incluem uma cadeia principal de prolina ou uma cadeia principal de prolinol, e a cadeia principal de pirrolidina acima pode ser exemplificada por uma estrutura divalente da mesma. Quando $1 = 2$, o anel A é um anel de 6 membros. Os exemplos incluem a cadeia principal de piperidina acima. O anel A é provido de modo que um átomo de carbono além de C-2 no anel A seja opcionalmente substituído por um átomo de nitrogênio, um átomo de oxigênio ou um átomo de enxofre. Além disso, o anel A contém opcionalmente uma ligação dupla de carbono-carbono ou uma ligação dupla de carbono-nitrogênio no anel A. Por exemplo, o anel A pode ter a forma L ou a forma D.

[0099] Na fórmula (III) acima, R^3 é um átomo de hidrogênio ou um substituinte ligado a C-3, C-4, C-5 ou C-6 no anel A. Quando R^3 é o substituinte acima, o número de substituintes R^3 pode ser 1 ou mais ou zero. Quando há uma pluralidade dos mesmos, os substituintes R^3 podem ser iguais ou diferentes.

[00100] O substituinte R^3 é, por exemplo, um halogênio, OH, OR^4 , NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , SH, SR^4 ou um grupo oxo (=O).

[00101] Por exemplo, R^4 e R^5 são, cada um, independentemente um substituinte ou um grupo de proteção e podem ser iguais ou diferentes. Os exemplos do substituinte incluem um halogênio, alquila, alquenila, alquinila, haloalquila, arila, heteroarila, arilalquila, cicloalquila, cicloalquenila, cicloalquilalquila, ciclilalquila, hidroxialquila, alcoxialquila, aminoalquila, heterociclilalquenila, heterociclilalquila, heteroarilaquila, silila ou sililoxialquila, O mesmo se aplica ao seguinte. O substituinte R^3 pode ser cada substituinte listado acima.

[00102] O grupo de proteção acima é, por exemplo, um grupo funcional que converte um grupo funcional altamente reativo em um inativo. Os exemplos incluem grupos de proteção conhecidos. Por exemplo, a descrição de uma literatura (J.F.W. McOmie, "Protecting Groups in Organic

Chemistry” Plenum Press, Londres e Nova Iorque, 1973) pode ser incorporada para o grupo de proteção acima. Os exemplos do grupo de proteção acima incluem, porém sem limitação, um grupo terc-butildimetilsilila (TBDMS), grupo bis(2-acetoxietiloxi)metila (ACE), grupo triisopropilsililoximetila (TOM), grupo 1-(2-cianoetoxi)etila (CEE), grupo 2-cianoetoximetila (CEM), grupo tolilsulfoniletoximetila (TEM) ou grupo dimetoxitritila (DMTr). Quando R^3 é OR^4 , os exemplos do grupo de proteção acima incluem, mas não estão particularmente limitados a, um grupo TBDMS, grupo ACE, grupo TOM, grupo CEE, grupo CEM ou grupo TEM. Outros exemplos incluem um grupo que contém silila. O mesmo se aplica ao seguinte.

[00103] Na fórmula (III) acima, L^1 é uma cadeia de alquilenos que contém n átomos. Um átomo de hidrogênio em qualquer átomo de carbono do alquilenos pode ser substituído ou não substituído por OH, OR^a , NH_2 , NHR^a , NR^aR^b , SH ou SR^a . Alternativamente, L^1 pode ser uma cadeia de poliéter em que pelo menos um átomo de carbono da cadeia de alquilenos é substituído por um átomo de oxigênio, A cadeia de poliéter acima é, por exemplo, polietilenoglicol. Quando Y^1 é NH, O ou S, um átomo de L^1 ligado a Y^1 é carbono e um átomo de L^1 ligado a OR^1 é carbono, enquanto os átomos de oxigênio não estão próximos um ao outro. Ou seja, quando Y^1 é O, por exemplo, esse átomo de oxigênio não está próximo a um átomo de oxigênio de L^1 e o átomo de oxigênio de OR^1 não está próximo a um átomo de oxigênio de L^1 .

[00104] Na fórmula (III) acima, L^2 é uma cadeia de alquilenos que contém m átomos. Um átomo de hidrogênio em qualquer átomo de carbono do alquilenos pode ser substituído ou não substituído por, por exemplo, OH, OR^c , NH_2 , NHR^c , NR^cR^d , SH ou SR^c . Alternativamente, L^2 pode ser uma cadeia de poliéter em que pelo menos um átomo de carbono da cadeia de alquilenos é substituído por um átomo de oxigênio, Quando Y^2 é NH, O ou S,

um átomo de L^2 ligado a Y^2 é carbono e um átomo de L^2 ligado a OR^2 é carbono, enquanto os átomos de oxigênio não estão próximos um ao outro. Ou seja, quando Y^2 é O, por exemplo, esse átomo de oxigênio não está próximo a um átomo de oxigênio de L^2 e o átomo de oxigênio de OR^2 não está próximo a um átomo de oxigênio de L^2 .

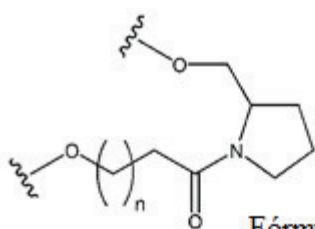
[00105] Aqui, n de L^1 e m de L^2 não são particularmente limitados e o limite inferior de cada um é, por exemplo, 0 e o limite superior também não é particularmente limitado. Então, n e m podem ser definidos, se for adequado, dependendo dos comprimentos desejados dos ligantes Lx_1 e Lx_2 . Do ponto de vista de custo de produção e rendimento, por exemplo, n e m são, cada um, preferencialmente de 0 a 30, mais preferencialmente de 0 a 20, e ainda mais preferencialmente de 0 a 15. Aqui, n e m podem ser iguais ($n = m$) ou diferentes. Por exemplo, $n + m$ é de 0 a 30, de preferência de 0 a 20, e mais preferencialmente de 0 a 15.

[00106] Por exemplo, R^a , R^b , R^c e R^d são, cada um, independentemente um substituinte ou um grupo de proteção. O substituinte e o grupo de proteção são, por exemplo, conforme descrito acima.

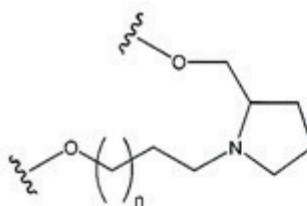
[00107] Na fórmula (III) acima, os átomos de hidrogênio podem ser, por exemplo, cada um independentemente substituído por um halogênio, como Cl, Br, F e I.

[00108] Em uma modalidade preferencial, o ligante acima pode ser representado por qualquer uma das seguintes fórmulas (IV-1) a (IV-9) ou pode compreender um, dois ou mais resíduos de não nucleotídeo representados por qualquer uma das seguintes fórmulas (IV-1) a (IV-9). Na fórmula abaixo, q é um número inteiro de 0 a 10. Nas fórmulas abaixo, n e m são iguais como na fórmula (III) acima. Especificamente, por exemplo, na fórmula (IV-1), $n = 8$; na fórmula (IV-2), $n = 3$; na fórmula (IV-3), $n = 4$ ou 8 ; na fórmula (IV-4), $n = 7$ ou 8 ; na fórmula (IV-5), $n = 3$ e $m = 4$; na fórmula (IV-6), $n = 8$ e $m = 4$; na fórmula (IV-7), $n = 8$ e $m = 4$; na fórmula (IV-8), n

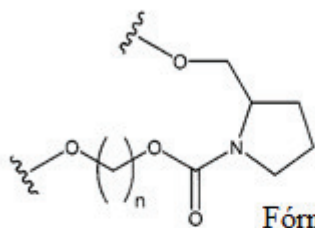
= 5 e $m = 4$; e na fórmula (IV-9), $q = 1$ e $m = 4$.



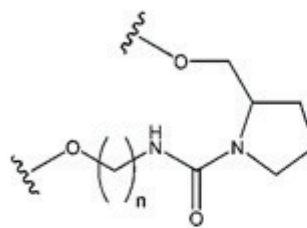
Fórmula (IV-1)



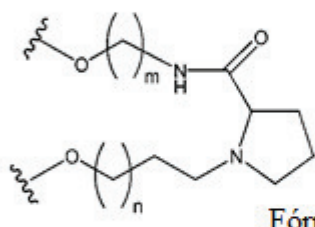
Fórmula (IV-2)



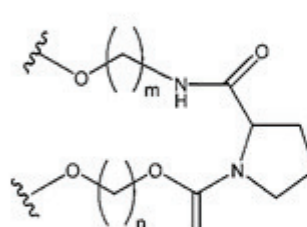
Fórmula (IV-3)



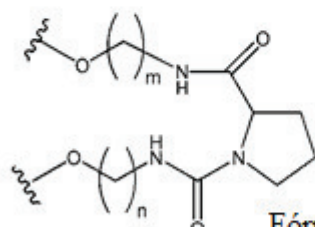
Fórmula (IV-4)



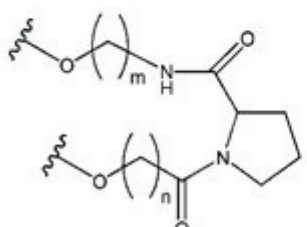
Fórmula (IV-5)



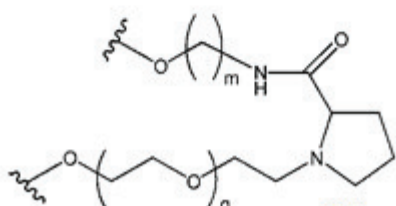
Fórmula (IV-6)



Fórmula (IV-7)

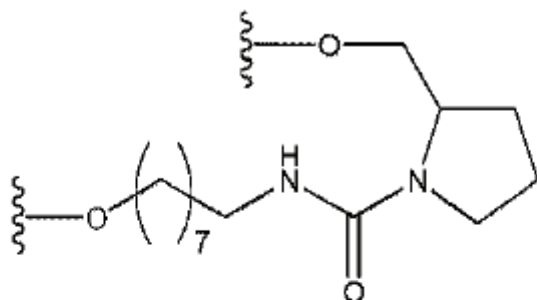


Fórmula (IV-8)

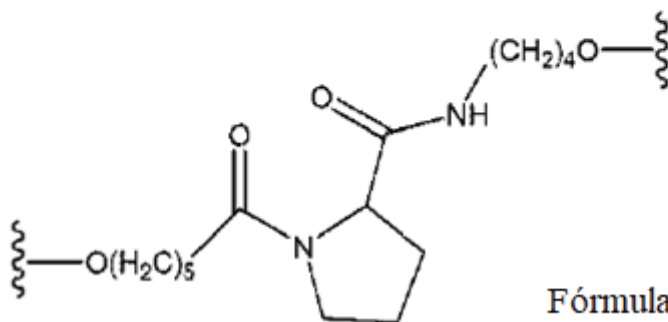


Fórmula (IV-9)

[00109] Em uma modalidade, o ligante acima pode ser representado pela seguinte fórmula (V) ou (VI) ou pode compreender um, dois ou mais resíduos de não nucleotídeo representados pela seguinte fórmula (V) ou (VI).



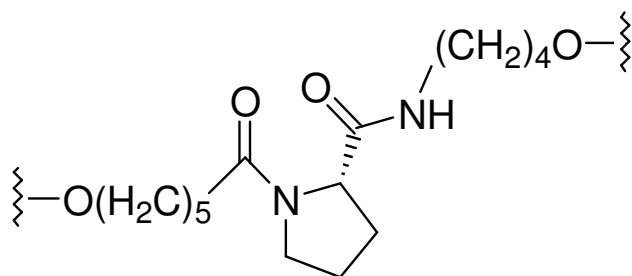
Fórmula (V)



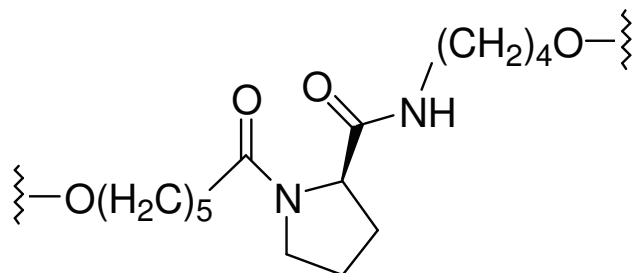
Fórmula (VI)

[00110] Em uma modalidade, a primeira região de RNA (Xs, XXs) pode ser conectada ao ligante Lx_1 no lado de átomo de carbono de posição 2 na fórmula (VI) e a segunda região de RNA (Xa, XXa₃) pode ser conectada ao ligante Lx_1 no lado de átomo de nitrogênio de posição 1 na fórmula (VI); e a terceira região de RNA (Ya₃, YYa) pode ser conectada ao ligante Lx_2 no lado de átomo de carbono de posição 2 e a quarta região de RNA (Ys, YYs) pode ser conectada ao ligante Lx_2 no lado de átomo de nitrogênio de posição 1 na fórmula (VI).

[00111] O ligante representado pela fórmula (VI) pode ser uma substância opticamente ativa representada pela seguinte fórmula (VI-1) ou (VI-2).



Fórmula (VI-1)



Fórmula (VI-2)

[00112] Na primeira e na segunda moléculas de oligoRNA de fita simples, Xa é complementar a uma região lateral 3' de Xs e Ya₃ é complementar a Ys. Devido a isso, na primeira molécula de oligoRNA de fita simples, Xa é dobrado sobre Xs e Xa e Xs são autoanelados para formar uma fita dupla. De modo semelhante, na segunda molécula de oligoRNA de fita simples, Ys é dobrado sobre Ya₃ e Ys e Ya₃ são autoanelados para formar uma fita dupla.

[00113] Na primeira e na segunda moléculas de oligoRNA de fita simples, YYa é complementar a uma região lateral 5' de YYs e XXa₃ é complementar a XXs. Devido a isso, na primeira molécula de oligoRNA de fita simples, XXa₃ é dobrado sobre XXs e XXa₃ e XXs são autoanelados para formar uma fita dupla. De modo semelhante, na segunda molécula de oligoRNA de fita simples, YYa é dobrado sobre YYs e YYa e YYs são autoanelados para formar uma fita dupla.

[00114] Os ligantes acima são, cada um, propensos a formar uma estrutura de volta β. Isso faz com que a primeira molécula de oligoRNA de fita simples na fórmula (I) adote uma estrutura dobrada sobre o lado de volta β devido ao ligante Lx₁. O mencionado acima deve induzir uma estrutura em que quando Xa e Xs são autoanelados, a distância entre a extremidade 3' de Xa e a extremidade 5' (a extremidade 5' de Ya₁) da segunda molécula de oligoRNA de fita simples na fórmula (II) é propensa a se tornar mais curta. O mesmo se aplica à primeira e à segunda moléculas de oligoRNA de fita simples nas fórmulas (A) e (B).

[00115] Em uma outra modalidade, o ligante, com o primeiro ligante ou o segundo ligante (Lx₁ e Lx₂ nas fórmulas acima) pode ser um ligante de

nucleotídeo que contém um ou mais resíduos de nucleotídeo. Quando o ligante é um ligante de nucleotídeo, o comprimento não é particularmente limitado. Entretanto, é preferencial que o comprimento não deva impedir a formação de uma fita dupla entre sequências antes e depois do ligante, por exemplo, entre a primeira região de RNA e a segunda região de RNA ou entre a terceira região de RNA e a quarta região de RNA. Os comprimentos (o número de nucleotídeos) e as sequências de nucleotídeos do primeiro e do segundo ligantes (Lx_1 e Lx_2 nas fórmulas acima), que são ligantes de nucleotídeo, podem ser iguais ou diferentes. O comprimento de cada ligante de nucleotídeo pode ser, por exemplo, de 1 ou mais nucleotídeos, 2 ou mais nucleotídeos, ou 3 ou mais nucleotídeos e, por exemplo, 100 ou menos nucleotídeos, 80 ou menos nucleotídeos, ou 50 ou menos nucleotídeos. O comprimento de tal ligante de nucleotídeo pode ser, por exemplo, de 1 a 50 nucleotídeos, de 1 a 30 nucleotídeos, de 3 a 20 nucleotídeos, de 3 a 10 nucleotídeos, ou de 3 a 7 nucleotídeos e, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 nucleotídeos. O ligante de nucleotídeo é não autocomplementar e é preferencial que o autoanelamento não ocorra dentro da sequência.

[00116] Quando um ligante como o primeiro ligante ou o segundo ligante (Lx_1 e Lx_2 nas fórmulas acima) usado na invenção contém um(uns) resíduo(s) de nucleotídeo não modificado(s) e um(uns) resíduo(s) de nucleotídeo modificado(s) (por exemplo, um(uns) resíduo(s) de ribonucleotídeo modificado(s)), o número de resíduos de nucleotídeo modificados não é particularmente limitado e pode ser, por exemplo, de 1 a 5, de 1 a 4 ou de 1 a 3, e pode ser, por exemplo, 1 ou 2.

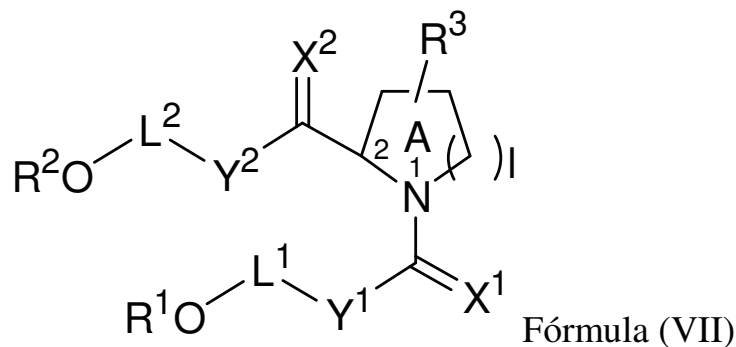
[00117] Os exemplos de um ligante de nucleotídeo usado na invenção incluem um ligante que consiste na sequência de RNA: 5'-C-A-C-A-C-C-3', 5'-C-C-A-C-A-C-C-3' ou 5'-U-U-C-G-3'. Em uma modalidade, o primeiro ligante e o segundo ligante (Lx_1 e Lx_2 nas fórmulas acima) são, cada um, independentemente selecionados a partir de 5'-C-A-C-A-C-C-3', 5'-C-C-A-

C-A-C-C-3' e 5'-U-U-C-G-3'. Em uma modalidade, o primeiro ligante consiste na sequência de RNA 5'-C-A-C-A-C-C-3' e o segundo ligante consiste na sequência de RNA 5'-U-U-C-G-3'.

[00118] A primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples podem ser produzidas com o uso de um processo de síntese de RNA conhecido pelos versados na técnica. Os exemplos do processo de síntese de RNA conhecido pelos versados na técnica incluem um método de fosforamidita ou um processo de H-fosfonato. No método de fosforamidita, um ribonucleosídeo ligado a um grupo hidrofóbico de um carreador é estendido por uma reação de condensação com uma amidita de RNA (ribonucleosídeo fosforamidita) e se submete à oxidação e desproteção, e essa reação de condensação com uma amidita de RNA é repetida para ser capaz de realizar a síntese de RNA. Agora, a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples nas fórmulas (I) e (II) serão descritas como um exemplo. A primeira ou a segunda molécula de oligoRNA de fita simples na invenção pode ser produzida sintetizando uma sequência (X_a, Y_s) do lado de extremidade 3' a um resíduo antes de um ligante com o uso de um processo de síntese de RNA, como um método de fosforamidita; formando o ligante por meio da ligação a um resíduo de não nucleotídeo, como um derivado de amina cíclica que tem uma cadeia principal de pirrolidina ou uma cadeia principal de piperidina; e, então, sintetizando adicionalmente uma sequência (X_s ou Y_{a3}, Y_{a2} e Y_{a1}) da extremidade do ligante à extremidade 5', nessa ordem. Alternativamente, a primeira ou a segunda molécula de oligoRNA de fita simples na invenção pode ser produzida sintetizando uma sequência (X_a, Y_s) do lado de extremidade 3' a um resíduo antes de um ligante de nucleotídeo com o uso de um processo de síntese de RNA, como um método de fosforamidita; subsequentemente sintetizando uma sequência do ligante de nucleotídeo; e sintetizando adicionalmente uma sequência (X_s ou Y_{a3}, Y_{a2} e Y_{a1}) da extremidade do ligante de nucleotídeo à extremidade 5' nessa ordem.

Quando um ligante de não nucleotídeo e um ligante de nucleotídeo são usados em combinação ou quando a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples nas fórmulas (A) e (B) são usadas, substancialmente o mesmo procedimento descrito acima é aplicável à produção. Na invenção, qualquer amidita de RNA pode ser usada. Por exemplo, é possível usar qualquer amidita de RNA de uso geral que tem, em um grupo hidroxila na posição 2, uma variedade de grupos de proteção, como um grupo t-butildimetilsilila (TBDMS), grupo triisopropilsililoximetila (TOM), bis(2-grupo acetoxietoxi)metila (ACE), grupo 1-(2-cianoetoxi)etila (CEE), grupo 2-cianoetoximetila (CEM), grupo tolilsulfonilettoximetila (TEM) ou grupo dimetoxitritila (DMTr). Além disso, na invenção, qualquer carreador de fase sólida pode ser usado durante a síntese de RNA, incluindo um carreador à base de poliestireno, um carreador à base de acrilamida ou um carreador de vidro. O carreador pode ter qualquer forma, como uma microesfera, placa, chip ou tubo. Os exemplos do carreador incluem, porém sem limitação, microesferas de poliestireno, como NittoPhase^(R) HL rG(ibu) ou rU (KINOVATE).

[00119] Entre os ligantes acima, um derivado de amina cíclica para a formação de um ligante não nucleotídeo é um monômero para a síntese de RNA e tem, por exemplo, uma estrutura representada pela fórmula (VII) abaixo. Esse derivado de amina cíclica corresponde basicamente à estrutura de cada ligante descrito acima, e a descrição sobre a estrutura de ligante é assim aplicada a esse derivado de amina cíclica. Esse derivado de amina cíclica de formação de ligante pode ser usado como, por exemplo, uma amidita para síntese de ácido nucleico automatizada e é, por exemplo, aplicável a um sintetizador de ácido nucleico automatizado comum.



em que

X^1 e X^2 são, cada um, independentemente H_2 , O, S ou NH;

Y^1 e Y^2 são, cada um, independentemente uma ligação simples, CH_2 , NH, O ou S;

R^1 e R^2 são, cada um, independentemente H, um grupo de proteção ou um grupo de proteção de fosfato;

R^3 é um átomo de hidrogênio ou um substituinte ligado a C-3, C-4, C-5 ou C-6 no anel A;

L^1 é uma cadeia de alquilenos que contém n átomos em que um átomo de hidrogênio em qualquer átomo de carbono de alquilenos é opcionalmente substituído ou não substituído por OH, OR^a , NH_2 , NHR^a , NR^aR^b , SH ou SR^a ou

L^1 é uma cadeia de poliéter em que pelo menos um átomo de carbono da cadeia de alquilenos é substituído por um átomo de oxigênio,

em que, quando Y^1 é NH, O ou S, um átomo de L^1 ligado a Y^1 é carbono e um átomo de L^1 ligado a OR^1 é carbono, enquanto os átomos de oxigênio não estão próximos um ao outro;

L^2 é uma cadeia de alquilenos que contém m átomos, em que um átomo de hidrogênio em qualquer átomo de carbono de alquilenos é opcionalmente substituído ou não substituído por OH, OR^c , NH_2 , NHR^c , NR^cR^d , SH ou SR^c ou

L^2 é uma cadeia de poliéter em que pelo menos um átomo de carbono da cadeia de alquilenos é substituído por um átomo de oxigênio,

em que, quando Y^2 é NH, O ou S, um átomo de L^2 ligado a Y^2

é carbono e um átomo de L^2 ligado a OR^2 é carbono, enquanto os átomos de oxigênio não estão próximos um ao outro;

R^a , R^b , R^c e R^d são, cada um, independentemente um substituinte ou um grupo de proteção;

l é 1 ou 2;

m é um número inteiro de 0 a 30;

n é um número inteiro de 0 a 30;

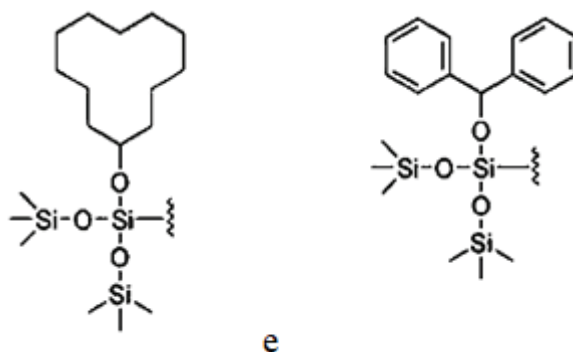
o anel A é provido de modo que um átomo de carbono além de C-2 no anel A seja opcionalmente substituído por um átomo de nitrogênio, um átomo de oxigênio ou um átomo de enxofre, e

o anel A contém opcionalmente uma ligação dupla de carbono-carbono ou uma ligação dupla de carbono-nitrogênio.

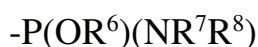
[00120] Na fórmula (VII) acima, a descrição da fórmula (III) acima pode ser citada para os mesos sítios como na fórmula (III) acima. Especificamente, toda a descrição da fórmula (III) acima é citada para, por exemplo, X^1 , X^2 , Y^1 , Y^2 , R^3 , L^1 , L^2 , l , m , n e o anel A na fórmula (VII) acima.

[00121] Conforme descrito acima, R^1 e R^2 na fórmula (VII) acima são, cada um, independentemente H, um grupo de proteção ou um grupo de proteção de fosfato.

[00122] O grupo de proteção acima é, por exemplo, similar àqueles descritos para a fórmula (III) acima. Especificamente, o grupo de proteção pode ser selecionado a partir, por exemplo, do grupo I. Os exemplos do grupo I incluem um grupo dimetoxitritila (DMTr), um grupo TBDMS, um grupo ACE, um grupo TOM, um grupo CEE, um grupo CEM, um grupo TEM e um grupo que contém silila representado por cada uma das seguintes fórmulas; e particularmente de preferência, um grupo DMTr ou o grupo que contém silila:



[00123] O grupo de proteção de fosfato acima pode ser representado, por exemplo, pela seguinte fórmula.



[00124] Na fórmula acima, R^6 é um átomo de hidrogênio ou qualquer substituinte. Por exemplo, R^6 é, de preferência, um grupo hidrocarboneto. O grupo hidrocarboneto pode ser substituído ou não substituído por um grupo removedor de elétrons. Os exemplos de R^6 incluem um halogênio, haloalquila, heteroarila, hidroxialquila, alcoxialquila, aminoalquila, silila, sililoxialquila, heterociclilalquenila, heterociclilalquila, heteroarilalquila e alquila, alquenila, alquinila, arila, arilalquila, cicloalquila, cicloalquenila, cicloalquilalquila, ciclilalquila e outros hidrocarbonetos. Adicionalmente, R^6 pode ser substituído ou não substituído por um grupo removedor de elétrons. Os exemplos específicos de R^6 incluem um grupo β -cianoetila, um grupo nitrofeniletila ou um grupo metila.

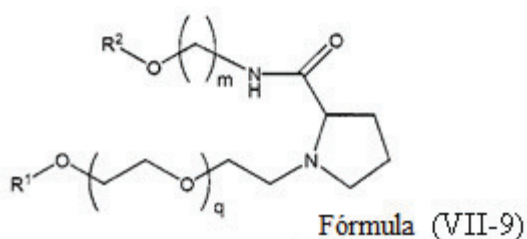
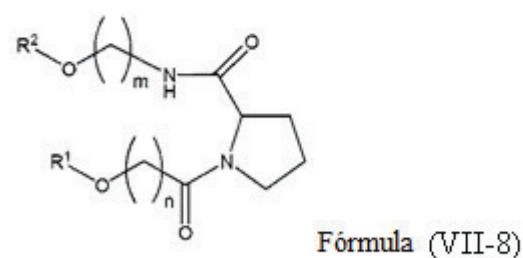
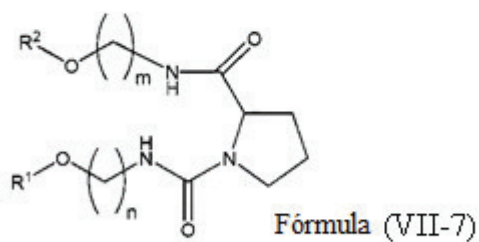
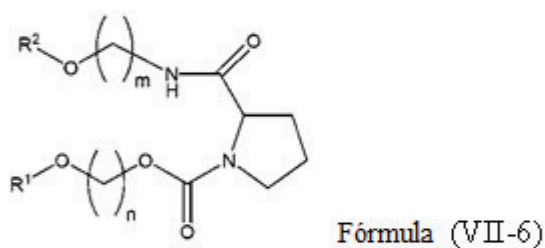
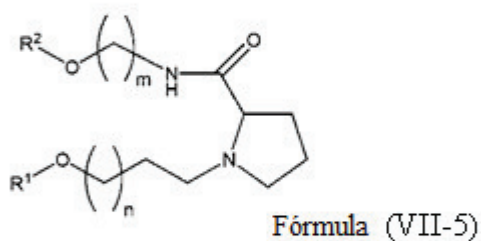
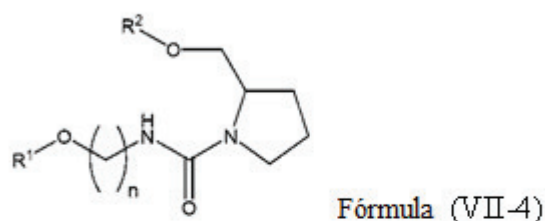
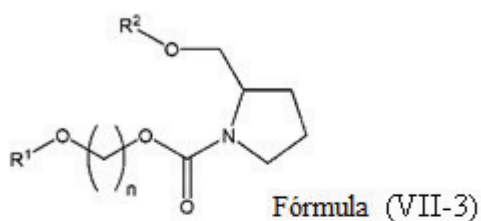
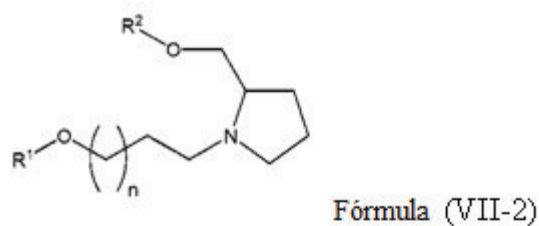
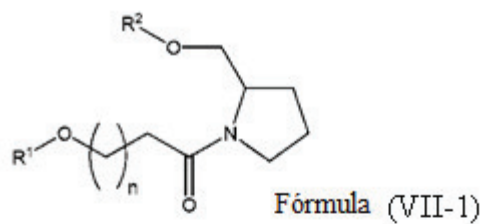
[00125] R^7 e R^8 são, cada um, um átomo de hidrogênio ou qualquer substituinte e podem ser iguais ou diferentes. Por exemplo, R^7 ou R^8 é, de preferência, um grupo hidrocarboneto. O grupo hidrocarboneto pode ser substituído ou não substituído adicionalmente por qualquer substituinte. Por exemplo, o grupo hidrocarboneto acima é conforme listado para o R^6 acima descrito e é, de preferência, um grupo metila, um grupo etila ou um grupo isopropila. Nesse caso, os exemplos específicos de $-NR^7R^8$ incluem um grupo di-isopropilamino, um grupo dietilamino ou um grupo etilmetilamino. Alternativamente, os substituintes R^7 e R^8 podem estar juntos ligados a um

nitrogênio (isto é, $-NR^7R^8$ está unido) para formar um anel que contém nitrogênio (por exemplo, um grupo piperidila, um grupo morfolino).

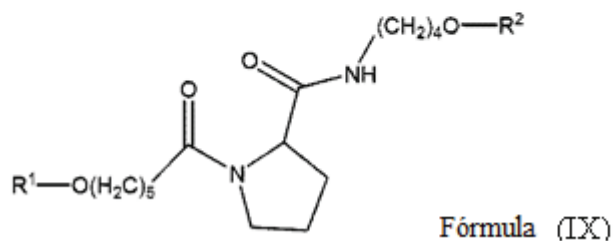
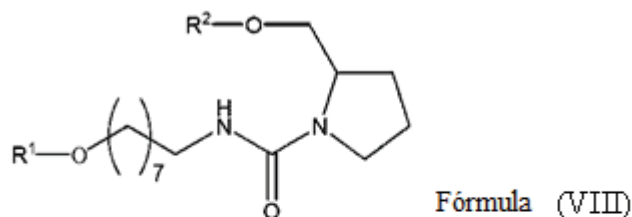
[00126] Especificamente, os grupos de proteção de fosfato acima podem ser selecionados a partir, por exemplo, do seguinte grupo II. Os exemplos do grupo II incluem $-P(OCH_2CH_2CN)(N(i-Pr)_2)$ ou $-P(OCH_3)(N(i-Pr)_2)$. Nas fórmulas acima, $i-Pr$ representa isopropila.

[00127] Por exemplo, na fórmula (VII) acima, um dentre R^1 ou R^2 é H ou um grupo de proteção e o outro é H ou um grupo de proteção de fosfato. De preferência, quando R^1 é o grupo de proteção acima, por exemplo, R^2 é, de preferência, H ou o grupo de proteção de fosfato acima. Especificamente, é preferencial que, quando R^1 é selecionado do grupo I acima, R^2 seja H ou selecionado do grupo II acima. Além disso, de preferência, quando R^1 é o grupo de proteção de fosfato acima, por exemplo, R^2 é, de preferência, H ou o grupo de proteção acima. Especificamente, é preferencial que, quando R^1 é selecionado do grupo II acima, R^2 seja H ou selecionado do grupo I acima.

[00128] O derivado de amina cíclica acima pode ser representado por qualquer uma das seguintes fórmulas (VII-1) a (VII-9). Nas fórmulas abaixo, n e m são iguais como na fórmula (VII) acima. Na fórmula abaixo, q é um número inteiro de 0 a 10. Especificamente, por exemplo, na fórmula (VII-1), $n = 8$; na fórmula (VII-2), $n = 3$; na fórmula (VII-3), $n = 4$ ou 8 ; na fórmula (VII-4), $n = 7$ ou 8 ; na fórmula (VII-5), $n = 3$ e $m = 4$; na fórmula (VII-6), $n = 8$ e $m = 4$; na fórmula (VII-7), $n = 8$ e $m = 4$; na fórmula (VII-8), $n = 5$ e $m = 4$; e na fórmula (VII-9), $q = 1$ e $m = 4$.



[00129] Em uma modalidade, o derivado de amina cíclica acima pode ser representado por um derivado de prolinol representado pela seguinte fórmula (VIII) ou um derivado de prolina representado pela seguinte fórmula (IX).



[00130] O derivado de amina cíclica acima pode compreender, por exemplo, uma substância identificada, como um isótopo estável.

[00131] O derivado de amina cíclica acima pode ser sintetizado, por exemplo, de acordo com um processo para a produção de um monômero para a síntese de molécula de ácido nucleico conforme descrito na Publicação Internacional WO 2013/027843 ou WO 2016/159374.

[00132] Em um método da invenção, a primeira molécula de oligoRNA de fita simples acima (por exemplo, fita 1 na Figura 1) e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples (por exemplo, fita 2 na Figura 1) podem ser aneladas e ligadas para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo capaz de inibir a expressão de um gene alvo na invenção.

[00133] Na molécula de RNA de fita simples em forma de grampo produzida pelo método da invenção, Xa-Ya₁-Ya₂-Ya₃, que é gerado pela etapa de ligação, contém uma sequência de inibição de expressão de gene para o gene alvo. Uma sequência de inibição de expressão de gene pode estar compreendida em Xa-Ya₁, Xa-Ya₁-Ya₂, ou Xa-Ya₁-Ya₂-Ya₃. De modo semelhante, XXa₃-XXa₂-XXa₁-YYa, que é gerado pela etapa de ligação, contém uma sequência de inibição de expressão de gene para o gene alvo. Uma sequência de inibição de expressão de gene pode estar compreendida em YYa, XXa₁-YYa, XXa₂-XXa₁-YYa ou XXa₃-XXa₂-XXa₁-YYa. A sequência

de inibição de expressão de gene é, de preferência, o todo ou parte de uma sequência sentido ou antissentido de mRNA transcrito a partir do gene alvo. Xa-Ya₁, que é gerado pela etapa de ligação, é complementar a Xs e Xs pode conter, assim, uma sequência de inibição de expressão de gene para o gene alvo. De modo semelhante, XXa₁-YYa é complementar a YYS e YYS pode, assim, conter uma sequência de inibição de expressão de gene para o gene alvo.

[00134] A molécula de RNA de fita simples em forma de grampo acima pode conter uma, duas ou mais sequências de inibição de expressão de gene. A molécula de RNA de fita simples em forma de grampo acima pode ter, por exemplo, as duas ou mais sequências de inibição de expressão de gene iguais para o mesmo gene alvo, pode ter duas ou mais sequências de inibição de expressão de gene diferentes para o mesmo gene alvo, ou pode ter duas ou mais sequências de inibição de expressão de gene diferentes para genes alvos diferentes. A molécula de RNA de fita simples em forma de grampo que tem duas ou mais sequências de inibição de expressão de gene para genes alvos diferentes é útil para inibir a expressão de dois ou mais genes alvos diferentes. Como usado aqui, o “gene” se refere a uma região de genoma a partir da qual o mRNA é transcrito, e pode ser uma região de codificação de proteína ou uma sequência de codificação de RNA.

[00135] A molécula de RNA de fita simples em forma de grampo na invenção tem uma capacidade de inibir a expressão de um gene alvo através de uma sequência de inibição de expressão de gene. A inibição de expressão de gene alvo com o uso de uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo na invenção é, de preferência, mediada, porém sem limitação, por interferência de RNA. A interferência de RNA é um fenômeno que, de modo geral, um RNA de fita dupla (dsRNA) é clivado em uma célula, por Dicer, em um RNA de fita dupla curto de cerca de 19 a 21 bp (siRNA: RNA interferente pequeno), cuja extremidade 3' se projeta; um do RNA de fita simples se liga a

um mRNA alvo; e o mRNA alvo é degradado, de modo que a tradução do mRNA alvo seja reprimida, que possibilita inibir a expressão de um gene alvo derivado do mRNA alvo. Por exemplo, diversos tipos de uma sequência de RNA de fita simples compreendida em siRNA ligado a um mRNA alvo foram relatados de acordo com os tipos de gene alvo. Na invenção, por exemplo, uma sequência de RNA de fita simples (de preferência, uma sequência antissentido) compreendida em siRNA pode ser usada como uma sequência de inibição de expressão de gene. Uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo produzida por um método da invenção pode inibir a expressão de um gene alvo enquanto clivada *in vivo* para gerar siRNA. Uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo na invenção pode ser usada para o tratamento ou profilaxia de doença ou distúrbio que envolve a expressão ou um aumento em expressão de um gene alvo.

[00136] A sequência de inibição de expressão de gene tem, de preferência, de 19 a 30, mais preferencialmente, de 19 a 27, e, por exemplo, 19, 20, 21, 22 ou 23 nucleotídeos de comprimento. A sequência de inibição de expressão de gene consiste, de preferência, em uma sequência de RNA completamente idêntica ou completamente complementar a pelo menos parte da sequência de mRNA do gene alvo. A sequência de inibição de expressão de gene pode ser projetada para a sequência de nucleotídeos de um gene alvo por meio de um procedimento convencional.

[00137] O gene alvo pode ser qualquer gene e pode ser, por exemplo, qualquer gene relacionado à doença. É preferencial que o gene alvo seja derivado a partir da mesma espécie biológica que um sujeito submetido à inibição de expressão de gene *in vivo* ou em uma célula, tecido, órgão ou similares pela molécula de RNA de fita simples em forma de grampo. Os exemplos podem incluir aqueles derivados de animais (por exemplo, mamíferos (por exemplo, seres humanos, chimpanzés, gorilas e outros primatas, cavalos, vacas, porcos, ovelhas, cabras, camelos, macacos e outros

animais domésticos, cães, gatos, coelhos e outros animais de estimação, camundongos, ratos, porquinhos-da-índia e outros roedores), peixes e insetos), plantas, fungos, etc. Os exemplos do gene alvo incluem, mas não são particularmente limitados a, gene TGF- β 1, gene GAPDH, gene LAMA1 ou gene LMNA. A sequência de mRNA de gene de TGF- β 1 humano (fator de crescimento de transformação- β 1) é acessível com base, por exemplo, no nº de acesso GenBank (NCBI) NM_000660 (ID de gene NCBI: 7040). A sequência de mRNA de gene de GAPDH humano (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) é acessível com base, por exemplo, no nº de acesso GenBank (NCBI) NM_002046 (ID de gene NCBI: 2597). A sequência de mRNA de gene de LAMA1 humano é acessível com base, por exemplo, no nº de acesso GenBank NM_005559 (ID de gene NCBI: 284217). A sequência de mRNA de gene de LMNA humano é acessível com base, por exemplo, no nº de acesso GenBank NM_170707 (ID de gene NCBI: 4000). Quando o gene alvo é gene de TGF- β 1, uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo produzida por um método da invenção inibe a expressão de gene de TGF- β 1 *in vivo*. Tal molécula de RNA de fita simples em forma de grampo pode ser usada, através da inibição da expressão de gene de TGF- β 1, para tratar ou prevenir doença ou distúrbio que envolve a expressão ou um aumento em expressão de gene de TGF- β 1, como fibrose pulmonar e/ou doença pulmonar aguda. De modo semelhante, cada molécula de RNA de fita simples em forma de grampo capaz de inibir a expressão de outros genes alvos como gene GAPDH, gene LAMA1, e gene LMNA na invenção pode ser usada, através de cada inibição de expressão de gene alvo, para tratar ou prevenir doença ou distúrbio que envolve a expressão ou um aumento em expressão do gene alvo.

[00138] Um caso da molécula de RNA de fita simples em forma de grampo que é produzida por um método da invenção e é capaz de inibir a expressão de um gene alvo é uma molécula de RNA que consiste na

sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 1, em que os nucleotídeos (resíduos de ribonucleotídeo) nas posições 24 e 25 são conectados através de um ligante (Lx_1) e nucleotídeos (resíduos de ribonucleotídeo) nas posições 50 e 51 são conectados através de um ligante (Lx_2) (por exemplo, Figure 2). Tal molécula de RNA de fita simples em forma de grampo que compreende a sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 1 compreende, a partir da direção de extremidade 5' à extremidade 3', uma sequência de RNA que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 2, o primeiro ligante (um ligante de não nucleotídeo, um ligante de nucleotídeo ou uma combinação dos mesmos: Lx_1 na Figura 1), uma sequência de RNA que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 3, o ligante acima (um ligante de não nucleotídeo, um ligante de nucleotídeo ou uma combinação dos mesmos; Lx_2 na Figura 1) e um nucleotídeo G (guanina). A molécula de RNA de fita simples em forma de grampo acima que compreende sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 1 compreende uma sequência de inibição de expressão de gene para um gene alvo, ou seja, gene de TGF- β 1. A sequência da posição 29 à posição 47 da sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 1 corresponde a uma sequência de inibição de expressão de gene (sequência ativa; SEQ ID NO: 50). A invenção provê um método para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo que compreende essa sequência de inibição de expressão de gene.

[00139] A Tabela 1 descrita abaixo lista casos da primeira molécula de oligoRNA de fita simples (fita 1) e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples (fita 2) para a fabricação de tal molécula de RNA. Nas sequências da primeira molécula de oligoRNA de fita simples (fita 1) e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples (fita 2) listadas na Tabela 1, um ligante que contém P (derivado de prolina) pode ser substituído por qualquer ligante como um outro ligante de não nucleotídeo ou ligante de nucleotídeo acima.

Em uma modalidade, a primeira molécula de oligoRNA de fita simples tem, de preferência, uma uracila (U) ou adenina (A) na extremidade 3', e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples tem, de preferência, uma uracila (U) ou adenina (A) na extremidade 5'.

[00140] Os exemplos de um par da primeira molécula de oligoRNA de fita simples e segunda molécula de oligoRNA de fita simples particularmente preferenciais para a produção de uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo que compreende a sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 1 incluem as seguintes:

(1) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 7, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante (Lx_1) e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 6 em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 10 e 11 são conectados através do segundo ligante (Lx_2);

(2) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 19 em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante (Lx_1) e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 18, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 16 e 17 são conectados através do segundo ligante (Lx_2);

(3) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 27 em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante (Lx_1) e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 26 em que os resíduos de ribonucleotídeo nas

posições 20 e 21 são conectados através do segundo ligante (Lx_2);

(4) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 29 em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante (Lx_1) e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 28 em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 21 e 22 são conectados através do segundo ligante (Lx_2);

(5) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 31 em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante (Lx_1) e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 30 em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 22 e 23 são conectados através do segundo ligante (Lx_2); e

(6) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 33 em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante (Lx_1) e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 32, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 23 e 24 são conectados através do segundo ligante (Lx_2).

[00141] Essas primeiras moléculas de oligoRNA de fita simples compreendem, cada uma, U ou A na extremidade 3' (extremidade 3' de Xa). Essas segundas moléculas de oligoRNA de fita simples compreendem, cada uma, U ou A na extremidade 5' (extremidade 5' de Ya_1).

[00142] Aqui, por exemplo, em relação à (1) primeira molécula de oligoRNA de fita simples, a expressão “resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante (Lx_1)” significa

que o resíduo de ribonucleotídeo na posição 24 (nucleotídeo: C) e o resíduo de ribonucleotídeo na posição 25 (nucleotídeo: G) da sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 19 são conectados através do primeiro ligante Lx_1 na primeira molécula de oligoRNA de fita simples. A expressão “resíduos de ribonucleotídeo nas posições X e Y são conectados através de z” em relação à molécula de oligoRNA de fita simples e à molécula de RNA de fita simples em forma de grampo na invenção deve ser interpretada desta maneira.

[00143] Os ligantes Lx_1 e Lx_2 na primeira e na segunda moléculas de oligoRNA de fita simples em (1) a (6) são, de preferência, representados pela fórmula (VI) incluindo fórmula (VI-1) ou fórmula (VI-2).

[00144] Em uma modalidade preferencial, a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples em (1) a (6) têm, como Lx_1 e Lx_2 , ligantes representados pela fórmula (VI). Xa de fórmula (I) pode ser conectado ao ligante Lx_1 no lado de átomo de nitrogênio de posição 1 na fórmula (VI) e Xs pode ser conectado ao ligante Lx_1 no lado de átomo de carbono de posição 2. Ys de fórmula (VI) pode ser conectado ao ligante Lx_2 no lado de átomo de nitrogênio de posição 1 na fórmula (VI) e Ya_3 pode ser conectado ao ligante Lx_2 no lado de átomo de carbono de posição 2.

[00145] A invenção provê moléculas de oligoRNA de fita simples que podem ser usadas, como a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples, para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo de acordo com um método da invenção.

[00146] Em uma modalidade, os exemplos de uma molécula de oligoRNA de fita simples usada para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo capaz de inibir a expressão de um gene alvo, ou seja, gene de TGF- β 1, incluem, porém sem limitação, os seguintes (a) a (l):

(a) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 7, em que os resíduos

de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um ligante;

(b) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 6, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 10 e 11 são conectados através de um ligante;

(c) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 19, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um ligante;

(d) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 18, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 16 e 17 são conectados através de um ligante;

(e) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 27, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um ligante;

(f) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 26, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 20 e 21 são conectados através de um ligante;

(g) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 29, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um ligante;

(h) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 28, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 21 e 22 são conectados através de um ligante;

(i) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na

sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 31, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um ligante;

(j) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 30, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 22 e 23 são conectados através de um ligante;

(k) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 33, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um ligante; e

(l) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 32, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 23 e 24 são conectados através de um ligante.

[00147] Em uma modalidade preferencial, as moléculas de oligoRNA de fita simples: (a) e (b); (c) e (d); (e) e (f); (g) e (h); (i) e (j); ou (k) e (l) são usadas em combinação para um método para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo de acordo com a invenção.

[00148] Em outras modalidades, os exemplos de uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo para um gene alvo como gene GAPDH, gene LAMA1 ou gene LMNA, conforme produzido por um método da invenção, são representados na Figura 17. Um caso de uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo para gene GAPDH é uma molécula de RNA que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 51, em que os nucleotídeos (resíduos de ribonucleotídeo) nas posições 22 e 23 são conectados através do primeiro ligante (Lx_1) e os nucleotídeos (resíduos de ribonucleotídeo) nas posições 48 e 49 são conectados através do segundo ligante (Lx_2). Um caso de uma molécula de RNA de fita simples em

forma de grampo para gene LAMA1 é uma molécula de RNA que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 52, em que os nucleotídeos (resíduos de ribonucleotídeo) nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante (Lx_1) e os nucleotídeos (resíduos de ribonucleotídeo) nas posições 50 e 51 são conectados através do segundo ligante (Lx_2). Um outro caso de uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo para gene LAMA1 é uma molécula de RNA que consiste em uma sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 53, em que os nucleotídeos (resíduos de ribonucleotídeo) nas posições 24 e 31 são conectados através do primeiro ligante de nucleotídeo (Lx_1) e os nucleotídeos (resíduos de ribonucleotídeo) nas posições 56 e 61 são conectados através do segundo ligante de nucleotídeo (Lx_2). Um caso de uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo para gene LMNA é uma molécula de RNA que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 54, em que os nucleotídeos (resíduos de ribonucleotídeo) nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante (Lx_1) e os nucleotídeos (resíduos de ribonucleotídeo) nas posições 50 e 51 são conectados através do segundo ligante (Lx_2). A Figura 17 ilustra exemplos de uma sequência de inibição de expressão de gene para um gene alvo, ou seja, gene GAPDH, gene LAMA1 ou gene LMNA (uma sequência antissentido; SEQ ID NO: 55, 56 ou 57, respectivamente). A invenção provê um método para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo que compreende qualquer uma dessas sequências de inibição de expressão de gene.

[00149] Os exemplos de uma molécula de oligoRNA de fita simples usada para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo capaz de inibir a expressão de um gene alvo, ou seja, gene GAPDH incluem, porém sem limitação, os seguintes (m) ou (n):

(m) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 37, em que os

resíduos de ribonucleotídeo nas posições 22 e 23 são conectados através de um ligante; e

(n) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 36, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 20 e 21 são conectados através de um ligante.

[00150] Em uma modalidade preferencial, as moléculas de oligoRNA de fita simples de (m) e (n) podem ser usadas em combinação para um método para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo de acordo com a invenção.

[00151] Os exemplos de uma molécula de oligoRNA de fita simples usada para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo capaz de inibir a expressão de um gene alvo, ou seja, gene LAMA1 incluem, porém sem limitação, os seguintes (o) a (v):

(o) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 39, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um ligante;

(p) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 38, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 16 e 17 são conectados através de um ligante;

(q) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 41, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um ligante;

(r) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 40, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 22 e 23 são conectados através de

um ligante;

(s) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 43, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 31 são conectados através de um ligante de nucleotídeo;

(t) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 42, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 21 e 26 são conectados através de um ligante de nucleotídeo;

(u) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 45, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 31 são conectados através de um ligante de nucleotídeo; e

(v) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 44, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 22 e 27 são conectados através de um ligante de nucleotídeo.

[00152] Em uma modalidade preferencial, as moléculas de oligoRNA de fita simples: (o) e (p); (q) e (r); (s) e (t); ou (u) e (v) podem ser usadas em combinação para um método para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo de acordo com a invenção.

[00153] Os exemplos de uma molécula de oligoRNA de fita simples usada para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo capaz de inibir a expressão de um gene alvo, ou seja, gene LMNA incluem, porém sem limitação, os seguintes (w) a (z):

(w) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 47, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um ligante;

(x) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 46, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 21 e 22 são conectados através de um ligante;

(y) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 49, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um ligante; e

(z) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 48, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 23 e 24 são conectados através de um ligante.

[00154] Em uma modalidade preferencial, as moléculas de oligoRNA de fita simples de (w) e (x) ou (y) e (z) podem ser usadas em combinação para o método para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo de acordo com a invenção.

[00155] Cada “ligante” nas moléculas de oligoRNA de fita simples (a) a (z) corresponde ao primeiro ligante ou ao segundo ligante. Entretanto, os ligantes descritos acima podem ser usados para o mesmo. Cada ligante de nucleotídeo nas moléculas de oligoRNA de fita simples (s) a (v) pode ser substituído por cada ligante (por exemplo, um outro ligante de nucleotídeo) conforme descrito acima.

[00156] Na invenção, a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples acima podem ser ligadas por meio de ligação para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo. A primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples acima são aneladas antes da ligação. A reação de anelamento pode ser elicitada pela mistura da primeira e da segunda moléculas de oligoRNA de fita simples em um meio aquoso. Em um método da invenção, durante a etapa de anelamento, a primeira e a

segunda moléculas de oligoRNA de fita simples podem ser misturadas em um meio aquoso (normalmente em água ou tampão) e deixadas em repouso durante um certo período (por exemplo, durante 1 a 15 min) ou usadas diretamente para uma reação de ligação. Durante a etapa de anelamento, a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples podem ser desnaturadas por calor (por exemplo, aquecidas a uma temperatura de 90°C ou mais alta) ou talvez não. Quando desnaturada por calor, uma solução de reação que contém a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples pode ser aquecida a, por exemplo, uma temperatura de desnaturação por calor (por exemplo, 90°C ou maior) e, então, reagida e anelada durante um certo período a uma temperatura de anelamento (tipicamente, uma temperatura em uma faixa de valor $T_m \pm 5^\circ\text{C}$ com base na sequência Y_{a_1} da molécula de oligoRNA de fita simples; por exemplo, de 55 a 60°C). Depois disso, a temperatura pode ser diminuída (para, por exemplo, 4°C). No caso de anelamento sem desnaturação por calor, a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples podem ser misturadas à temperatura ambiente (de 15 a 35°C) e deixadas em repouso durante um certo período (por exemplo, de 1 min a 1 hora ou de 5 a 15 min). Dessa forma, a etapa de anelamento pode ser realizada.

[00157] Em uma modalidade, durante a etapa de anelamento na invenção, a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples são misturadas em quantidades molares iguais em uma solução de reação. Como usado aqui, “misturadas em quantidades molares iguais” significa que a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples são misturadas a uma razão molar de 1: 1,1 a 1,1 : 1.

[00158] Após a etapa de anelamento, uma solução de reação de anelamento que contém um oligoRNA de fita dupla obtido por meio de anelamento da primeira e da segunda moléculas de oligoRNA de fita simples é submetida à ligação. Uma porção da solução de reação de anelamento pode

ser adicionada a uma solução de reação de ligação, ou todo o volume da solução de reação de anelamento pode ser usado para preparar uma solução de reação de ligação. A ligação pode ser uma ligação enzimática. A ligação enzimática pode ser ligação mediada por uma RNA ligase, em particular, uma ligase da família Rnl2.

[00159] A ligase da família Rnl2 (um membro da família Rnl2) é uma enzima com uma atividade de selagem de corte de RNA, ou seja, uma atividade de ligase na qual um corte de RNA (um corte em uma fita dupla de RNA ou fita dupla de RNA-DNA) é preenchido (selado) mediante a junção do grupo hidroxila 3' (3'-OH) ao grupo fosfato 5' (5'-PO₄) (consultar, por exemplo, Nandakumar J. *et al.*, Cell 127, páginas 71 a 84 (2006)). Os exemplos da ligase da família Rnl2 incluem, porém sem limitação, T4 RNA ligase 2, ligase de edição de RNA (REL) de Trypanosoma (por exemplo, *Trypanosoma brucei*) ou Leishmania (por exemplo, *Leishmania tarentolae*), bibliófago KVP40Rnl2, ligase de poxvírus AmEPV, ligase de baculovírus AcNPV e ligase de baculovírus XcGV, e variantes ou ligases modificadas dos mesmos. Essas ligases são bem conhecidas pelos versados na técnica, ou podem estar disponíveis comercialmente ou obtidas de acordo com os ensinamentos de artigos de pesquisa, etc. Por exemplo, T4 RNA ligase 2 está comercialmente disponível junto à New England Biolabs. A proteína de T4 RNA ligase 2 é codificada por gp24.1, um gene de bacteriófago T4. A T4 RNA ligase 2 pode ser isolada de acordo com as descrições em, por exemplo, Nandakumar J. e Shuman S., (2005) J. Biol. Chem., 280: 23.484 a 23.489; Nandakumar J., *et al.*, (2004) J. Biol. Chem., 279: 31.337 a 31.347; e Nandakumar J. e Shuman S., (2004) Mol. Cell, 16: 211 a 221. Na invenção, a “ligase da família Rnl2” não está limitada a ligases de ocorrência natural isoladas e exemplos incluem, desde que a ligase tenha uma atividade de selagem de corte de RNA, uma proteína recombinante, um mutante, uma variante de deleção (por exemplo, em uma forma truncada), um peptídeo (por

exemplo, uma etiqueta His, HA, c-Myc, V5 ou DDDDK), uma proteína de fusão ou uma proteína modificada, como uma proteína glicosilada ou lipidada.

[00160] A solução de reação de ligação pode ser preparada com o uso de componentes comumente usados na ligação ou tampão que contém os componentes. A solução de reação de ligação pode conter, além da primeira e da segunda moléculas de oligoRNA de fita simples acima, componentes que podem ser usados em uma reação de ligação de RNA, como Tris-HCl, um íon de metal divalente, ditioneitol (DTT) e adenosina trifosfato (ATP). Os exemplos do íon de metal divalente incluem, porém sem limitação, Mg^{2+} ou Mn^{2+} . A solução de reação de ligação normalmente contém um íon de metal divalente em uma forma de sal, por exemplo, um cloreto de metal (por exemplo, $MgCl_2$, $MnCl_2$).

[00161] A primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples podem ser ligadas com o uso de uma ligase de RNA ou uma outra enzima que tem uma atividade de unir terminais de RNA ou um corte de dsRNA, em particular, uma ligase da família Rnl2. Uma ligase de dsRNA pode ser usada como a ligase de RNA. A ligase de dsRNA é uma enzima com uma atividade principal de unir um corte de um RNA de fita dupla (dsRNA). Os exemplos de ligase de dsRNA incluem, porém sem limitação, T4 RNA ligase 2. A T4 RNA ligase 2 catalisa a formação de uma ligação fosfodiéster 3' a 5'.

[00162] Uma ligase da família Rnl2 pode ser adicionada a uma solução de reação de ligação; e uma molécula de oligoRNA de fita dupla que contém a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples aneladas e a ligase da família Rnl2 pode ser incubada sob condições que permitem a ligação para ligar, em uma fita simples, a extremidade 3' da primeira molécula de oligoRNA de fita simples à extremidade 5' da segunda molécula de oligoRNA de fita simples (em uma fita antissentido) constituindo a molécula de oligoRNA de fita dupla.

[00163] A primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples podem ser ligadas em uma solução de reação de ligação que contém a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples em quantidades molares iguais. Como usado aqui, “que contém ... em quantidades molares iguais” significa que a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples estão compreendidas a uma razão molar de 1: 1,1 a 1,1 : 1.

[00164] Em um método da invenção, a ligação pode ser realizada em uma solução de reação de ligação que contém a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples, cada uma a uma concentração de 10 μM ou maior, 40 μM ou maior, 100 μM ou maior, 150 μM ou maior, 200 μM ou maior, 300 μM ou maior ou 500 μM ou maior. Em uma modalidade, a solução de reação de ligação pode conter a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples, cada uma a uma concentração de 10.000 μM ou menos, por exemplo, 1.000 μM ou menos, 500 μM ou menos ou 300 μM ou menos. Em uma modalidade, a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples podem ser usadas em uma solução de reação de ligação a uma concentração de, por exemplo, de 50 a 500 μM , de 100 a 300 μM ou de 100 a 250 μM . Em um modalidade, a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples em tal concentração podem ser compreendidas em uma solução de reação de ligação que contém a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples em quantidades molares iguais. Em um método da invenção, a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples em uma concentração (ou quantidade) maior que a concentração (ou quantidade) da ligase da família Rnl2 em uma solução de reação podem ser usadas para aumentar a eficiência da produção de uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo.

[00165] Em uma modalidade, a solução de reação de ligação pode conter uma ligase da família Rnl2 a uma concentração de 0,01 U/ μl ou maior, por exemplo, 0,01 U/ μl ou maior, 0,08 U/ μl ou maior, 0,2 U/ μl ou maior ou

0,35 U/ μ l ou maior. A solução de reação de ligação pode conter uma ligase da família Rnl2 a uma concentração de, por exemplo, 10 U/ μ l ou menor, 1 U/ μ l ou menor ou 0,5 U/ μ l ou menor. Em uma modalidade, a ligase da família Rnl2 em tal concentração pode ser compreendida em uma solução de reação de ligação que contém a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples em quantidades molares iguais.

[00166] Em uma modalidade, o pH da solução de reação de ligação pode ser pH 6,5 ou maior, por exemplo, de pH 7,0 a 9,0, pH 7,4 ou maior, de pH 7,4 a 8,6, de pH 7,5 a 8,5 ou de pH 7,5 a 8,0. A solução de reação de ligação que contém a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples em quantidades molares iguais pode ter tal pH.

[00167] Em uma modalidade, a solução de reação de ligação contém um íon de metal divalente a 1 mM ou mais, por exemplo, de 1 a 20 mM, de 2 a 10 mM, de 3 a 6 mM ou 5 mM. Em uma modalidade, a solução de reação de ligação pode conter Mg^{2+} ou Mn^{2+} a 1 mM ou mais, por exemplo, de 1 a 20 mM, de 2 a 10 mM, de 3 a 6 mM ou 5 mM e pode conter, por exemplo, $MgCl_2$ em tal concentração. Em uma modalidade, o íon de metal divalente em tal concentração se inclui em uma solução de reação de ligação que contém a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples em quantidades molares iguais.

[00168] A solução de reação de ligação pode conter um(uns) aditivo(s) adicional(is), como polietilenoglicol (PEG). Os exemplos de polietilenoglicol que podem ser usados incluem PEG6000 a 20000, como PEG6000, PEG8000 ou PEG20000. A solução de reação de ligação pode conter polietilenoglicol a uma quantidade de, por exemplo, de 3 a 30% em p/v, de 5 a 20% em p/v, de 5 a 15% em p/v ou de 10 a 30% em p/v. Em uma modalidade, o polietilenoglicol em tal concentração pode ser compreendido em uma solução de reação de ligação que contém a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples em quantidades molares iguais. Em uma

modalidade, tal polietilenoglicol pode ser adicionado e usado em uma solução de reação de ligação que contém uma RNA ligase a 0,4 U/ μ l ou menos, por exemplo, de 0,01 a 0,4 U/ μ l, de 0,08 a 0,4 U/ μ l ou de 0,1 U/ μ l ou mais a menos que 0,3 U/ μ l.

[00169] A solução de reação de ligação normalmente contém ATP. Na invenção, a solução de reação de ligação contém ATP a uma concentração de, por exemplo, 5 mM ou menor, 2 mM ou menor, 1 mM ou menor e/ou 0,1 mM ou mais, ou de 0,1 a 1,5 mM.

[00170] Em uma modalidade, a solução de reação de ligação pode conter Tris-HCl e pode conter, por exemplo, Tris-HCl a uma concentração de 10 a 70 mM sem limitação. A solução de reação de ligação pode conter ditioneitol (DTT) e pode conter DTT a uma concentração de, por exemplo, de 0,1 a 5 mM sem limitação.

[00171] Na invenção, o tempo de reação para a ligação pode ser adequado para uma reação de ligação com um oligoRNA de fita dupla que contém a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples na invenção. A reação de ligação pode ser realizada durante um tempo de reação de, por exemplo, 20 min ou mais ou 30 min ou mais, 1 hora ou mais, 2 horas ou mais, ou 3 horas ou mais. O tempo de reação para a ligação na invenção pode ser de 4 horas ou mais, 6 horas ou mais, 8 horas ou mais, 10 horas ou mais, 12 horas ou mais, 24 horas ou mais ou 48 horas ou mais. Na invenção, quando a solução de reação de ligação usada contém a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples em uma concentração particularmente alta (por exemplo, 100 μ M ou 200 μ M ou maior), a reação de ligação pode ser realizada durante um período mais longo. Por exemplo, quando a solução de reação de ligação tem um pH 7,4 ou superior, pH 7,4 a 8,6, pH 7,5 a 8,5 ou pH 7,5 a pH 8,0, pode ser usado um tempo de reação mais longo (por exemplo, 4 horas ou mais, 12 horas ou mais ou 24 horas ou mais). No caso do uso de uma molécula de oligoRNA de fita simples particular altamente

concentrada, tal tempo de reação mais longo pode ser usado.

[00172] Em um método da invenção, a etapa de ligação pode ser conduzida enquanto a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples são adicionadas em etapas. O termo ‘adicionadas em etapas’ em relação à primeira e à segunda moléculas de oligoRNA de fita simples significa que durante a etapa de ligação, a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples são adicionadas à solução de reação múltiplas vezes com um intervalo temporal. Por exemplo, a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples e uma RNA ligase são incubadas ao longo de um tempo adequado para uma reação de ligação. Em seguida, como uma etapa de reação adicional, a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples são ainda mais adicionadas para relizar uma reação de ligação adicional. A etapa de reação adicional pode ser realizada uma ou repetida mais de uma vez. Dessa forma, a ligação pode ser realizada enquanto adiciona-se moléculas de oligoRNA de fita simples em etapas em um sistema de reação. A etapa de reação adicional pode ser repetida duas, três, quatro ou mais vezes. Nesse caso, o primeiro período de incubação (tempo de reação inicial) para a ligação da primeira e da segunda moléculas de oligoRNA de fita simples pode depender do tempo de reação de ligação acima e pode ser, por exemplo, de 4 horas ou mais, 8 horas ou mais, 12 horas ou mais ou 24 horas ou mais. O período de incubação (tempo de reação adicional) depois que a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples são ainda mais adicionadas pode ser, por exemplo, de 4 horas ou mais, 8 horas ou mais, 12 horas ou mais ou 24 horas ou mais. Na etapa de reação adicional durante a ligação, o tempo de reação adicional por ciclo pode ser igual ou diferente um do outro. O tempo de reação inicial durante a ligação e o tempo de reação adicional por ciclo podem ser iguais ou diferentes. Quando a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples são adicionadas em etapas, a concentração da(s) molécula(s) de oligoRNA de fita simples adicionada(s) à

solução de reação de ligação pela primeira vez pode ser a mesma que acima e pode ser, por exemplo, de 40 μM ou maior, 100 μM ou maior, 150 μM ou maior ou 200 μM ou maior. A quantidade de moléculas de RNA de fita simples adicionadas à solução de reação de ligação durante cada etapa de reação adicional pode ser igual ou diferente da quantidade (o número de moles) de moléculas de RNA de fita simples compreendidas na solução de reação inicial, e pode ser, por exemplo, de 4 nmol ou mais, 10 nmol ou mais, 15 nmol ou mais ou 20 nmol ou mais.

[00173] A primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples são ligadas enquanto adicionadas em etapas. Isso pode aumentar o teor da primeira e da segunda moléculas de oligoRNA de fita simples na solução de reação enquanto reduz uma inibição de reação (uma diminuição na eficiência de ligação) causada por uma alta concentração de moléculas de RNA de fita simples. Isso pode aumentar o rendimento da molécula de RNA de fita simples em forma de grampo acima.

[00174] As condições de reação acima podem ser opcionalmente usadas em combinação. Uma pluralidade de condições selecionadas a partir das condições acima, como a temperatura durante a etapa de anelamento, o tempo durante a etapa de anelamento, a razão de mistura da primeira e da segunda moléculas de oligoRNA de fita simples a serem aneladas, a quantidade (concentração) da primeira e da segunda moléculas de oligoRNA de fita simples na solução de reação de ligação, o tipo e uso de enzima (por exemplo, uma ligase da família Rnl2), o tipo e a concentração de íon de metal divalente, pH, concentração de ATP, componentes adicionados, como PEG, e a concentração do mesmo, o tempo de reação para a ligação e a adição em etapas (adição suplementar) da primeira e da segunda moléculas de oligoRNA de fita simples durante a reação de ligação, pode ser opcionalmente combinada. Por exemplo, a primeira e a segunda moléculas de oligoRNA de fita simples a uma concentração relativamente alta (por exemplo, de 100 μM

a 300 μM) na solução de reação de ligação acima podem ser combinadas com qualquer uma das outras condições. Alternativamente, o uso (por exemplo, 0,01 U/ μl a 1 U/ μl) de enzima (por exemplo, uma ligase da família Rnl2) pode ser combinado com qualquer uma das outras condições.

[00175] Em um método da invenção, as condições da reação de ligação podem ser ajustadas conforme acima. Nesse caso, uma RNA ligase, em particular, uma ligase da família Rnl2 em uma quantidade menor do que a quantidade da primeira e da segunda moléculas de oligoRNA de fita simples usadas, pode ser usada para aumentar relativa ou absolutamente o rendimento do produto de ligação. Em um método da invenção, é possível usar uma RNA ligase, em particular, uma ligase da família Rnl2 em uma quantidade de 10 unidades (U) ou menos, 5 U ou menos, 4 U ou menos, 2 U ou menos, 1 U ou menos, 0,7 U ou menos, 0,5 U ou menos, 0,3 U ou menos ou 0,1 U ou menos por nmol (o número de moles) da primeira e/ou da segunda molécula de oligoRNA de fita simples usada para a ligação. Em uma modalidade, o uso de RNA ligase, em particular, uma ligase da família Rnl2 pode ser de 0,001 unidade (U) ou mais, 0,01 U ou mais, 0,1 U ou mais, 0,2 U ou mais ou 1 U ou mais por quantidade (nmol) da primeira e/ou da segunda molécula de oligoRNA de fita simples. A “RNA ligase em uma quantidade de “X” unidade ou menos por nmol (o número de moles) da primeira e/ou da segunda molécula de oligoRNA de fita simples” significa que a quantidade de atividade da RNA ligase, em particular, uma ligase da família Rnl2 é de “X” unidade ou menos quando comparada a um ou ambos dos números de moles (nmol) da primeira e da segunda moléculas de oligoRNA de fita simples. Em uma modalidade, o número de moles (nmol) da primeira ou segunda molécula de oligoRNA de fita simples, o que for menor, pode ser usado como uma referência para determinar a quantidade de RNA ligase usada. O número de moles (nmol) da primeira molécula de oligoRNA de fita simples pode ser calculado como a quantidade total da primeira molécula de oligoRNA de fita

simples adicionada ao sistema de reação de ligação. Por exemplo, quando a molécula de oligoRNA de fita simples é adicionada em etapas, o número de moles da primeira molécula de oligoRNA de fita simples na solução de reação inicial durante a ligação e o número de moles da primeira molécula de oligoRNA de fita simples adicionados ao sistema de reação durante a etapa de reação adicional podem ser totalizados como o número de moles.

[00176] A temperatura da reação de ligação pode ser alterada dependendo da enzima usada (uma ligase da família Rnl2) e pode ser, por exemplo, de 10 a 50°C, de 15 a 45°C, de 20 a 40°C, de 20 a 30°C ou de 23 a 28°C. Por exemplo, quando T4 RNA ligase 2 é usada, a temperatura pode ser de 10 a 50°C, de 15 a 45°C, de 20 a 40°C, de 20 a 30°C ou de 23 a 28°C.

[00177] Após a conclusão da etapa de ligação, a solução de reação de ligação contém, em uma proporção alta, uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo que inclui uma sequência de inibição da expressão de gene na invenção.

[00178] A molécula de RNA de fita simples em forma de grampo que inclui uma sequência de inibição da expressão de gene na solução de reação de ligação na invenção pode ser purificada por um método conhecido pelos versados na técnica. Os exemplos da técnica de purificação incluem, porém sem limitação, cromatografia como cromatografia de fase reversa, cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC), cromatografia líquida de eficiência ultra-alta (UHPLC) ou cromatografia de troca iônica, filtração em gel, purificação de coluna, eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) ou qualquer combinação das mesmas.

[00179] No procedimento descrito na Publicação Internacional WO 2013/027843, as impurezas de ácido nucleico, como impurezas de ácido nucleico de fita curta e variantes de deleção, podem ser geradas devido à terminação de uma reação de alongamento de uma fita muito curta, causando assim uma diminuição na pureza de um produto de interesse na solução de

reação. Em contraste, um método de acordo com uma modalidade preferencial da invenção tem uma vantagem a partir do ponto de vista de ser capaz de diminuir as impurezas de ácido nucleico na solução de reação de ligação depois que uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo na invenção é produzida. Um método de acordo com uma modalidade preferencial da invenção pode ser usado para produzir uma molécula de RNA de fita simples altamente estável capaz de inibir a expressão de gene com o uso de amiditas de RNA de propósito geral enquanto diminui a geração de impurezas de ácido nucleico.

[00180] Uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo produzida por um método da invenção pode ser usada e administrada *in vivo* ou de modo intracelular para inibir a expressão de um gene alvo por meio de um procedimento convencional.

[00181] A invenção se refere, adicionalmente, a um kit para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo para inibir a expressão de um gene alvo, sendo que o kit compreende uma combinação (par) de moléculas de oligoRNA de fita simples na invenção. Tal kit pode ser adequadamente usado para colocar em prática um método para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo capaz de inibir a expressão de um gene alvo de acordo com a invenção.

[00182] Em uma modalidade, os exemplos do kit incluem, porém sem limitação, um kit para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo capaz de inibir a expressão de gene de TGF- β 1, sendo que o kit compreende uma combinação de moléculas de oligoRNA de fita simples representada por qualquer uma dentre as seguintes (i) a (vi):

(i) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 7, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante, e da segunda molécula de oligoRNA

de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 6, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 10 e 11 são conectados através do segundo ligante;

(ii) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 19, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante, e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 18, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 16 e 17 são conectados através do segundo ligante;

(iii) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 27, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante, e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 26, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 20 e 21 são conectados através do segundo ligante;

(iv) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 29, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante, e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 28, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 21 e 22 são conectados através do segundo ligante;

(v) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 31, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante, e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ

ID NO: 30, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 22 e 23 são conectados através do segundo ligante; e

(vi) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 33, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante, e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 32, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 23 e 24 são conectados através do segundo ligante.

[00183] Em uma outra modalidade, os exemplos do kit incluem, porém sem limitação, um kit para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo capaz de inibir a expressão do gene GAPDH, sendo que o kit compreende uma combinação de moléculas de oligoRNA de fita simples representada por qualquer uma dentre as seguintes (vii):

(vii) uma combinação de uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 37, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 22 e 23 são conectados através do primeiro ligante e uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 36, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 20 e 21 são conectados através do segundo ligante.

[00184] Em uma outra modalidade, os exemplos do kit incluem, porém sem limitação, um kit para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo capaz de inibir a expressão de gene LAMA1, sendo que o kit compreende uma combinação de moléculas de oligoRNA de fita simples representada por qualquer uma dentre as seguintes (viii) a (xi):

(viii) uma combinação de uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 39, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são

conectados através do primeiro ligante e uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 38, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 16 e 17 são conectados através do segundo ligante;

(ix) uma combinação de uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 41, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante e uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 40, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 22 e 23 são conectados através do segundo ligante;

(x) uma combinação de uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 43 (em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 31 são conectados através de um ligante de nucleotídeo) e uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 42 (em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 21 e 26 são conectados através de um ligante de nucleotídeo); e

(xi) uma combinação de uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 45 (em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 31 são conectados através de um ligante de nucleotídeo) e uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 44 (em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 22 e 27 são conectados através de um ligante de nucleotídeo).

[00185] Em uma outra modalidade, os exemplos do kit incluem, porém sem limitação, um kit para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo capaz de inibir a expressão do gene LMNA, sendo que o kit compreende uma combinação de moléculas de oligoRNA de fita simples

representada por qualquer uma dentre as seguintes (xii) a (xiii):

(xii) uma combinação de uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 47, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante e uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 46, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 21 e 22 são conectados através do segundo ligante; e

(xiii) uma combinação de uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 49, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante e uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 48, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 23 e 24 são conectados através do segundo ligante.

EXEMPLOS

[00186] Doravante, a presente invenção será descrita mais especificamente com o uso dos Exemplos. Nesse sentido, entretanto, o escopo técnico da invenção não se limita a esses Exemplos.

[EXEMPLO DE REFERÊNCIA 1] SÍNTESE DE PROLINA DIAMIDO AMIDITA

[00187] Uma prolina diamido amidita a ser usada para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo, que compreende um ligante de derivado de prolina, de acordo com a presente invenção, pode ser sintetizada de acordo com as descrições na Publicação internacional WO 2013/027843. Os exemplos específicos de síntese serão ilustrados abaixo, mas o método de síntese não se limita aos mesmos.

(1) FMOC-HIDROXIAMIDO-L-PROLINA

[00188] Fmoc-L-prolina é usada como um material de partida. Fmoc

representa um grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonila. Fmoc-L-prolina (10,00 g, 29,64 mmol), 4-amino-1-butanol (3,18 g, 35,56 mmol) e 1-hidroxibenzotriazol (10,90 g, 70,72 mmol) são misturados. A mistura resultante é desgaseificada sob pressão reduzida e gás argônio é então carregado. À mistura resultante adiciona-se acetonitrila anidra (140 ml) à temperatura ambiente e é ainda adicionada uma solução de acetonitrila anidra (70 ml) de dicitlo-hexil carbodi-imida (7,34 g, 35,56 mmol). A mistura resultante é agitada sob uma atmosfera de argônio à temperatura ambiente durante 15 horas. Após a conclusão da reação, os precipitados resultantes são filtrados. Em relação a um filtrado coletado, um solvente é removido por destilação sob pressão reduzida. Diclorometano (200 ml) é adicionado ao resíduo resultante, que é então lavado com água de bicarbonato de sódio saturado (200 ml). Em seguida, uma camada orgânica é coletada, seca sobre sulfato de magnésio e, então, filtrada. Em relação ao filtrado resultante, um solvente é removido por destilação sob pressão reduzida. Éter dietílico (200 ml) é adicionado ao resíduo resultante, que é então pulverizado. O pó resultante foi separado por filtração para produzir Fmoc-hidroxi-amino-L-prolina como uma substância em pó incolor.

(2) DMTr-AMIDO-L-PROLINA

[00189] Fmoc-hidroxi-amino-L-prolina (7,80 g, 19,09 mmol) e piridina anidra (5 ml) são misturadas, azeotropadas duas vezes à temperatura ambiente e, então, secas. Ao resíduo resultante são adicionados cloreto de 4,4'-dimetoxitritila (8,20 g, 24,20 mmol), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (23 mg, 0,19 mmol) e piridina anidra (39 ml). Essa mistura é agitada à temperatura ambiente durante 1 hora e metanol (7,8 ml) é, então, adicionado à mesma e a mistura é agitada à temperatura ambiente durante 30 min. A mistura resultante é diluída com diclorometano (100 ml) e lavada com água de bicarbonato de sódio saturado (150 ml), seguido da separação de uma camada orgânica. Essa camada orgânica é seca sobre sulfato de sódio e, então,

filtrada. Em relação ao filtrado resultante, um solvente é removido por destilação sob pressão reduzida. Dimetilformamida anidra (39 ml) e piperidina (18,7 ml, 189 mmol) são adicionadas ao resíduo bruto resultante, e a mistura é agitada à temperatura ambiente durante 1 hora. Após a conclusão da reação, um solvente é removido por destilação da mistura líquida sob pressão reduzida à temperatura ambiente. O resíduo resultante é submetido à cromatografia em coluna de gel de sílica (nome comercial: Wakogel C-300; eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 9 : 1$, que contém piridina a 0,05%) para produzir DMTr-amido-L-prolina como uma substância oleosa amarela pálida. DMTr representa um grupo dimetoxitritila.

(3) DMTr-HIDROXIDIAMIDO-L-PROLINA

[00190] Uma solução de diclorometano anidro (120 ml) que contém a DMTr-amido-L-prolina resultante (6,01 g, 12,28 mmol), N- (3'-dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodi-imida (EDC) (2,83 g, 14,74 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (3,98 g, 29,47 mmol) e trietilamina (4,47 g, 44,21 mmol) é misturada. A essa mistura líquida é adicionado ainda, sob uma atmosfera de argônio à temperatura ambiente, ácido 6-hidroxi hexanoico (1,95 g, 14,47 mmol). A mistura é então agitada sob uma atmosfera de argônio à temperatura ambiente durante 1 hora. A mistura líquida resultante é diluída com diclorometano (600 ml) e lavada com salmoura (solução salina saturada) (800 ml) três vezes. Uma camada orgânica é recolhida, seca sobre sulfato de sódio e, então, filtrada. Em relação ao filtrado resultante, um solvente é removido por destilação sob pressão reduzida. Isso rende DMTr-hidroxi-diamido-L-prolina como uma substância espumada amarela pálida.

(4) DMTr-DIAMIDO-L-PROLINA AMIDITA

[00191] A DMTr-hidroxi-diamido-L-prolina resultante (8,55 g, 14,18 mmol) é misturada com acetonitrila anidra, azeotropada três vezes à temperatura ambiente e, então, seca. Tetrazolida de di-isopropilamônio (2,91 g, 17,02 mmol) é adicionada ao resíduo resultante, desgaseificada sob pressão

reduzida e, então, gás argônio é carregado. À mistura resultante é adicionada acetonitrila anidra (10 ml) e é ainda adicionada uma solução de acetonitrila anidra (7 ml) de 2-cianoetoxi-N,N,N',N'-tetraisopropil fosfordiamidita (5,13 g, 17,02 mmol). Essa mistura é agitada sob uma atmosfera de argônio à temperatura ambiente durante 2 horas. A mistura resultante é diluída com diclorometano, lavada com água de bicarbonato de sódio saturado (200 ml) três vezes e, então, lavada com salmoura (200 ml). Uma camada orgânica é recolhida, seca sobre sulfato de sódio e, então, filtrada. Em relação ao filtrado resultante, um solvente é removido por destilação sob pressão reduzida. O resíduo resultante é submetido à cromatografia em coluna com o uso de aminosílica gel como uma carga (eluente hexano: acetato de etila = 1: 3, que contém piridina a 0,05%) para prover DMTr-diamido-L-prolina amidita como uma substância semelhante a xarope incolor.

[EXEMPLO 1] SÍNTESE DE MOLÉCULA DE OligoRNA DE FITA SIMPLES

[00192] Nos Exemplos abaixo, uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo que tem uma sequência de inibição da expressão do gene TGF- β 1 humano e ligantes com o uso de um derivado de prolina (doravante, também mencionada como “molécula de ssTbRNA”; Figura 2) foi produzida por meio da ligação de dois fragmentos de segmentação, ou seja, moléculas de oligoRNA de fita simples (fita 1 e fita 2) com o uso de uma RNA ligase (T4 RNA ligase 2) (método de ligação; Figura 1).

[00193] Para examinar sua posição de segmentação, os pares de moléculas de oligoRNA de fita simples (fita 1 e fita 2; Tabela 1), cuja posição de segmentação foi deslocada um a um nucleotídeo nas moléculas de ssTbRNA, foram produzidos conforme descrito abaixo.

TABELA 1

Nome de par	Fita 1 (sentido)	Fita 2 (antissentido)
004	5'-AGCAGAGUACACACAGCAUAUACC-P-GGUAUAUGCUGUGUGUA-3' (SEQ ID NO: 5)	5'-CUCUGCUUC-P-G-3' (SEQ ID NO: 4)
005	5'-AGCAGAGUACACACAGCAUAUACC-P-GGUAUAUGCUGUGUGU-3' (SEQ ID NO: 7)	5'-ACUCUGCUUC-P-G-3' (SEQ ID NO: 6)
006	5'-AGCAGAGUACACACAGCAUAUACC-P-GGUAUAUGCUGUGUG-3' (SEQ ID NO: 9)	5'-UACUCUGCUUC-P-G-3' (SEQ ID NO: 8)
007	5'-AGCAGAGUACACACAGCAUAUACC-P-GGUAUAUGCUGUGU-3' (SEQ ID NO: 11)	5'-GUACUCUGCUUC-P-G-3' (SEQ ID NO: 10)
008	5'-AGCAGAGUACACACAGCAUAUACC-P-GGUAUAUGCUGUG-3' (SEQ ID NO: 13)	5'-UGUACUCUGCUUC-P-G-3' (SEQ ID NO: 12)
009	5'-AGCAGAGUACACACAGCAUAUACC-P-GGUAUAUGCUGU-3' (SEQ ID NO: 15)	5'-GUGUACUCUGCUUC-P-G-3' (SEQ ID NO: 14)
010	5'-AGCAGAGUACACACAGCAUAUACC-P-GGUAUAUGCUG-3' (SEQ ID NO: 17)	5'-UGUGUACUCUGCUUC-P-G-3' (SEQ ID NO: 16)
011	5'-AGCAGAGUACACACAGCAUAUACC-P-GGUAUAUGCU-3' (SEQ ID NO: 19)	5'-GUGUGUACUCUGCUUC-P-G-3' (SEQ ID NO: 18)
012	5'-AGCAGAGUACACACAGCAUAUACC-P-GGUAUAUGC-3' (SEQ ID NO: 21)	5'-UGUGUGUACUCUGCUUC-P-G-3' (SEQ ID NO: 20)
013	5'-AGCAGAGUACACACAGCAUAUACC-P-GGUAUAUG-3' (SEQ ID NO: 23)	5'-CUGUGUGUACUCUGCUUC-P-G-3' (SEQ ID NO: 22)
014	5'-AGCAGAGUACACACAGCAUAUACC-P-GGUAUAU-3' (SEQ ID NO: 25)	5'-GCUGUGUGUACUCUGCUUC-P-G-3' (SEQ ID NO: 24)
015	5'-AGCAGAGUACACACAGCAUAUACC-P-GGUAUA-3' (SEQ ID NO: 27)	5'-UGCUGUGUGUACUCUGCUUC-P-G-3' (SEQ ID NO: 26)
016	5'-AGCAGAGUACACACAGCAUAUACC-P-GGUAU-3' (SEQ ID NO: 29)	5'-AUGCUGUGUGUACUCUGCUUC-P-G-3' (SEQ ID NO: 28)
017	5'-AGCAGAGUACACACAGCAUAUACC-P-GGUA-3' (SEQ ID NO: 31)	5'-UAUGCUGUGUGUACUCUGCUUC-P-G-3' (SEQ ID NO: 30)
018	5'-AGCAGAGUACACACAGCAUAUACC-P-GGU-3' (SEQ ID NO: 33)	5'-AUAUGCUGUGUGUACUCUGCUUC-P-G-3' (SEQ ID NO: 32)
019	5'-AGCAGAGUACACACAGCAUAUACC-P-GG-3' (SEQ ID NO: 35)	5'-UAUAUGCUGUGUGUACUCUGCUUC-P-G-3' (SEQ ID NO: 34)

*P: Derivado de prolina

[00194] Especificamente, cada molécula de oligoRNA de fita simples (fita 1 ou fita 2) foi sintetizada através de um método de fosforamidita na direção 3' a 5' com o uso de um sintetizador de ácido nucleico (nome comercial: AKTA oligopilot-100, fabricado por GE Healthcare Life Sciences; ou nome comercial: nS-8 e nS-8II, fabricado por GeneDesign, Inc.). Para a síntese de RNA com base no método de fosforamidita, 5'-O-DMT-2'-O-TBDMSi-RNA fosforamidita (ThermoFisher Scientific) ou 5'-O-DMT-2'-O-TBDMS-RNA fosforamidita (Sigma- Aldrich Co., LLC.) foi usado como uma

RNA amidita. Como um carreador, foram usadas microesferas de poliestireno (NittoPhase^(R) HL rG(ibu), ou rU; KINOVATE) ou microesferas de vidro poroso (CPG) (Universal UnyLinker Support 1000Å; Chemgenes). Como um reagente de 5'-fosforilação, foi usado 3-(4,4'-dimetoxitritiloxi)-2,2-(N-metilamido)]propil-[(2-cianoetil)-(N, N-di-isopropil)]-fosforamidita (Reagente de Fosforilação Química sólido; LINK).

[00195] Primeiramente, uma sequência de RNA da extremidade 3' a um resíduo imediatamente antes de um ligante (Xa ou Ys na Figura 1) foi sintetizada. Então, uma DMTr-diamido-L-prolina amidita para a formação de ligante foi ligada à extremidade 5' e, então, no lado 5' da mesma, uma sequência de RNA de um resíduo imediatamente após o ligante à extremidade 5' (Xs; ou Ya₃, Ya₂, e Ya₁ na Figura 1) foi adicionalmente sintetizada. Dessa forma, as moléculas de oligoRNA de fita simples da fita 1 e fita 2 foram produzidas. As moléculas de oligoRNA de fita simples têm, como Lx₁ ou Lx₂, um ligante representado pela fórmula (VI-1). Xa é conectado ao ligante Lx₁ no lado de átomo de nitrogênio da posição 1 e Xs é conectado ao ligante Lx₁ no lado de átomo de carbono da posição 2 na fórmula (VI-1). Ys é conectado ao ligante Lx₂ no lado de átomo de nitrogênio da posição 1 e Ya₃ é conectado ao ligante Lx₂ no lado do átomo de carbono da posição 2 na fórmula (VI-1).

[00196] Em relação à fita 2 (no lado antissentido), a síntese foi terminada em um estado DMTr-DESLIGADO. A molécula de oligoRNA de fita simples foi clivada e as bases e a posição 2 foram desprotegidas por meio de um procedimento convencional. Em relação à fita 1 (no lado de sentido), a síntese foi terminada em um estado DMTr-LIGADO.

[EXEMPLO 2] EXAME DO MÉTODO DE LIGAÇÃO (POSIÇÃO DE SEGMENTAÇÃO)

[00197] Para examinar uma posição de segmentação em que uma molécula de ssTbRNA deve ser segmentada em dois fragmentos de segmentação, a fita 1 e fita 2 pareadas (Tabela 1) foram ligadas com o uso de

uma RNA ligase (T4 RNA ligase 2) e determinou-se a eficiência de ligação.

[00198] Especificamente, primeiro, a fita 1 e a fita 2 dos respectivos pares foram, cada uma, dissolvidas em água para injeção (DW) e misturadas em quantidades molares iguais. Essa mistura líquida equimolar foi desnaturada por calor por meio do aquecimento a 93°C durante 1 min e, então, deixada em repouso a 55°C durante 15 min para o anelamento. Depois disso, a temperatura foi diminuída para 4°C. Após a queda de temperatura, a solução de reação foi analisada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) (a 20°C) e eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturada (Native PAGE) para examinar o estado de anelamento da fita 1 e da fita 2.

[00199] As condições para RP-HPLC usadas para examinar o estado de anelamento foram as seguintes:

Coluna: Coluna ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C18, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 100 mm;

Fase móvel: A) acetato de trietil amônio 0,1 M (TEAA), B) acetonitrila (MeCN); e

Condições de análise: B5-30%, 10 min, 20°C, 0,4 ml/min.

[00200] As condições para Native PAGE (PAGE não desnaturada) usadas foram as seguintes:

PAGE não desnaturada: Acrilamida a 19%, eletroforese em 150 V durante 90 min.

[00201] Isso rendeu cada oligoRNA de fita dupla em que a fita 1 e a fita 2 foram aneladas entre si. Havia alguns pares em que a maioria das moléculas da fita 1 e da fita 2 foi anelada, e outros pares em que a fita 1 e a fita 2 foram aneladas em uma porcentagem menor.

[00202] Os oligoRNAs de fita dupla resultantes (com fita 1 e fita 2 na concentração final de 10 µM) foram compreendidos em um tampão (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, ditioneitol 1 mM (DTT), adenosina trifosfato 400 µM

(ATP)) para preparar uma solução de reação (pH 7,5). Então, 2 µl de 10 U/µl de T4 RNA ligase 2 (New England Biolabs; o mesmo se aplica ao seguinte) foram adicionados a 40 U/nmol de oligoRNA para ter um volume de solução de reação de 50 µl. Essa solução de reação foi incubada a 37°C durante 30 min.

[00203] Após a reação enzimática, a eficiência de ligação na solução de reação foi determinada por meio de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) e eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturada (PAGE desnaturada).

[00204] As condições de UHPLC pós-ligação foram as seguintes:

Coluna: Coluna ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C18, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 100 mm;

Fase móvel: A) hexafluoro-2-propanol 100 mM (HFIP)- trietilamina 8 mM (TEA), B) metanol (MeOH); e

Condições de análise: B5-40%, 10 min, 80°C, 0,4 ml/min.

[00205] As condições para PAGE desnaturada (PAGE desnaturada) foram as seguintes:

PAGE desnaturada: Acrilamida a 19%, ureia 7,5 M, 200 V, eletroforese de 90 min, seguido de coloração com brometo de etídio (EtBr).

[00206] A eficiência de ligação (FLP (%)) foi calculada, com base no resultado de análise por UHPLC, por meio de um método de porcentagem de área com o uso da equação abaixo.

FLP (Produto de Comprimento Total) (%)

= (Área de pico de produto de ligação de interesse) / (Área de pico total em um cromatograma) x 100.

[00207] A Figura 3 mostra os resultados. As posições de segmentação diferentes causaram uma grande diferença na eficiência de ligação. Nas posições de segmentação em que a extremidade 3' da fita 1 foi U, a eficiência de ligação tendeu a aumentar. Além disso, existiu uma tendência de que, no

caso de adotar a posição de segmentação em que a extremidade 3' da fita 1 ou a extremidade 5' da fita 2 foi A, a eficiência de ligação também foi alta. Adicionalmente, no caso de adotar a posição de segmentação em que um nucleotídeo na extremidade 3' da fita 1 ou um nucleotídeo na extremidade 5' da fita 2 foi U ou A, respectivamente, foi exibida excelente eficiência de ligação.

[00208] Cada produto de ligação foi analisado por LC-MS para confirmar um peso molecular previsto. O seguinte equipamento foi usado para a análise LS-MS.

[00209] Aparelho de LC: UHPLC UltiMate3000 (fabricado por ThermoFisher Scientific, Inc.); e

Equipamento de MS: Q-Exactive (fabricado por ThermoFisher Scientific, Inc.).

[00210] Com base nos resultados, foram selecionados os pares 011, 016 e 018, que foram adequados para o método de ligação.

[00211] Desse modo, a fita 1 e a fita 2 de cada par 011, 016 ou 018 foram aneladas entre si, e a solução de reação depois que foram conectadas por meio de ligação foi analisada por RP-HPLC sob as condições acima. Existiu uma pequena quantidade de impurezas de ácido nucleico na solução de reação, exceto para a molécula de ssTbRNA de interesse e as fitas livres 1 e 2. Além disso, a quantidade de variantes de deleção (com uma falta de uma porção da sequência da molécula de ssTbRNA) que aparecem no ou próximo ao pico da molécula de ssTbRNA também foi pequena (Tabela 2). Em contrapartida, em um procedimento de fase sólida para sintetizar toda a molécula de ssTbRNA por meio de um método de fosforamidita (Literatura de Patente 2), uma quantidade relativamente grande de impurezas de ácido nucleico de fita curta (como moléculas de RNA geradas por meio da terminação precoce da síntese no estágio de fitas curtas) diferente da molécula de ssTbRNA foi compreendida na solução de reação pós-síntese, com muitas

variantes de deleção situadas no ou próximo ao pico da molécula de ssTbRNA (Tabela 2). Dessa forma, foi demonstrado que o método da invenção possibilita que uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo de interesse seja produzida em alta pureza.

[00212] Na Tabela 2, os valores para a fita 1, a fita 2 e a molécula de ssTbRNA indicam, cada um, uma taxa de área de pico com base em um cromatograma. Além disso, como uma quantidade relativa de ácido nucleico no ou próximo ao pico da molécula de ssTbRNA (que contém principalmente a molécula de ssTbRNA e suas variantes de deleção), o total das taxas de área de pico (%) dentro do RRT (tempo de retenção relativo; aqui, o tempo de retenção relativo quando o tempo de retenção do pico da molécula de ssTbRNA foi definido para 1) = 0,98 a 1,07 foi calculado. Os tempos de retenção de pico da fita 1 ou fita 2 foram suficientemente distantes daqueles da molécula de ssTbRNA e não estavam presentes na faixa de RRT = 0,98 a 1,07.

TABELA 2

Solução de reação	Fita 1	Fita 2	ssTb	Ácido nucleico em ou próximo ao pico de ssTb (incluindo variantes de deleção)
011	1,7%	1,2%	94,7%	95,4%
016	0,4%	0,3%	97,0%	97,7%
018	0,7%	0,6%	95,6%	96,9%
Síntese de sólido de produtos de comprimento total	-	-	85,7%	91,2%

[EXEMPLO 3] EXAME DO MÉTODO DE LIGAÇÃO (TEMPERATURA DE ANELAMENTO)

[00213] As moléculas de oligoRNA de fita simples, que eram fita 1 e fita 2 de cada par 011, 016 ou 018, foram usadas para conduzir um teste de anelamento sob duas condições diferentes.

[00214] Primeiramente, sob condições de desnaturação por calor, a fita 1 e a fita 2 dos respectivos pares foram, cada uma, dissolvidas em água para injeção e misturadas em quantidades molares iguais de 40 µM. A mistura líquida foi desnaturada por calor por meio do aquecimento a 93°C durante 1

min e, então, deixada em repouso a 55°C por 15 min para o anelamento. Depois disso, a temperatura foi diminuída para 4°C. Após a queda de temperatura, a solução de reação foi analisada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) (a 20°C) e eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturada (Native PAGE) para examinar o estado de anelamento da fita 1 e da fita 2.

[00215] Entretanto, sob condições de temperatura ambiente, a fita 1 e a fita 2 dos respectivos pares foram, cada uma, dissolvidas em água para injeção e misturadas em quantidades molares iguais de 200 a 400 µM. A mistura líquida resultante foi deixada em repouso à temperatura ambiente por 10 min. A solução de reação depois de deixada em repouso foi analisada por RP-HPLC (a 20°C) e eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturada para examinar o estado de anelamento da fita 1 e da fita 2.

[00216] Como resultado, nenhum pico de fita simples foi mostrado por RP-HPLC em qualquer uma dentre as condições de desnaturação por calor ou as condições de temperatura ambiente, enquanto um pico de fita dupla gerado pelo anelamento foi observado. Além disso, na eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturada, a maioria das moléculas das cadeias 1 e 2 demonstrou ser anelada entre si tanto sob as condições de desnaturação por calor como sob as condições de temperatura ambiente.

[00217] Em virtude do fato de que os resultados comparáveis foram obtidos sob as condições de desnaturação por calor e as condições de temperatura ambiente, o anelamento no método de ligação foi realizado sob as condições de temperatura ambiente doravante.

[00218] Nos Exemplos a seguir, o estado de anelamento entre moléculas de oligoRNA de fita simples da fita 1 e fita 2 foi verificado por RP-HPLC e eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturada (Native PAGE). Depois que a pureza (FLP) do RNA de fita dupla foi verificada como sendo de 95% ou maior por RP-HPLC, o RNA de fita dupla foi usado para a

reação de ligação.

[00219] As condições para RP-HPLC usadas para verificar o estado de anelamento foram as seguintes:

coluna: Coluna ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C18, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 100 mm;

fase móvel: A) acetato de trietil amônio 0,1 M (TEAA), B) acetonitrila (MeCN); e

condições de análise: B5-30%, 10 min, 20°C, 0,4 ml/min.

[00220] As condições para Native PAGE (PAGE não desnaturada) usadas foram as seguintes:

PAGE não desnaturada: Acrilamida a 19%, eletroforese em 150 V durante 90 min.

[EXEMPLO 4] EXAME DO MÉTODO DE LIGAÇÃO (TEMPERATURA DE REAÇÃO E TEMPO DE REAÇÃO)

[00221] Três pares 011, 016 e 018 (Tabela 1; doravante, os pares são simplesmente também mencionados como 011, 016 ou 018, respectivamente) foram usados, cada um, para examinar a temperatura e o tempo da reação de ligação. A Figura 4 mostra as estruturas da fita 1 e da fita 2 de 011, 016 ou 018.

[00222] Semelhante ao Exemplo 2, a fita 1 e a fita 2 dos respectivos pares foram, cada uma, dissolvidas em água para injeção e misturadas em quantidades molares iguais. Essa mistura líquida equimolar foi deixada em repouso à temperatura ambiente durante 10 min, e o oligoRNA de fita dupla foi preparado por meio de anelamento.

[00223] Então, 100 µL de uma solução de reação que contém o oligoRNA de fita dupla resultante (mistura líquida equimolar de fitas 1 e 2; com cada fita na concentração final de 10 µM, 40 µM ou 100 µM) e 0,4 U/µl de T4 RNA ligase 2 (New England Biolabs) em um tampão (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, DTT 1 mM, ATP 400 µM, em pH 7,5 (25°C)) suprido

com T4 RNA ligase 2 foi incubado e ligado a 25°C ou 37°C. A quantidade de enzima (T4 RNA ligase 2) usada nessa reação de ligação foi de 40 U/nmol de oligoRNA, 10 U/nmol de oligoRNA ou 4 U/nmol de oligoRNA. Durante a reação de ligação, 20 a 25 µl de uma amostra foram tomados após 0,5 hora, 2 horas, 4 horas ou 24 horas e, então, aquecidos a 85°C por 20 minutos para inativação da enzima. A solução de reação inativada por calor foi analisada por PAGE desnaturada e UHPLC, seguido do cálculo da eficiência de ligação (FLP (%)). As condições para a PAGE desnaturada e UHPLC e como calcular o FLP (%) foram as mesmas que no Exemplo 2.

[00224] Os resultados mostraram que no caso do uso de cada oligoRNA em uma concentração de 10 µM ou 40 µM, a eficiência de ligação não variou significativamente dependendo da temperatura de reação e do tempo de reação e foi muito alta em ambos os casos. Quando o oligoRNA foi usado a uma concentração de 100 µM, uma eficiência de ligação foi diminuída em comparação com o caso do uso de 10 µM ou 40 µM. À medida que o tempo de reação se tornou mais longo, a eficiência de ligação foi aumentada quando o oligoRNA foi usado a uma concentração de 100 µM. Além disso, a eficiência de ligação após 4 horas no caso em que o oligoRNA a uma concentração de 100 µM foi incubado a 25°C foi maior que no caso de ser incubado a 37°C.

[00225] A Figura 5 mostra os resultados de 016. Além disso, a Figura 6 mostra os resultados da reação de ligação a uma concentração de 100 µM de oligoRNA (A: 25°C, B: 37°C. A eficiência de ligação de 011 ou 016 foi particularmente alta.

[EXEMPLO 5] EXAME DO MÉTODO DE LIGAÇÃO (CONCENTRAÇÃO DE ATP)

[00226] O oligoRNA de fita dupla de 011 (mistura líquida equimolar) preparado conforme descrito no Exemplo 4 foi usado para examinar a concentração de ATP da solução de reação de ligação. ATP foi adicionado ao

tampão (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, DTT 1 mM, ATP 400 µM, pH 7,5 (a 25°C)) suprido com T4 RNA ligase 2 (New England Biolabs) para ter uma concentração de ATP de 0,4 mM (sem adição), 1 mM, 2 mM, 5 mM ou 10 mM. Então, 25 µl de uma solução de reação que contém o oligoRNA de fita dupla (com cada fita na concentração final de 10 µM, 20 µM ou 40 µM) e T4 RNA ligase 2 no tampão preparado acima foram incubados e ligados a 37°C por 30 min. Após a reação de ligação, a enzima foi inativada por meio do aquecimento a 85°C por 20 min. A solução de reação resultante foi analisada por PAGE desnaturada e UHPLC, seguido do cálculo da eficiência de ligação (FLP (%)). As condições para a PAGE desnaturada e UHPLC e como calcular o FLP (%) foram as mesmas que no Exemplo 2.

[00227] A Figura 7 mostra os resultados da PAGE desnaturada e a Figura 8 mostra o FLP (%) provido a uma concentração de 40 µM de oligoRNA. À medida que a concentração de ATP aumentou, a reação de ligação foi adicionalmente inibida.

[EXEMPLO 6] EXAME DO MÉTODO DE LIGAÇÃO (pH)

[00228] O oligoRNA de fita dupla de 016 (mistura líquida equimolar) preparado conforme descrito no Exemplo 4 foi usado para examinar uma condição de pH na solução de reação de ligação. Os três tampões a seguir foram usados:

(1) Tris-HCl 50 mM (pH 7,0), MgCl₂ 2 mM, ditioneitol 1 mM (DTT), ATP 400 µM;

(2) Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), MgCl₂ 2 mM, DTT 1 mM, ATP 400 µM;

(1) Tris acetato 50 mM (pH 6,5), MgCl₂ 2 mM, DTT 1 mM, ATP 400 µM.

[00229] Então, 30 µl de uma solução de reação que contém o oligoRNA de fita dupla de 016 (com cada fita na concentração final de 10 µM, 100 µM ou 200 µM) e T4 RNA ligase 2 (na concentração final de 0,4

U/ μ l) em um dos tampões acima foram incubados e ligados a 25°C por 30 minutos, 4 horas ou 24 horas. Após a reação de ligação, a enzima foi inativada por meio do aquecimento a 85°C por 20 min. A solução de reação resultante foi analisada por PAGE desnaturada e UHPLC, seguido do cálculo da eficiência de ligação (FLP (%)). As condições para a PAGE desnaturada e UHPLC e como calcular o FLP (%) foram as mesmas que no Exemplo 2.

[00230] A Figura 9 mostra os resultados. Na solução de reação em pH 7,5, a eficiência de ligação de 95% ou maior foi exibida após a reação por 24 horas, mesmo que a solução de reação contenha o oligoRNA a uma alta concentração.

[EXEMPLO 7] EXAME DO MÉTODO DE LIGAÇÃO (pH 8,0 OU MAIOR)

[00231] O oligoRNA de fita dupla de 016 (mistura líquida equimolar) preparado conforme descrito no Exemplo 4 foi usado para examinar adicionalmente uma condição de pH na solução de reação de ligação. Os quatro tampões a seguir foram usados:

(1) Tris-HCl 50 mM (pH 7,0), MgCl₂ 2 mM, DTT 1 mM, ATP 400 μ M;

(2) Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), MgCl₂ 2 mM, DTT 1 mM, ATP 400 μ M;

(3) Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), MgCl₂ 2 mM, DTT 1 mM, ATP 400 μ M; e

(4) Tris-HCl 50 mM (pH 8,5), MgCl₂ 2 mM, DTT 1 mM, ATP 400 μ M.

[00232] Então, 30 μ l de uma solução de reação que contém o oligoRNA de fita dupla de 016 (com cada fita na concentração final de 10 μ M ou 200 μ M) e T4 RNA ligase 2 (na concentração final de 0,4 U/ μ l) em um dos tampões acima foram incubados e ligados a 25°C por 30 minutos, 4 horas ou 24 horas. Após a reação de ligação, a enzima foi inativada por meio do

aquecimento a 85°C por 20 min. A solução de reação resultante foi analisada por PAGE desnaturada e UHPLC, seguido do cálculo da eficiência de ligação (FLP (%)). As condições para a PAGE desnaturada e UHPLC e como calcular o FLP (%) foram as mesmas que no Exemplo 2. A Figura 10 mostra os resultados. As soluções de reação em pH 7,5 ou maior tiveram uma alta eficiência de ligação.

[EXEMPLO 8] EXAME DO MÉTODO DE LIGAÇÃO (CONCENTRAÇÃO DE ÍON DIVALENTE)

[00233] O oligoRNA de fita dupla de 016 (mistura líquida equimolar) preparado conforme descrito no Exemplo 4 foi usado para examinar a concentração de MgCl₂ na solução de reação de ligação. Os cinco tampões a seguir foram usados:

(1) MgCl₂ 0,5 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), DTT 1 mM, ATP 400 µM;

(2) MgCl₂ 1 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), DTT 1 mM, ATP 400 µM;

(3) MgCl₂ 2 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), DTT 1 mM, ATP 400 µM;

(4) MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), DTT 1 mM, ATP 400 µM; e

(5) MgCl₂ 10 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), DTT 1 mM, ATP 400 µM.

[00234] Então, 30 µl de uma solução de reação que contém o oligoRNA de fita dupla de 016 (com cada fita na concentração final de 10 µM, 100 µM ou 200 µM) e T4 RNA ligase 2 (na concentração final de 0,4 U/µl) em um dos tampões acima foram incubados e ligados a 25°C por 30 minutos, 4 horas ou 24 horas. Após a reação de ligação, a enzima foi inativada por meio do aquecimento a 85°C por 20 min. A solução de reação resultante foi analisada por PAGE desnaturada e UHPLC, seguido do cálculo

da eficiência de ligação (FLP (%)). As condições para a PAGE desnaturada e UHPLC e como calcular o FLP (%) foram as mesmas que no Exemplo 2.

[00235] A Figura 11 mostra os resultados (A: 10 μM ou 100 μM de oligoRNA; B: 10 μM ou 200 μM de oligoRNA). Quando o oligoRNA de fita dupla foi usado a uma concentração de 100 μM , a reação a uma concentração de MgCl_2 de 2 mM ou maior por 4 horas ou mais exibiu uma eficiência de ligação de 95% ou maior. Quando a concentração de oligoRNA foi de 200 μM , a reação a uma concentração de MgCl_2 de 2 mM ou mais por 24 horas ou mais exibiu uma eficiência de ligação de 95% ou mais e a uma concentração de MgCl_2 de 5 mM, a eficiência de ligação após 4 horas foi mostrada como aumentando muito rapidamente. Esses resultados indicaram que no caso do uso de um oligoRNA a uma concentração maior, um aumento adequado na concentração de MgCl_2 pode fazer com que a reação de ligação prossiga rapidamente.

[EXEMPLO 9] EXAME DO MÉTODO DE LIGAÇÃO ENZIMÁTICA (CONCENTRAÇÃO DE ÍON DIVALENTE E pH)

[00236] O oligoRNA de fita dupla de 016 (mistura líquida equimolar) preparado conforme descrito no Exemplo 4 foi usado para examinar uma concentração de íon divalente na solução de reação de ligação. Os seis tampões a seguir foram usados:

(1) Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), DTT 1 mM, ATP 400 μM , MgCl_2 2 mM, 5 mM ou 10 mM; e

(2) Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), DTT 1 mM, ATP 400 μM , MgCl_2 2 mM, 5 mM ou 10 mM.

[00237] Então, 30 μl de uma solução de reação que contém o oligoRNA de fita dupla de 016 (com cada fita na concentração final de 10 μM ou 200 μM) e T4 RNA ligase 2 (na concentração final de 0,4 U/ μl) em um dos tampões acima foram incubados e ligados a 25°C por 30 minutos, 4 horas ou 24 horas. Após a reação de ligação, a enzima foi inativada por meio do

aquecimento a 85°C por 20 min. A solução de reação resultante foi analisada por PAGE desnaturada e UHPLC, seguido do cálculo da eficiência de ligação (FLP (%)). As condições para a PAGE desnaturada e UHPLC e como calcular o FLP (%) foram as mesmas que no Exemplo 2.

[00238] A Figura 12 mostra os resultados (A: pH 7,5, B: pH 8,0). Em cada um dentre o pH 7,5 ou pH 8,0, o aumento mais rápido na eficiência de ligação foi encontrado no caso do uso de MgCl₂ 5 mM, no momento após 4 horas.

[EXEMPLO 10] EXAME DO MÉTODO DE LIGAÇÃO ENZIMÁTICA (ADIÇÃO DE PEG)

[00239] O oligoRNA de fita dupla de 018 (mistura líquida equimolar) preparado conforme descrito no Exemplo 4 foi usado para examinar como a adição de PEG à solução de reação de ligação afetou a eficiência de ligação.

[00240] Então, 30 µl de uma solução de reação que contém 0.4 U/µl ou 0,2 U/µl de T4 RNA ligase 2 e o oligoRNA de fita dupla (com cada fita na concentração final de 200 µM) em um tampão (PEG8000 a 5, 10 ou 15% (p/v), Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), MgCl₂ 2 mM, DTT 1 mM, ATP 400 µM) foram incubados e ligados a 25°C por 30 minutos, 4 horas ou 24 horas. A quantidade de enzima (T4 RNA ligase 2) usada nessa reação de ligação foi de 2 U/nmol de oligoRNA ou 1 U/nmol oligoRNA, que foi 1/20 ou 1/40, respectivamente, da quantidade de enzima usada no Exemplo 4. Após a reação de ligação, a enzima foi inativada por meio do aquecimento a 85°C por 20 min. A solução de reação inativada por calor foi analisada por PAGE desnaturada e UHPLC, seguido do cálculo da eficiência de ligação (FLP (%)). As condições para a PAGE desnaturada e UHPLC e como calcular o FLP (%) foram as mesmas que no Exemplo 2.

[00241] A Figura 13 mostra os resultados. Foi mostrado que a adição de PEG causou um aumento na eficiência de ligação.

[EXEMPLO 11] ANÁLISE DE CURSO DO TEMPO DE REAÇÃO NO

MÉTODO DE LIGAÇÃO ENZIMÁTICA

[00242] O oligoRNA de fita dupla de 016 (mistura líquida equimolar) preparado conforme descrito no Exemplo 4 foi usado para examinar um curso do tempo da reação de ligação.

[00243] 80 µl de uma solução de reação que contém o oligoRNA de fita dupla (cada fita na concentração final de 100 µM ou 200 µM) e 0,4 U/µl de T4 RNA ligase 2 em um tampão (Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, ATP 400 µM) foi incubado e ligado a 25°C. As amostras foram tomadas do mesmo durante a reação de ligação, após 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 15, 18 e 24 horas a partir do início. Depois que a enzima foi inativada por meio do aquecimento a 85°C por 20 min, a análise de UHPLC foi conduzida, seguido do cálculo do FLP %. As condições para a UHPLC e como calcular o FLP (%) foram as mesmas que no Exemplo 2.

[00244] A Figura 14 mostra os resultados. A reação de ligação quase alcançou um platô em 6 horas após o início da reação quando a concentração de oligoRNA foi de 100 µM e em 9 horas após o início da reação no caso de 200 µM.

[EXEMPLO 12] ADIÇÃO SUPLEMENTAR DE OLIGORNA EM MÉTODO DE LIGAÇÃO ENZIMÁTICA

[00245] O oligoRNA de fita dupla de 016 (mistura líquida equimolar) preparado conforme no Exemplo 4 foi usado para examinar como aumentar o rendimento de uma molécula de ssTbRNA adicionando sequencialmente moléculas de oligoRNA de fita simples das fitas 1 e 2 a uma fase de reação de ligação.

[00246] Primeiramente, uma solução de reação de ligação que contém um oligoRNA de fita dupla na concentração final de 100 µM de cada fita foi usada para o exame. 100 µl de uma solução de reação que contém o oligoRNA de fita dupla (na concentração final de 100 µM; a quantidade total de oligoRNA em 100 µl da solução de reação foi de 10 nmol para cada uma

dentre a fita 1 e a fita 2) e T4 RNA ligase 2 (0,4 U/ μ l; 4 U/nmol de oligoRNA) em um tampão (Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, ATP 400 μ M) foi dividido em 4 tubos. Então, a reação de ligação foi iniciada por meio da incubação a 25°C.

[00247] Doze horas após o início da reação de ligação, o oligoRNA de fita dupla de 016 (mistura líquida equimolar das fitas 1 e 2 de 016 em um tampão de reação (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, ATP 400 μ M (pH 8,0))) foi adicionado aos três tubos em uma quantidade incluindo cada fita de 10 nmol (11,1 μ l) e a incubação foi continuada. A concentração de oligoRNA na solução de reação após a adição de oligoRNA foi de 180 μ M (em uma concentração de cada fita), e a quantidade de enzima (T4 RNA ligase 2) foi de 0,36 U/ μ l (2 U/nmol de oligoRNA).

[00248] Doze horas após a adição de oligoRNA, 2 dos 3 tubos que receberam a adição de oligoRNA, foram ainda adicionados com o oligoRNA de fita dupla de 016 (a mesma mistura líquida equimolar conforme acima) em uma quantidade de 10 nmol de cada fita (11,1 μ l), e a incubação foi continuada. A concentração de oligoRNA na solução de reação após a segunda adição de oligoRNA foi de 245 μ M (cada concentração de fita), e a quantidade de enzima (T4 RNA ligase 2) foi de 0,33 U/ μ l (1,33 U/nmol de oligoRNA).

[00249] Doze horas depois disso, 1 dos 2 tubos que recebeu a adição de oligoRNA duas vezes, foi ainda adicionado com o oligoRNA de fita dupla de 016 (a mesma mistura líquida equimolar conforme acima) em uma quantidade de 10 nmol de cada fita (11,1 μ l), e os tubos foram incubados por mais 12 horas. A concentração de oligoRNA na solução de reação após a terceira adição de oligoRNA foi de 300 μ M (cada concentração de fita), e a quantidade de enzima (T4 RNA ligase 2) foi de 0,3 U/ μ l (1 U/nmol de oligoRNA).

[00250] A solução de reação foi amostrada a partir de cada tubo a cada

12 horas, e a enzima foi inativada por meio do aquecimento das amostras a 85°C por 20 min. As amostras pós-reação resultantes foram conforme exposto a seguir. O tempo de reação se refere a um tempo a partir do início da reação de ligação.

[00251] Tubo 1) oligoRNA 100 µM (total de 10 nmol para cada fita; sem adição), a quantidade de enzima de 0,4 U/µl, a temperatura de reação de 25°C, o tempo de reação de 12, 24, 36 ou 48 horas;

tubo 2) oligoRNA 180 µM (total de 20 nmol para cada fita; adicionado uma vez), a quantidade de enzima de 0,36 U/µl, a temperatura de reação de 25°C, o tempo de reação de 24, 36 ou 48 horas;

tubo 3) oligoRNA 245 µM (total de 30 nmol para cada fita; adicionado duas vezes), a quantidade de enzima de 0,33 U/µl, a temperatura de reação de 25°C, o tempo de reação de 36 ou 48 horas; ou

tubo 4) oligoRNA 300 µM (total de 40 nmol para cada fita; adicionado três vezes), a quantidade de enzima de 0,3 U/µl, a temperatura de reação de 25°C, o tempo de reação de 48 horas.

[00252] Cada amostra foi analisada por UHPLC, seguido do cálculo do FLP %. As condições para a UHPLC e como calcular o FLP (%) foram as mesmas que no Exemplo 2. A Tabela 3 mostra os resultados.

TABELA 3

	FLP (%)			
	Nenhuma adição	Adicionado uma vez	Adicionado duas vezes	Adicionado três vezes
Após 12 horas	94,48	94,48	94,48	94,48
Após 24 horas	94,76	93,75	93,75	93,75
Após 36 horas	94,29	93,77	92,82	92,82
Após 48 horas	94,91	93,88	92,80	75,89

[00253] Adicionalmente, para cada amostra, a quantidade de produção (nmol) do produto de interesse (molécula de ssTbRNA) foi estimada a partir do FLP % e da quantidade de moléculas de oligoRNA de fita simples adicionadas. A Figura 15 mostra os resultados.

[00254] Uma solução de reação de ligação que contém um oligoRNA de fita dupla na concentração final de 200 µM de cada fita foi usada para um

exame similar.

[00255] Em seguida, 100 µl de uma solução de reação que contém o oligoRNA de fita dupla (na concentração final de 200 µM; a quantidade de oligoRNA total de cada uma dentre a fita 1 ou a fita 2 nos 100 µl da solução de reação foi de 20 nmol) e T4 RNA ligase 2 (0,4 U/µl; 4 U/nmol de oligoRNA) em um tampão (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, ATP 400 µM (pH 8,0)) foram divididos em 4 tubos. Então, a reação de ligação foi iniciada por meio da incubação a 25°C. Doze horas depois disso, o oligoRNA de fita dupla de 016 (mistura líquida equimolar das fitas 1 e 2 de 016 em um tampão de reação (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, ATP 400 µM (pH 8,0))) foi adicionado aos 3 tubos em uma quantidade de 20 nmol de cada fita (22,2 µl) e a incubação foi continuada. Posteriormente, conforme com o caso do uso do oligoRNA na concentração final de 100 µM, o oligoRNA foi adicionado a cada 12 horas três vezes, e a reação de ligação foi continuada.

[00256] A solução de reação foi amostrada a partir de cada tubo a cada 12 horas, e a enzima foi inativada por meio do aquecimento a 85°C por 20 min. As amostras pós-reação resultantes foram conforme exposto a seguir. O tempo de reação se refere a um tempo a partir do início da reação de ligação.

[00257] Tubo 1) oligoRNA 200 µM (total de 20 nmol para cada fita; sem adição), a quantidade de enzima de 0,4 U/µl, a temperatura de reação de 25°C, o tempo de reação de 12, 24, 36 ou 48 horas;

tubo 2) oligoRNA 327 µM (total de 40 nmol para cada fita; adicionado uma vez), a quantidade de enzima de 0,36 U/µl, a temperatura de reação de 25°C, o tempo de reação de 24, 36 ou 48 horas;

tubo 3) oligoRNA 415 µM (total de 60 nmol para cada fita; adicionado duas vezes), a quantidade de enzima de 0,33 U/µl, a temperatura de reação de 25°C, o tempo de reação de 36 ou 48 horas; ou

tubo 4) oligoRNA 480 µM (total de 80 nmol para cada fita; adicionado três vezes), a quantidade de enzima de 0,3 U/µl, a temperatura de

reação de 25°C, o tempo de reação de 48 horas.

[00258] Cada amostra foi analisada por UHPLC, seguido do cálculo do FLP %. As condições para a UHPLC e como calcular o FLP (%) foram as mesmas que no Exemplo 2. A Tabela 4 mostra os resultados.

TABELA 4

	FLP (%)			
	Nenhuma adição	Adicionado uma vez	Adicionado duas vezes	Adicionado três vezes
Após 12 horas	92,94	92,94	92,94	92,94
Após 24 horas	93,22	91,48	91,48	91,48
Após 36 horas	93,21	92,26	74,82	74,82
Após 48 horas	93,83	92,04	74,63	56,35

[00259] Adicionalmente, para cada amostra, a quantidade de produção (nmol) do produto de interesse (molécula de ssTbRNA) foi estimada a partir do FLP % e da quantidade de moléculas de oligoRNA de fita simples adicionadas. A Figura 16 mostra os resultados.

[00260] Os resultados acima demonstraram que o método da presente invenção pode aumentar a quantidade de produção de molécula de RNA de fita simples em forma de grampo (no presente documento, uma molécula de ssTbRNA) adicionando sequencialmente o oligoRNA a uma fase de reação de ligação.

[00261] O uso típico de RNA ligase (a quantidade de enzima de 0,4 U/ μ l em relação à quantidade de um oligoRNA de partida de 10 μ M) provê uma eficiência de ligação de mais de 90% de FLP sob substancialmente as mesmas condições de reação de ligação conforme acima. Entretanto, a quantidade de molécula de ssTbRNA produzida por 100 μ l de solução de reação foi menor que 1 nmol. Quando comparado com tais casos típicos, foi mostrado que o método da presente invenção pode reduzir o uso de enzima por quantidade de oligoRNA para 1/30 a 1/40, sob as condições de reação eficazes que exibem o FLP de 90% ou mais.

[EXEMPLO 13] PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS DE RNA DE FITA SIMPLES EM FORMA DE GRAMPO PARA OUTROS GENES ALVOS

[00262] O método no qual dois fragmentos de segmentação, fitas 1 e 2,

foram ligados, conforme descrito nos Exemplos 1 e 2, foi usado para produzir moléculas de RNA de fita simples em forma de grampo que contêm uma sequência de inibição de expressão de gene para o gene GAPDH humano, gene LAMA1 humano ou gene LMNA humano, em vez do gene TGF- β 1 humano. Como um ligante, foi usado um derivado de prolina conforme descrito nos Exemplos 1 e 2 ou um ligante de nucleotídeo.

[00263] A Figura 17 mostra as moléculas de RNA de fita simples em forma grampo e suas posições de segmentação nas moléculas. A sequência de inibição de expressão de gene (sequência antissentido) para o gene, que está compreendida em cada molécula de RNA de fita simples em forma de grampo, está em caixa na Figura 17. A Tabela 5 lista os pares da fita 1 e da fita 2, que são dois fragmentos de segmentação de cada molécula de RNA de fita simples em forma de grampo. Cada par de fita 1 e fita 2 na Tabela 5 tem U-U, A-A, A-U ou U-A como uma combinação de nucleotídeos terminais a serem ligados.

TABELA 5

Par	Fita 1 (5' a 3') (sentido)	Fita 2 (5' a 3') (antissentido)
GAPDH_(1)	CAUGAGAAGUAUGACAACAGCC-P-GGCUGU (SEQ ID NO: 37)	UGUCAUACUUCUCAUGGUUC-P-GAA (SEQ ID NO: 36)
LAMA1_(2)	AGUGUUUGUCUCGUUACAAUAUCC-P-GGAUAUUGUA (SEQ ID NO: 39)	ACGAGACAAACACUCC-P-G (SEQ ID NO: 38)
LAMA1_(3)	AGUGUUUGUCUCGUUACAAUAUCC-P-GGAU (SEQ ID NO: 41)	AUUGUAACGAGACAAACACUCC-P-G (SEQ ID NO: 40)
LAMA1_(4)	AGUGUUUGUCUCGUUACAAUAUCCCACACCGGAU (SEQ ID NO: 43)	UUGUAACGAGACAAACACUCCUUCGG (SEQ ID NO: 42)
LAMA1_(5)	AGUGUUUGUCUCGUUACAAUAUCCCACACCGGAU (SEQ ID NO: 45)	AUUGUAACGAGACAAACACUCCUUCGG (SEQ ID NO: 44)
LMNA_(6)	AGCGUCACCAAAAAGCGCAAUCC-P-GGAU (SEQ ID NO: 47)	UGCUCUUUUGGUGACGCUUC-P-G (SEQ ID NO: 46)
LMNA_(7)	AGCGUCACCAAAAAGCGCAAUCC-P-GGA (SEQ ID NO: 49)	AUUGCUCUUUUGGUGACGCUUC-P-G (SEQ ID NO: 48)

P: Derivado de prolina

[00264] Um método similar àquele descrito no Exemplo 1 foi usado para sintetizar moléculas de oligoRNA de fita simples das fitas 1 e 2, em que cada uma contém um derivado de prolina. Uma síntese de fase sólida com o uso de um método de fosforamidita foi usada para sintetizar moléculas de oligoRNA de fita simples das fitas 1 e 2, sendo que cada uma contém um

ligante de nucleotídeo em vez de um derivado de prolina.

[00265] As fitas 1 e 2 de cada par (Tabela 5) foram aneladas entre si para preparar um oligoRNA de fita dupla, conforme descrito no Exemplo 2. O oligoRNA de fita dupla resultante (com fita 1 e fita 2 na concentração final de 10 μ M) foi compreendido em um tampão (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, ditioneitol 1 mM (DTT), adenosina trifosfato 400 μ M (ATP)) para preparar uma solução de reação (pH 7,5, a 25°C). Então, 2 μ l de 10 U/ μ l de T4 RNA ligase 2 (New England Biolabs) (40 U/nmol de oligoRNA) foram adicionados para ter um volume de solução de reação de 50 μ l. Essa solução de reação foi incubada a 37°C durante 30 min.

[00266] Após a reação enzimática, a eficiência de ligação na solução de reação foi determinada com cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) e eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturada (PAGE desnaturada). As condições para a UHPLC após a ligação e como calcular a eficiência de ligação (FLP (%)) foram as mesmas que no Exemplo 2.

[00267] Cada produto de ligação foi analisado por LC-MS para confirmar um peso molecular previsto. O aparelho LC e o equipamento MS usados para a análise LC-MS foram iguais àqueles usados no Exemplo 2.

[00268] A Figura 18 mostra os resultados. Qualquer um dos pares de fitas 1 e 2 na Tabela 5 exibiu uma alta eficiência de ligação.

[EXEMPLO COMPARATIVO]

[00269] Em paralelo aos experimentos no Exemplo 2, o oligoRNA de fita dupla, em que as fitas 1 e 2 indicadas na Tabela 1 foram aneladas entre si, foi ligado com o uso de T4 RNA ligase, em vez de T4 RNA ligase 2, e sua eficiência de ligação foi determinada.

[00270] As fitas 1 e 2 de cada um dos pares (Tabela 1) foram aneladas para produzir um oligoRNA de fita dupla, conforme descrito no Exemplo 2. O oligoRNA de fita dupla resultante (com a fita 1 e a fita 2 na concentração final de 10 μ M) foi compreendido em um tampão (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂

10 mM, ditionotreitól 5 mM (DTT), adenosina trifosfato 1 mM (ATP)) para preparar uma solução de reação (pH 7,8). 0,5 µl de 10 U/µl de T4 RNA ligase 2 (Promega) (10 U/nmol de oligoRNA) foi adicionado para ter um volume de solução de reação de 50 µl. Essa solução de reação foi incubada a 37°C durante 30 min.

[00271] Após a reação enzimática, a eficiência de ligação na solução de reação foi determinada por meio de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) e eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturada (PAGE desnaturada). As condições para a UHPLC após a ligação e como calcular a eficiência de ligação (FLP (%)) foram as mesmas que no Exemplo 2.

[00272] A Figura 19 mostra os resultados. A eficiência de ligação no caso do uso de T4 RNA ligase foi consideravelmente menor que aquela no caso do uso de T4 RNA ligase 2 (Figura 3).

APLICABILIDADE INDUSTRIAL

[00273] A invenção possibilita a produção de modo eficaz de uma molécula de RNA de fita simples em forma grampo que contém uma sequência de inibição de expressão de gene alvo, enquanto amídidas de uso geral são usadas e o uso de enzima é reduzido.

TEXTO LIVRE DE LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[00274] SEQ ID NO: 1 a 57: RNA sintético.

[00275] Todas as publicações, patentes e pedidos de patentes citados no presente documento estão aqui incorporados a título de referência, em sua totalidade.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo capaz de inibir a expressão de um gene alvo, sendo que o método é caracterizado pelo fato de que compreende:

uma etapa de anelamento para anelar uma primeira molécula de oligoRNA de fita simples e uma segunda molécula de oligoRNA de fita simples; e

uma etapa de ligação para ligar a extremidade 3' da primeira molécula de oligoRNA de fita simples e a extremidade 5' da segunda molécula de oligoRNA de fita simples por uma ligase da família Rnl2,

em que a primeira molécula de oligoRNA de fita simples compreende uma primeira região de RNA e uma segunda região de RNA que são conectadas através de um primeiro ligante, e uma dentre a primeira região de RNA e a segunda região de RNA é capaz de se ligar de modo complementar à outra,

a segunda molécula de oligoRNA de fita simples compreende uma terceira região de RNA e uma quarta região de RNA que são conectadas através de um segundo ligante, e uma dentre a terceira região de RNA e a quarta região de RNA é capaz de se ligar de modo complementar à outra,

a primeira molécula de oligoRNA de fita simples e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples são capazes de formar uma fita dupla intermolecular entre sequências complementares na extremidade 5' ou extremidade 3' das mesmas,

quando a fita dupla é formada entre a primeira molécula de oligoRNA de fita simples e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples durante a etapa de anelamento, um corte ocorre entre o resíduo de ribonucleotídeo de extremidade 3' da primeira molécula de oligoRNA de fita simples e o resíduo de ribonucleotídeo de extremidade 5' da segunda molécula de oligoRNA de fita simples, e um interstício de pelo menos um

resíduo de ribonucleotídeo está presente entre o resíduo de ribonucleotídeo de extremidade 5' da primeira molécula de oligoRNA de fita simples e o resíduo de ribonucleotídeo de extremidade 3' da segunda molécula de oligoRNA de fita simples, e

uma sequência produzida por meio da ligação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples compreende uma sequência de inibição de expressão de gene para o gene alvo.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a primeira molécula de oligoRNA de fita simples é representada pela seguinte fórmula (I) e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples é representada pela seguinte fórmula (II):

5'-Xs-L_{X1}-Xa-3' --- fórmula (I)

5'-Ya₁-Ya₂-Ya₃-L_{X2}-Ys-3' --- fórmula (II)

em que Xs, Xa, Ya₁, Ya₂, Ya₃, e Ys representam, cada um, um ou mais resíduos de ribonucleotídeo,

L_{X1} e L_{X2} representam o primeiro ligante e o segundo ligante, respectivamente,

Ya₃ é complementar a Ys,

Xa-Ya₁, que é gerado pela etapa de ligação, é complementar a Xs, e

Xa-Ya₁-Ya₂-Ya₃, que é gerado pela etapa de ligação, compreende uma sequência de inibição de expressão de gene para o gene alvo.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a primeira molécula de oligoRNA de fita simples tem uma uracila (U) ou adenina (A) na extremidade 3', e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples tem uma uracila (U) ou adenina (A) na extremidade 5'.

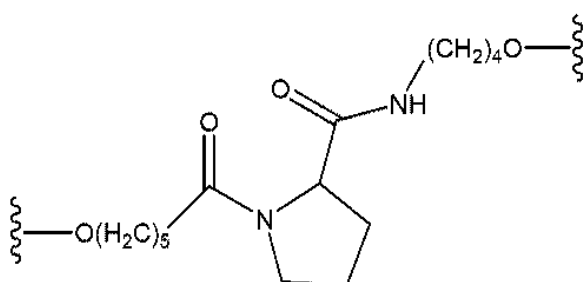
4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o primeiro ligante e o segundo ligante são, cada um, independentemente (i) um ligante de não nucleotídeo que compreende pelo menos um selecionado a partir de uma cadeia principal de pirrolidina e uma cadeia principal de piperidina ou (ii) um ligante de nucleotídeo.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a ligase da família Rnl2 é T4 RNA ligase 2.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a ligação é realizada em uma solução de reação em pH 7,4 a 8,6.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a ligação é realizada em uma solução de reação que compreende íon de metal divalente 2 a 10 mM.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o primeiro ligante e o segundo ligante são, cada um, independentemente um ligante de não nucleotídeo representado pela seguinte fórmula (VI):



Fórmula (VI)

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o gene alvo é o gene TGF- β 1, gene GAPDH, gene LAMA1 ou gene LMNA.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que a molécula de RNA de fita simples em forma de grampo consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ

ID NO: 1, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante e os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 50 e 51 são conectados através do segundo ligante.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que a primeira molécula de oligoRNA de fita simples e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples são qualquer uma dentre as seguintes (1) a (6):

(1) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 7, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante, e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 6, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 10 e 11 são conectados através do segundo ligante;

(2) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste em uma sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 19, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante, e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 18, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 16 e 17 são conectados através do segundo ligante;

(3) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 27, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante, e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 26, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 20 e 21 são conectados através do segundo ligante;

(4) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de

fita simples que consiste em uma sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 29, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante, e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 28, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 21 e 22 são conectados através do segundo ligante;

(5) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste em uma sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 31, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante, e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 30, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 22 e 23 são conectados através do segundo ligante;

(6) uma combinação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste em uma sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 33, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através do primeiro ligante, e da segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 32, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 23 e 24 são conectados através do segundo ligante.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que a dita etapa de ligação compreende, após uma primeira reação de ligação, realizar uma vez ou repetir mais de uma vez uma etapa de reação adicional de adicionar ainda mais a primeira molécula de oligoRNA de fita simples e a segunda molécula de oligoRNA de fita simples para realizar a reação de ligação adicional.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que a dita ligase da família Rnl2 é usada em uma quantidade de 10 unidades ou menos por nmol da primeira molécula de

oligoRNA de fita simples e/ou da segunda molécula de oligoRNA de fita simples.

14. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que Xa tem de 2 a 20 nucleotídeos em comprimento.

15. Molécula de oligoRNA de fita simples, caracterizada pelo fato de que é qualquer uma dentre as seguintes (a) a (l):

(a) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 7, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um ligante;

(b) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 6, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 10 e 11 são conectados através de um ligante;

(c) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 19, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um ligante;

(d) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 18, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 16 e 17 são conectados através de um ligante;

(e) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 27, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um ligante;

(f) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 26, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 20 e 21 são conectados através de um ligante;

(g) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na

sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 29, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um ligante;

(h) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 28, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 21 e 22 são conectados através de um ligante;

(i) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 31, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um ligante;

(j) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 30, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 22 e 23 são conectados através de um ligante;

(k) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 33, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um ligante; e

(l) uma molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 32, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 23 e 24 são conectados através de um ligante.

16. Kit para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo para inibir a expressão de gene TGF- β 1, caracterizado pelo fato de que compreende uma combinação de moléculas de oligoRNA de fita simples de qualquer uma dentre as seguintes (1) a (6):

(1) uma combinação de uma primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ

ID NO: 7, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um primeiro ligante e uma segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 6, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 10 e 11 são conectados através de um segundo ligante;

(2) uma combinação de uma primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 19, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um primeiro ligante e uma segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 18, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 16 e 17 são conectados através de um segundo ligante;

(3) uma combinação de uma primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 27, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um primeiro ligante e uma segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 26, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 20 e 21 são conectados através de um segundo ligante;

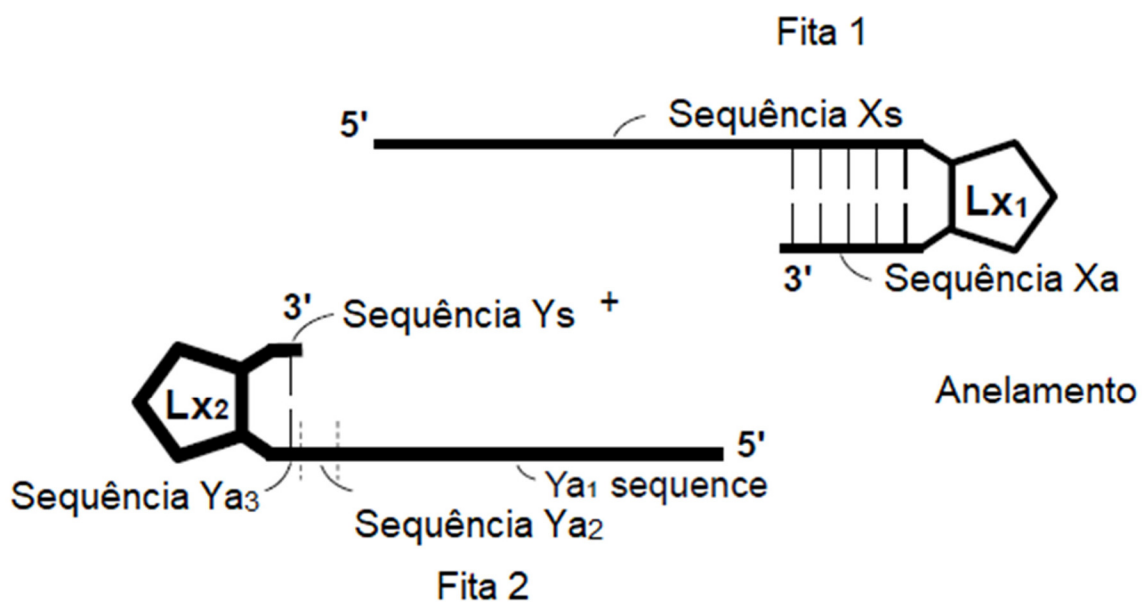
(4) uma combinação de uma primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 29, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um primeiro ligante e uma segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 28, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 21 e 22 são conectados através de um segundo ligante;

(5) uma combinação de uma primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 31, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são

conectados através de um primeiro ligante e uma segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 30, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 22 e 23 são conectados através de um segundo ligante; e

(6) uma combinação de uma primeira molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 33, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 24 e 25 são conectados através de um primeiro ligante e uma segunda molécula de oligoRNA de fita simples que consiste na sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 32, em que os resíduos de ribonucleotídeo nas posições 23 e 24 são conectados através de um segundo ligante.

Fig. 1



↓
Ligação

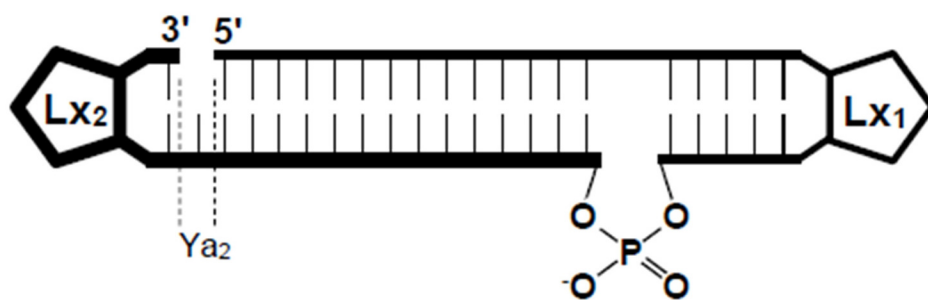
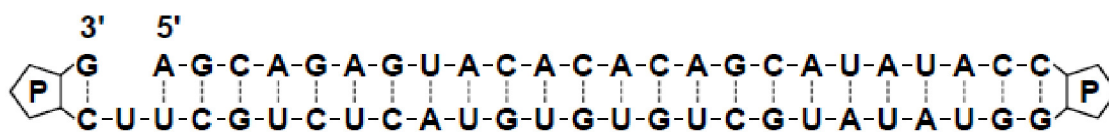


Fig. 2



(SEQ ID NO: 1)

Fig. 3

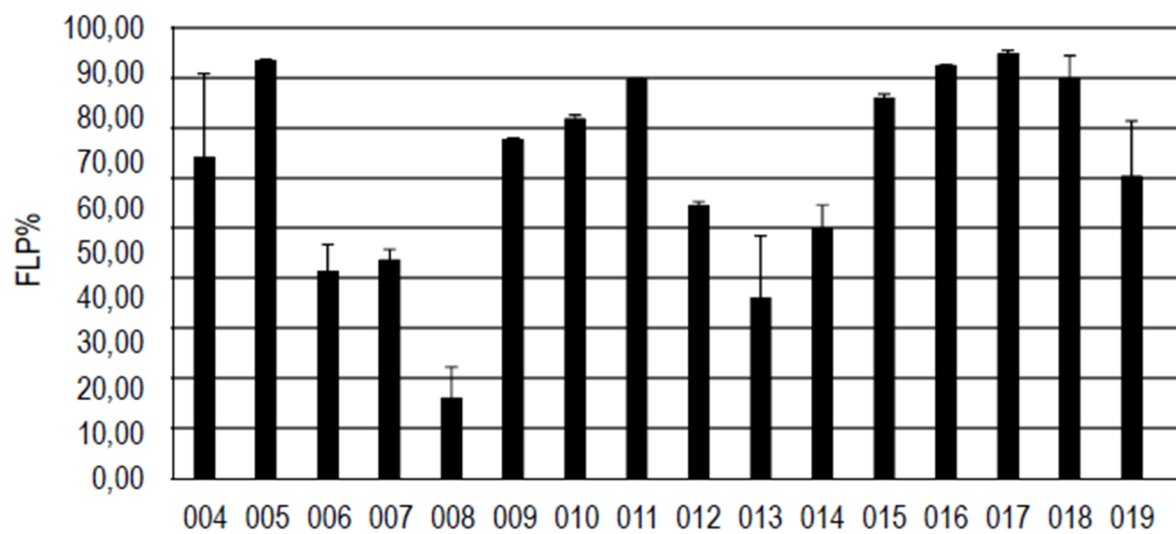


Fig. 4

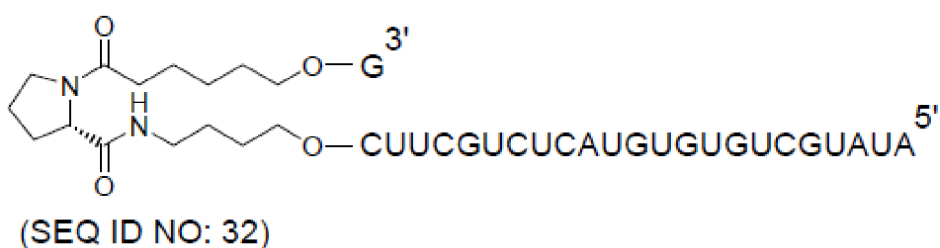
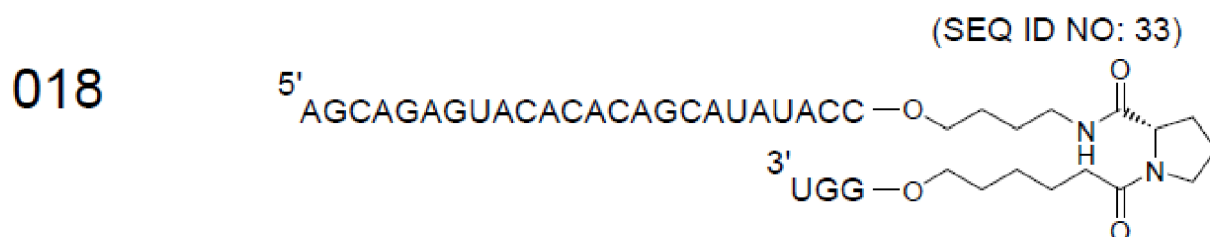
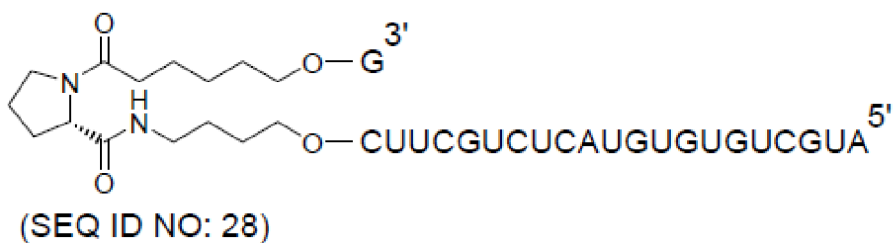
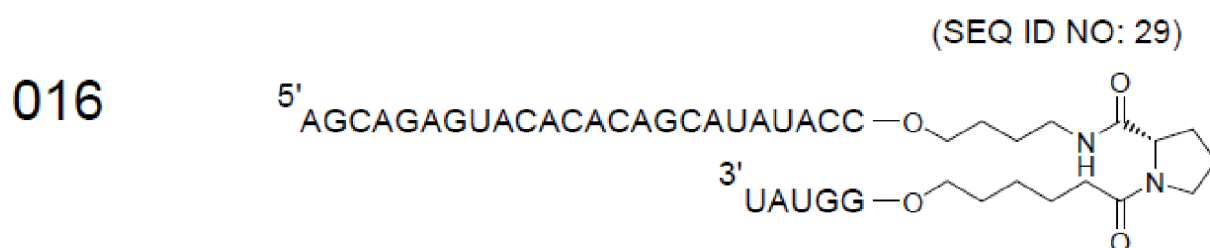
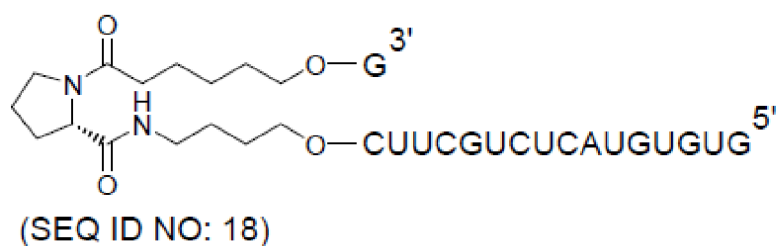
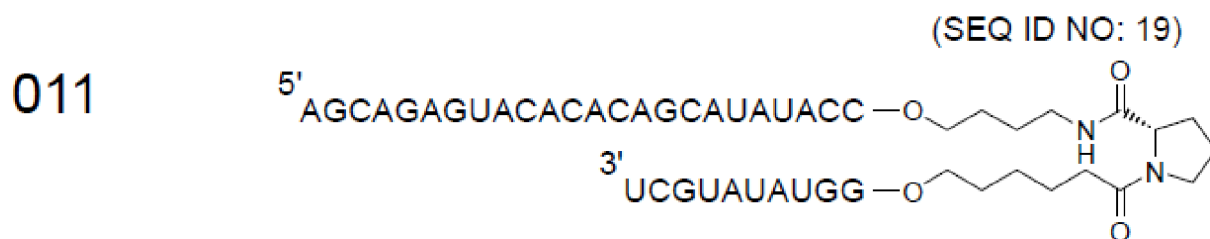


Fig. 5

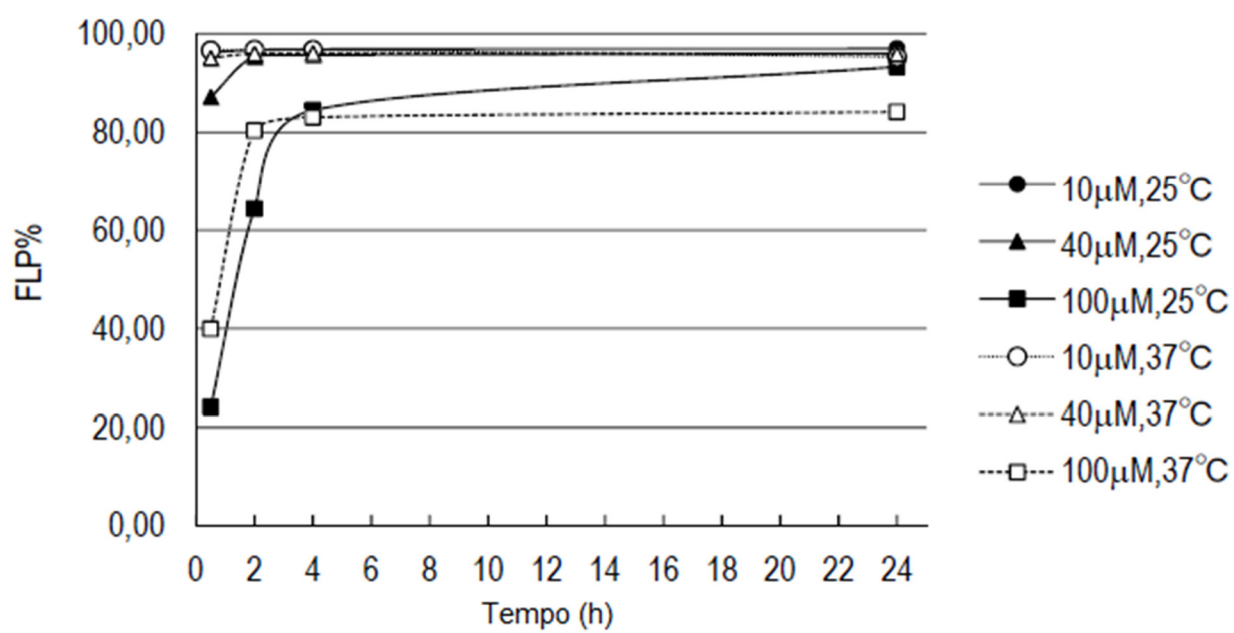


Fig. 6

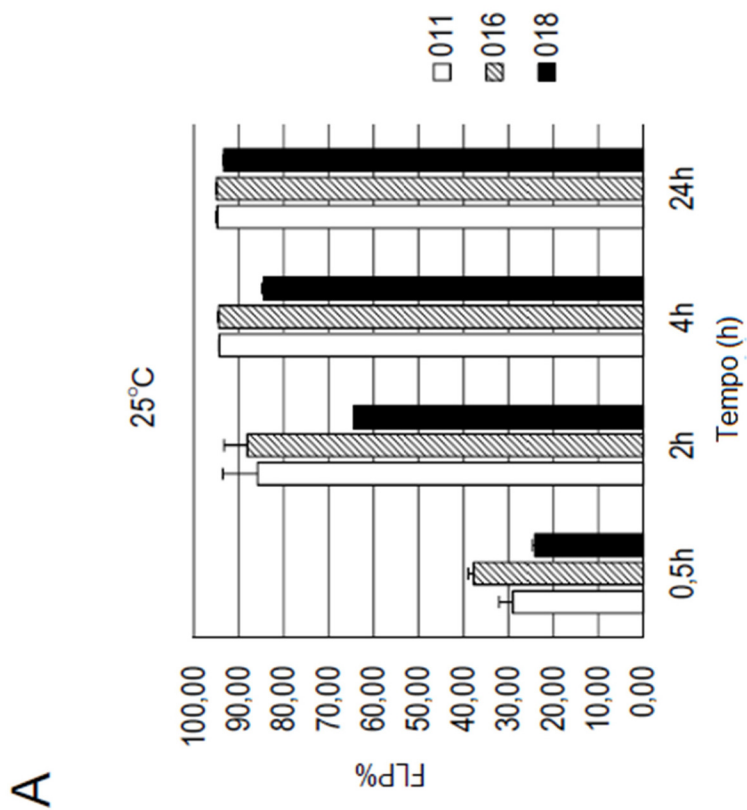
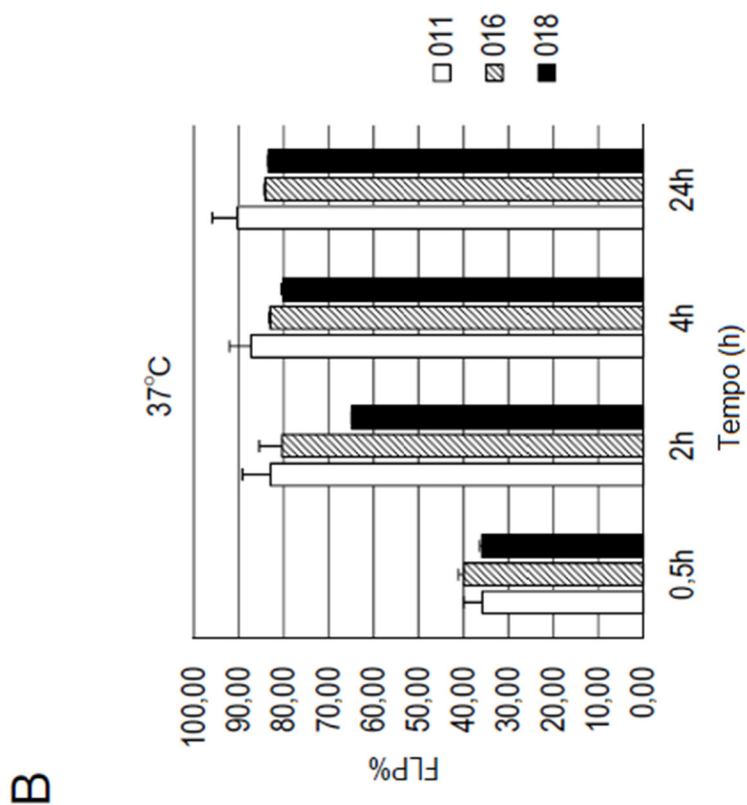


Fig. 7

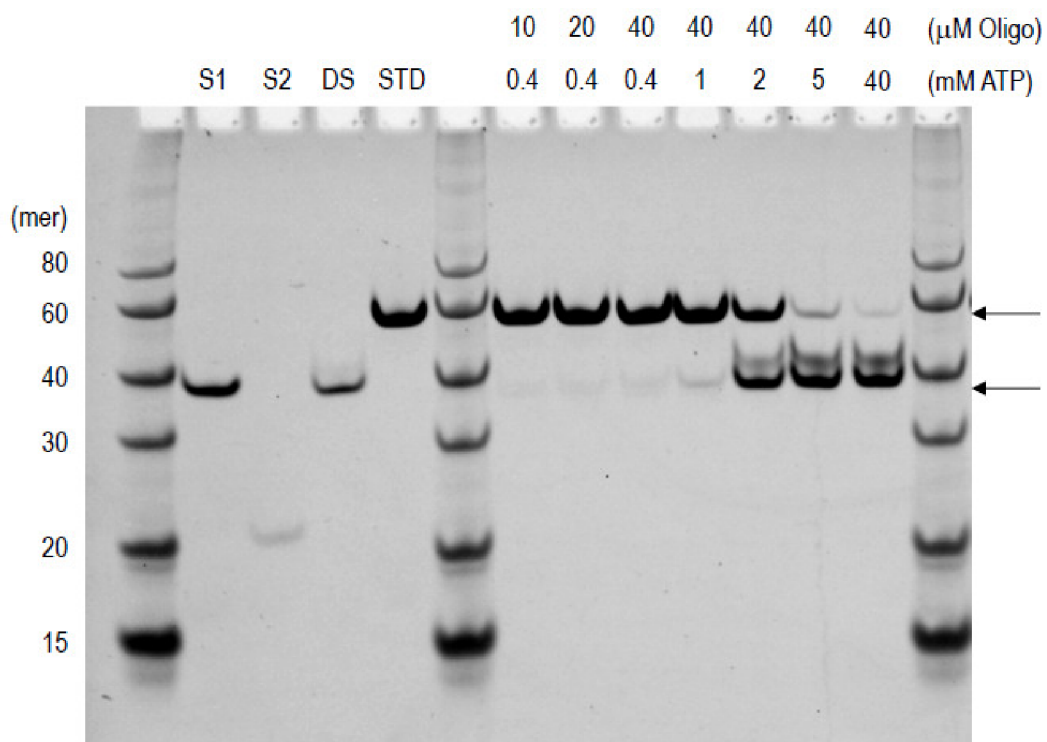


Fig. 8

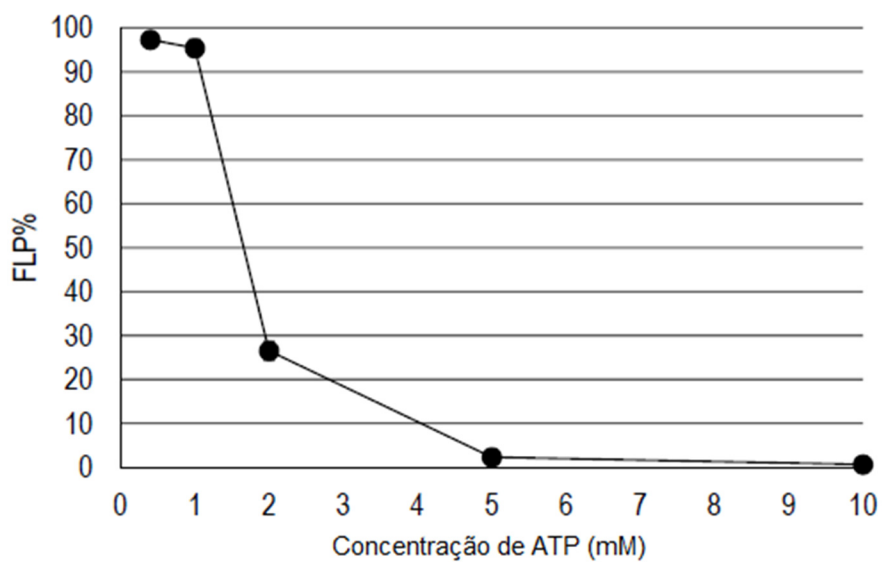


Fig. 9

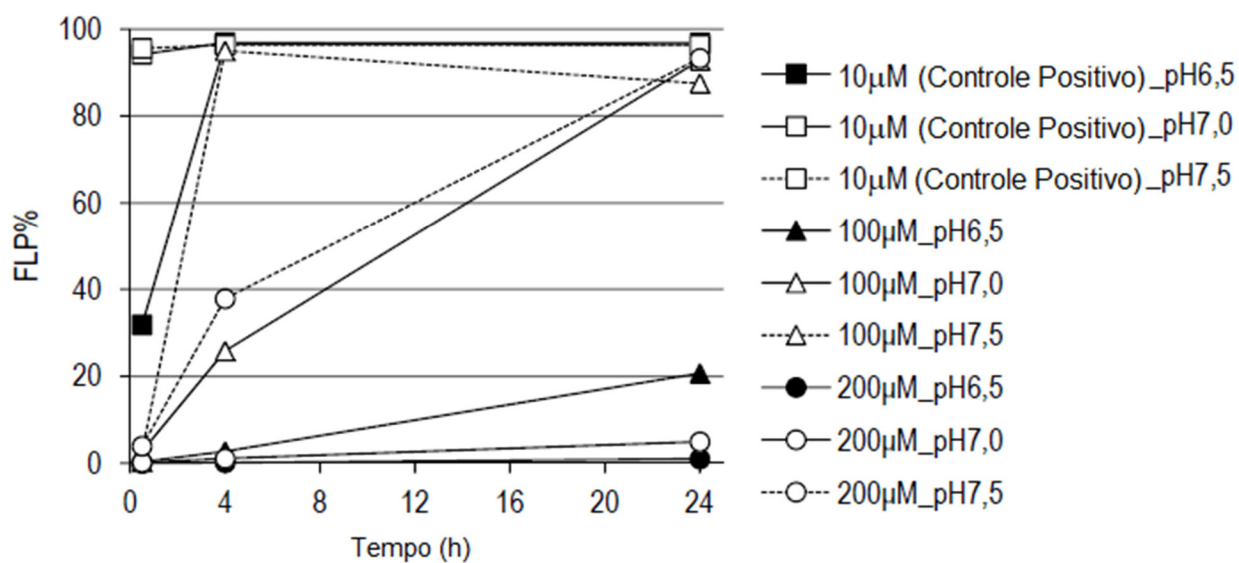


Fig. 10

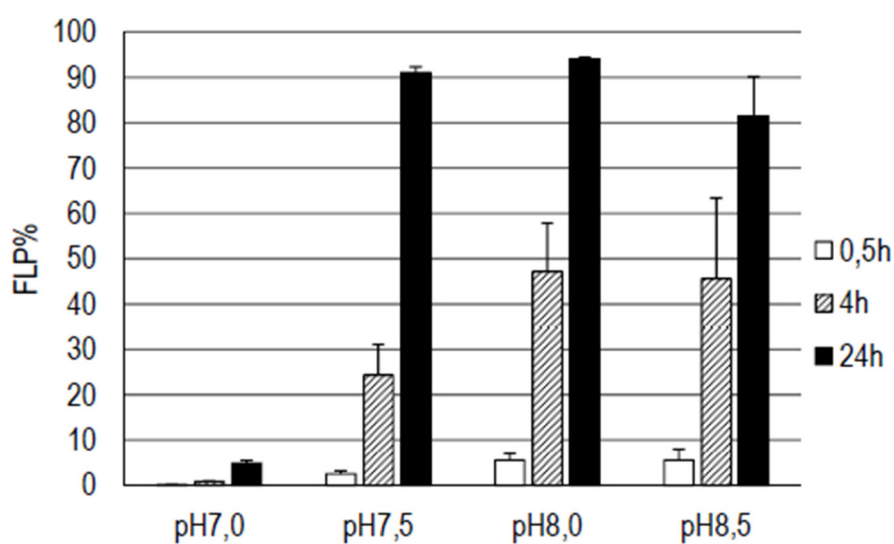


Fig. 11

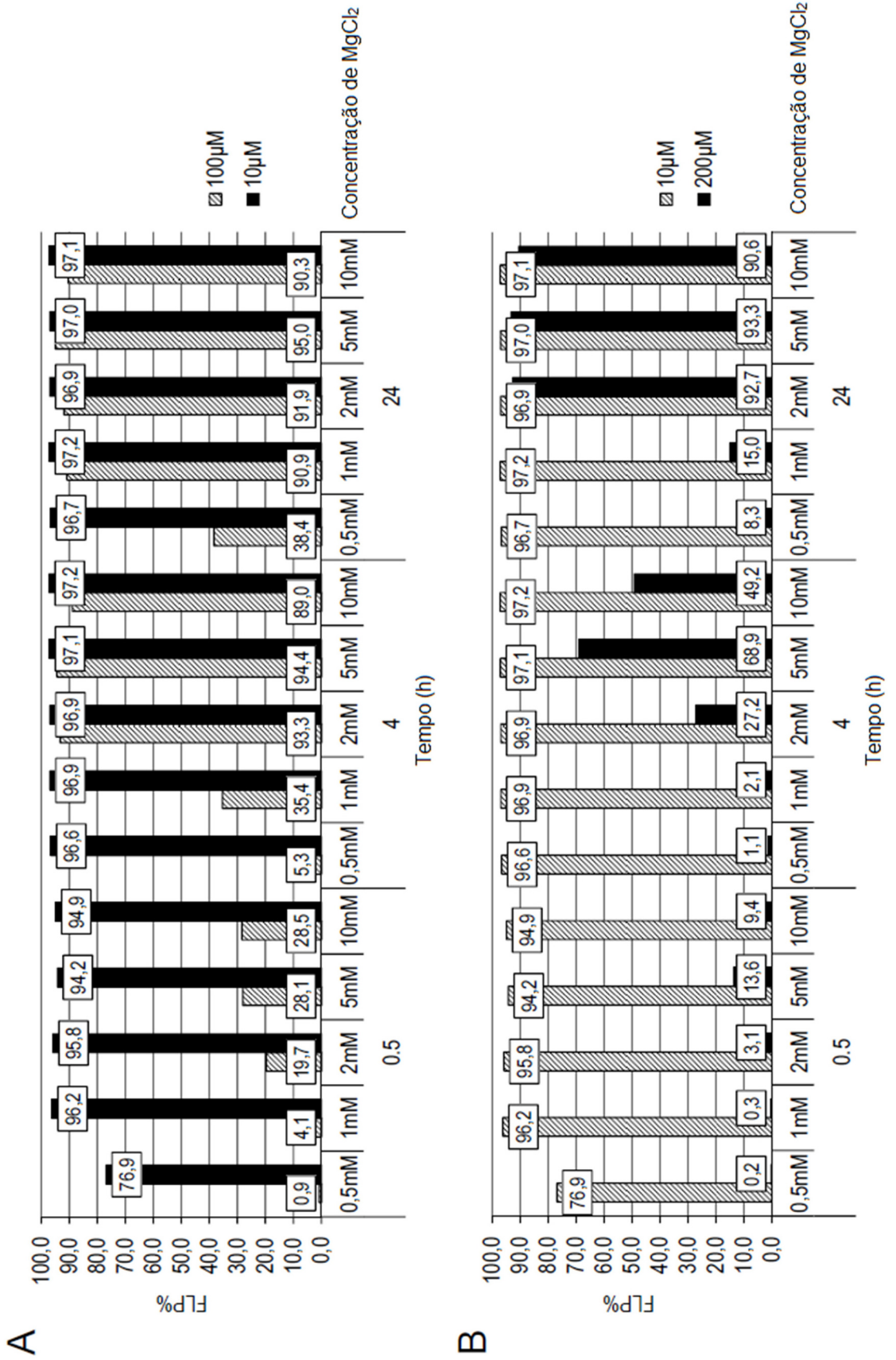


Fig. 12

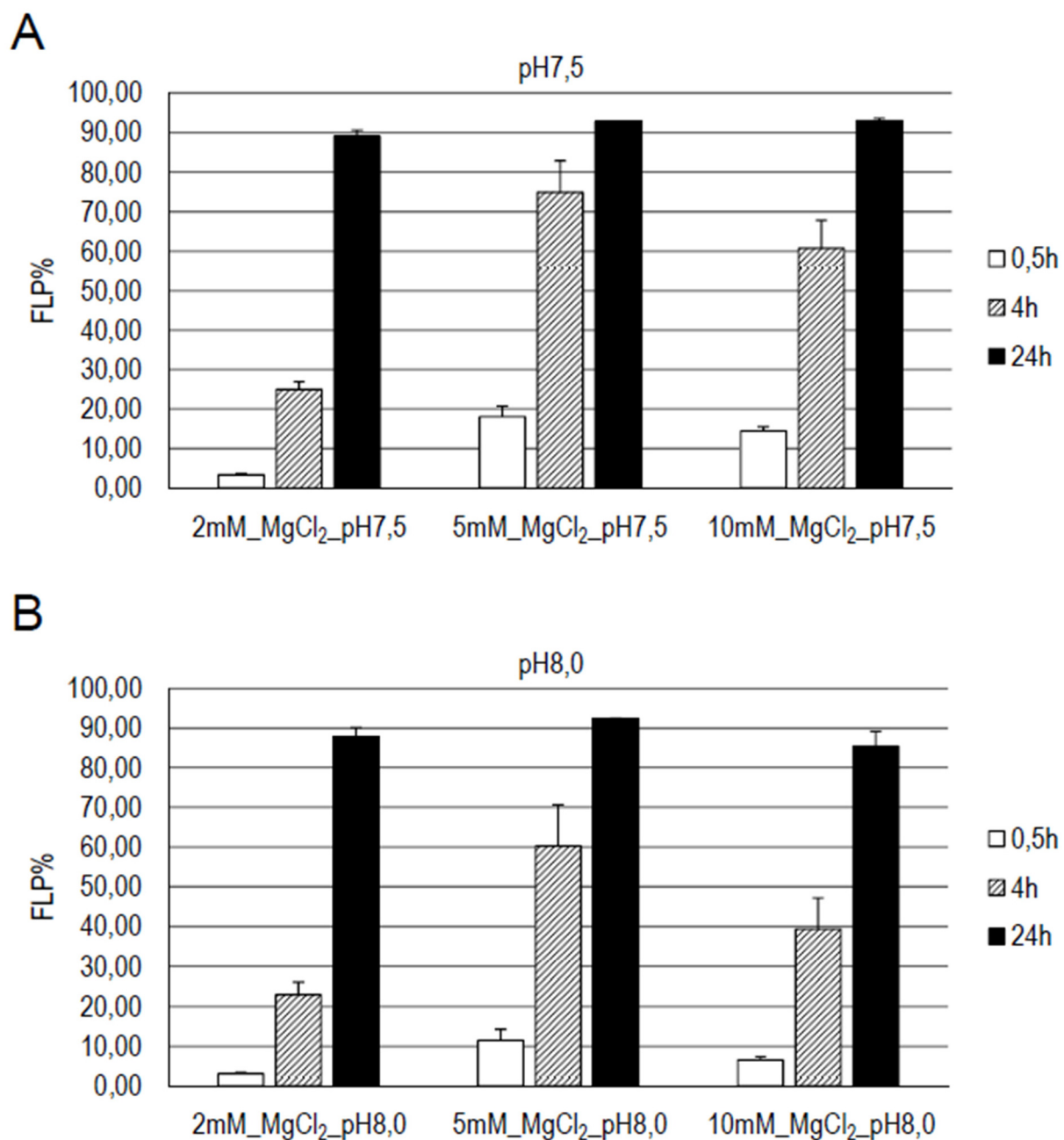


Fig. 13

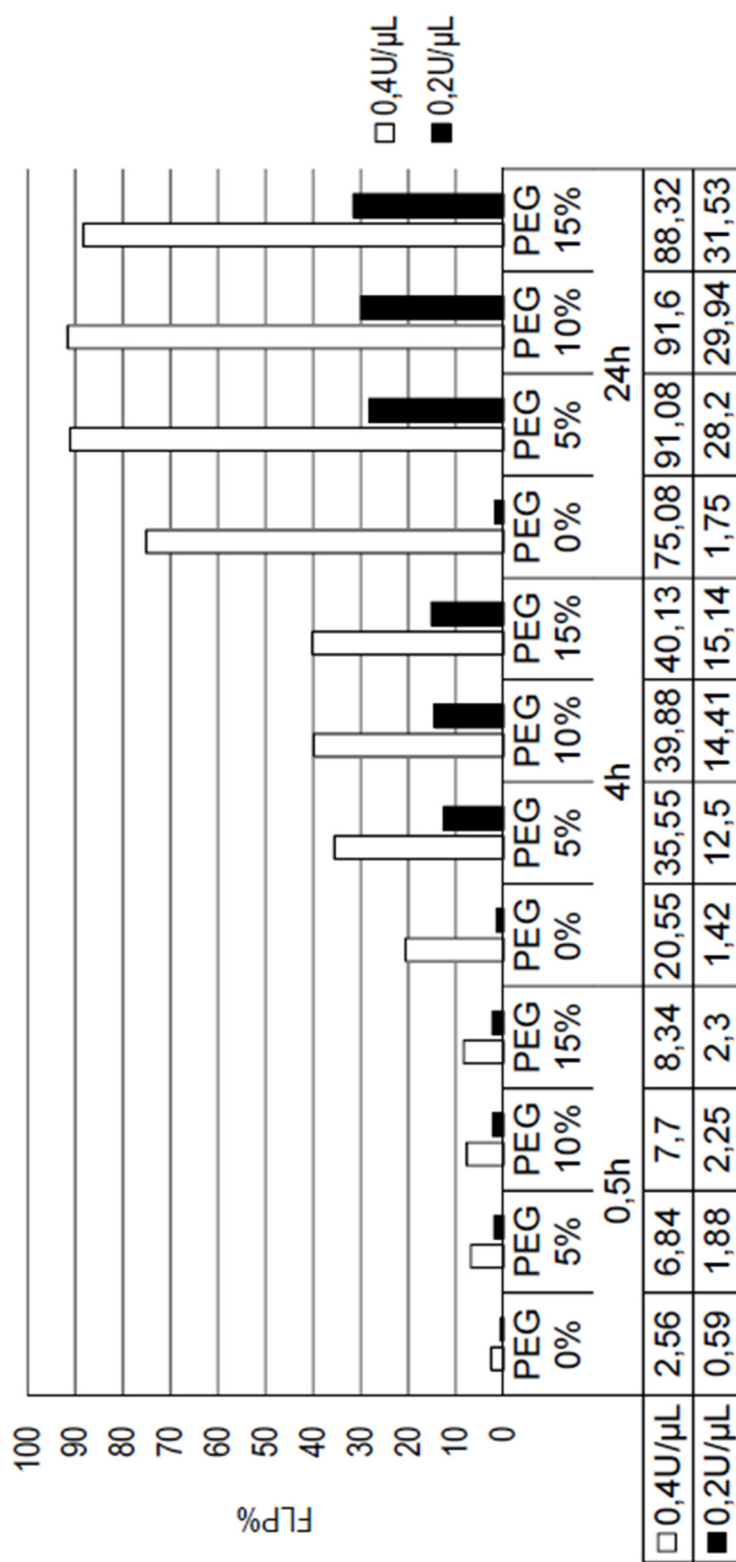


Fig. 14

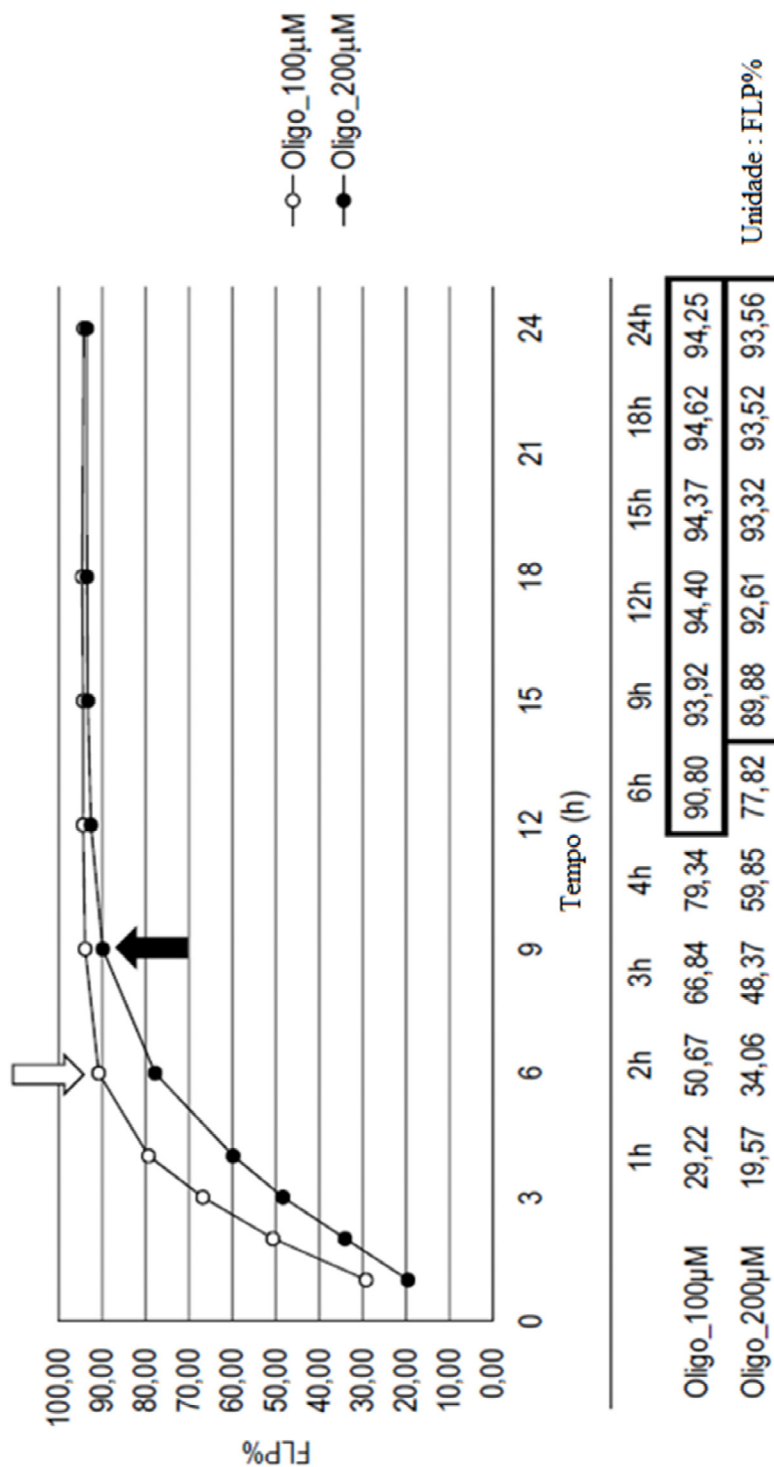


Fig. 15

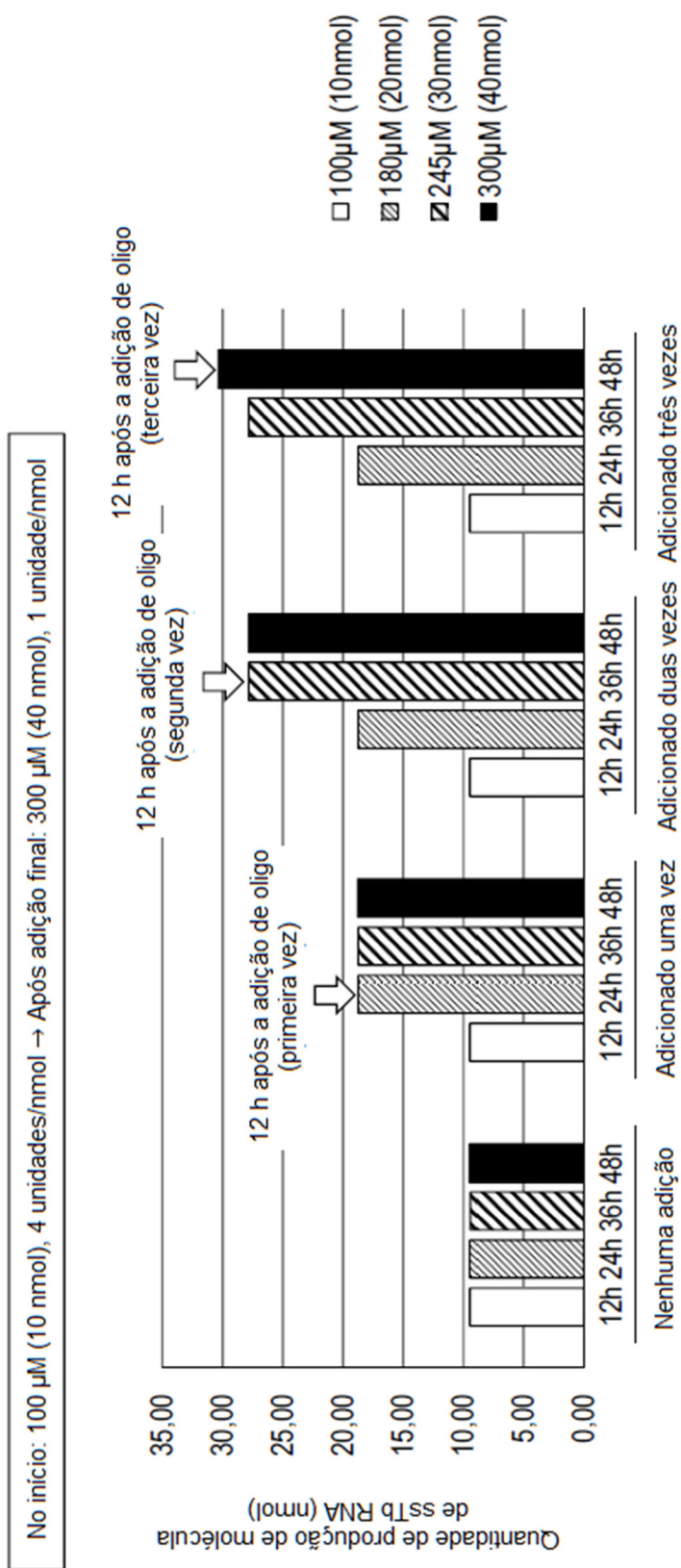


Fig. 16

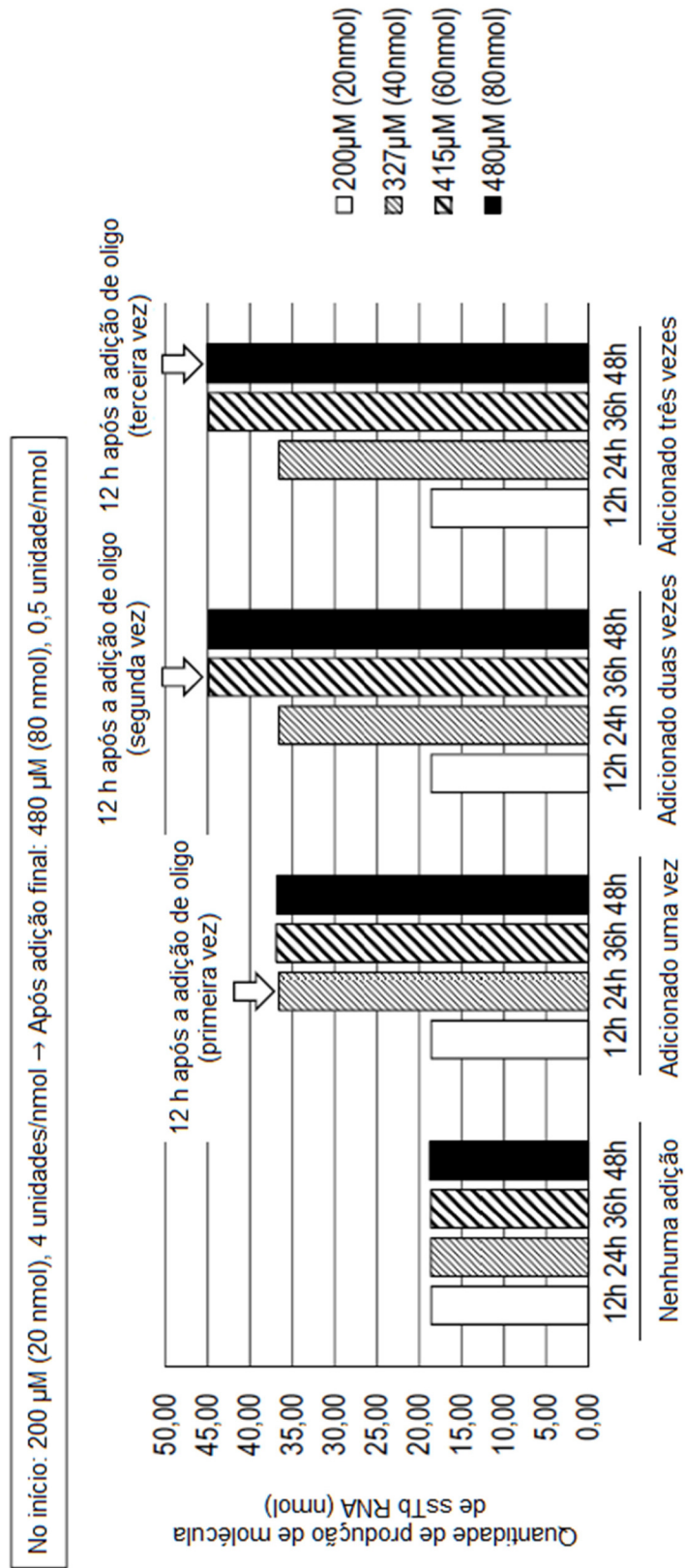


Fig. 17

Gene alvo	Estrutura de ácido nucleico
GAPDH	<p> 3' G-A-A 5' C-A-U-G-A-G-A-A-G-U-A-U-G-A-C-A-A-C-A-G-C-C P C-U-U-G-G-U-A-C-U-C-U-U-C-A-U-A-C-U-G-U-U-G-U-C-G-G (SEQ ID NO: 55) (1) </p>
LAMA1	<p> 3' G 5' A-G-U-G-U-U-G-U-C-U-C-G-U-U-A-C-A-A-U-A-U-C-C P C-C-U-C-A-C-A-A-C-A-G-A-G-C-A-A-U-G-U-U-A-U-A-G-G (SEQ ID NO: 56) (2) (3) </p> <p> 3' G 5' A-G-U-G-U-U-G-U-C-U-C-G-U-U-A-C-A-A-U-A-U-C-C C U C-C-U-C-A-C-A-A-C-A-G-A-G-C-A-A-U-G-U-U-A-U-A-G-G Linker (SEQ ID NO: 53) (4)(5) Linker </p>
LMNA	<p> 3' G 5' A-G-C-G-U-C-A-C-C-A-A-A-A-G-C-G-C-A-A-U-U-C-C P C-U-U-C-G-C-A-G-U-G-G-U-U-U-U-C-G-C-G-U-U-A-A-G-G (SEQ ID NO: 57) (6) (7) </p>

Fig. 18

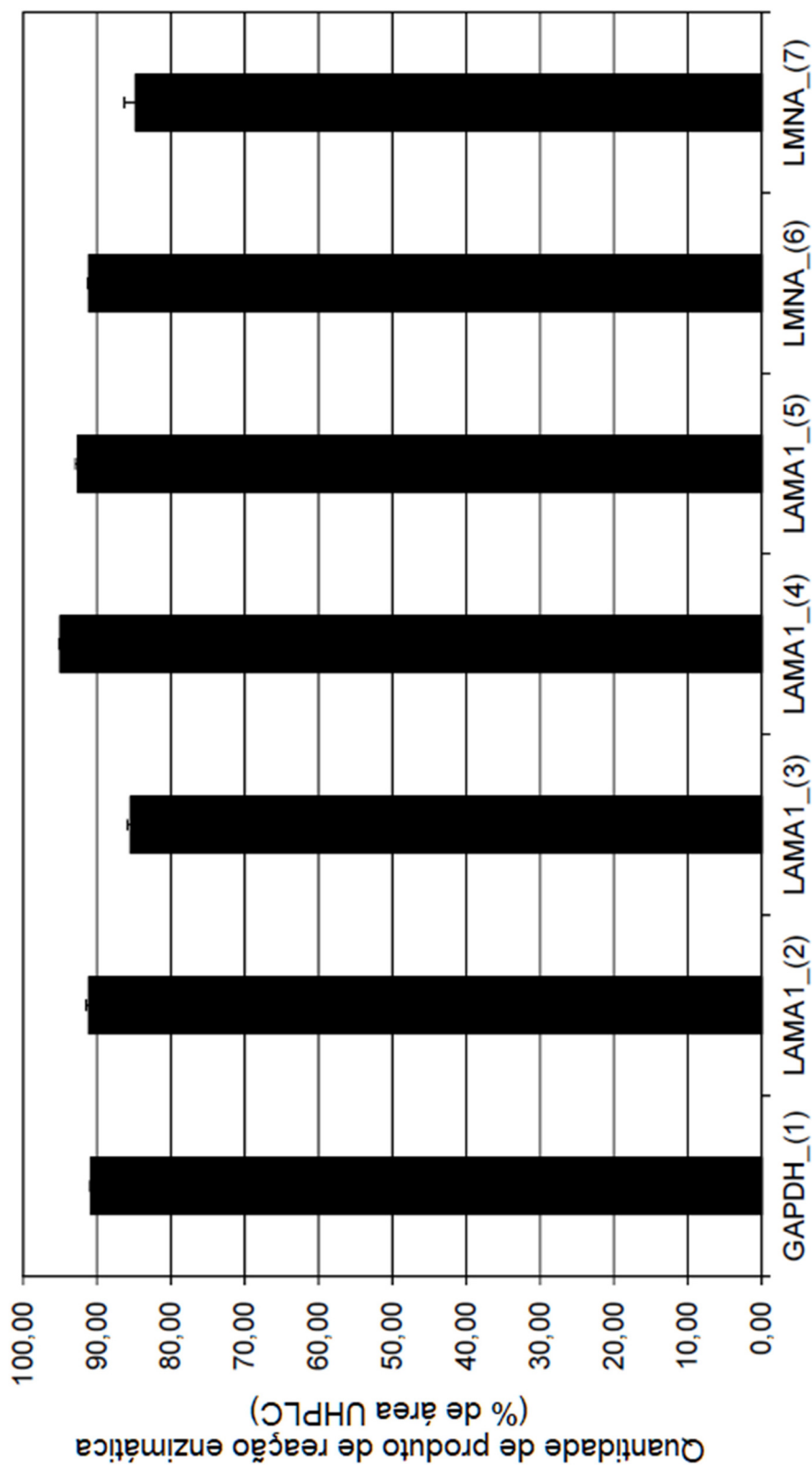
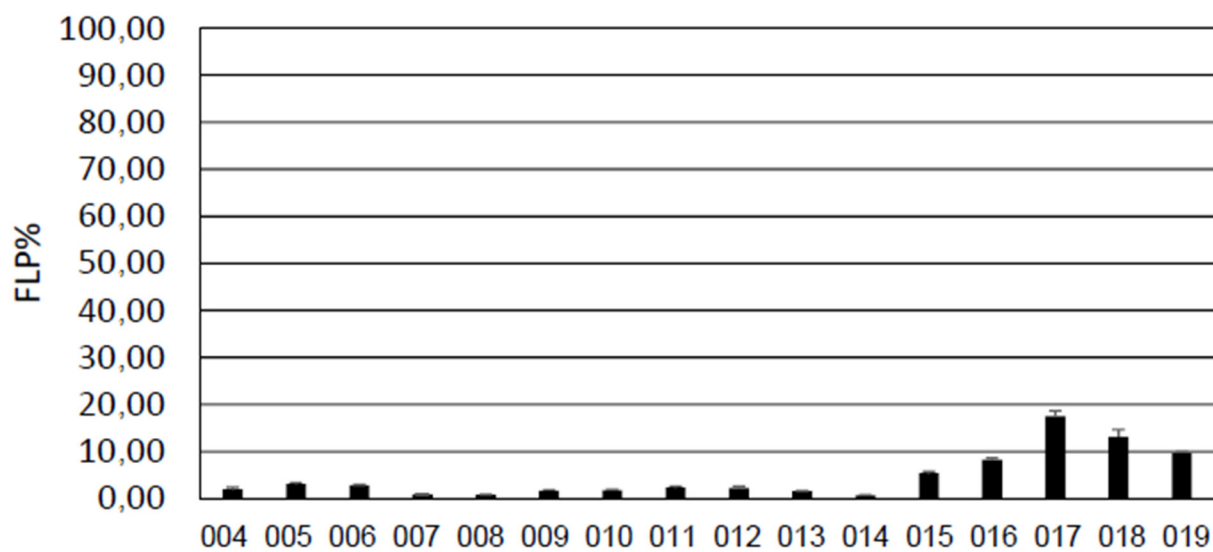


Fig. 19



RESUMO**MÉTODO E KIT PARA PRODUZIR UMA MOLÉCULA DE RNA DE FITA SIMPLES, E, MOLÉCULA DE OLIGORNA DE FITA SIMPLES**

A presente invenção provê um método para produzir uma molécula de RNA de fita simples em forma de grampo que inibe a expressão de um gene alvo. O método inclui (i) uma etapa de anelamento para anelar uma primeira molécula de oligoRNA de fita simples com uma segunda molécula de oligoRNA de fita simples e (ii) uma etapa de ligação para ligar, com o uso de uma ligase na família Rnl2, a extremidade 3' da primeira molécula de oligoRNA de fita simples à extremidade 5' da segunda molécula de oligoRNA de fita simples. A sequência produzida por meio da ligação da primeira molécula de oligoRNA de fita simples à segunda molécula de oligoRNA de fita simples contém uma sequência de inibição de expressão de gene dirigida ao gene alvo.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P141912listagem.txt
- Data de Geração do Código: 31/08/2020
- Hora de Geração do Código: 17:05:18
- Código de Controle:
 - Campo 1: 5930EA25FDBCDA79
 - Campo 2: 1CB6EA9F7D905FC1